

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

Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro

**ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA
IMPLANTAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE CASOS
FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ NO PERÍODO DE
JANEIRO 2014 A MARÇO 2015**

Macapá

2015

Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro

**ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA
IMPLANTAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE CASOS
FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ NO PERÍODO DE
JANEIRO 2014 A MARÇO 2015**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção para o título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Flávia Barreto dos Santos

Macapá

2015

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

Ribeiro, Edcelha Soares D'Athaide

Estabelecimento de procedimento operacional padrão para implantação de método molecular e investigação de casos febris suspeitos de dengue ocorridos no Amapá no período de janeiro 2014 a março 2015. / Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro – Macapá: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

87 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Orientadora: Flávia Barreto dos Santos

1. Dengue. 2. Vigilância Epidemiológica. 3. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Título

TÍTULO EM INGLES

Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro

**ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA
IMPLANTAÇÃO DE MÉTODO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE CASOS
FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ NO PERÍODO DE
JANEIRO 2014 A MARÇO 2015**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção para o título de Mestre em Vigilância Sanitária.

BANCA EXAMINADORA

Gonzalo José Bello Bentancor (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Jaqueline Mendes (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (Doutor)
Instituto Evandro Chagas

Flávia Barreto dos Santos (Doutor) – Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

À Deus, a minha família e amigos que sempre me apoiaram e incentivaram para a realização desse projeto.

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

À Coordenação do Mestrado profissional do INCQS.

Ao IOC por me receber no laboratório de Flavivirus e me proporcionar o treinamento em Biologia Molecular.

À Prof^a. Dra. Flávia Barreto, que foi muito mais que uma orientadora foi e será sempre uma amiga, obrigada pela confiança, pela atenção, pela orientação em todos os momentos, pela compreensão, por sua paciência e por ser exemplo de profissional e de mulher a qual sempre fará parte da minha vida.

À amiga Thiara Manuele Alves de Souza pelo conhecimento compartilhado, por sua dedicação, por seu carinho e por todo o seu apoio e ajuda durante toda a realização desta dissertação, pois sem isso não teria conseguido e será uma pessoa que vai permanecer no meu coração e família para sempre, pois me ensinou muito nesse ano de convivência.

À Prof^a. Msc. Mayara Amoras Teles Fugishima, que além de amiga e incentivadora me ajudou nesta dissertação.

A amiga Rosemary que também muito me ajudou e incentivou no decorrer dos anos convividos de trabalho e uma amizade solida e verdadeira.

A aluna do curso de Farmácia Kelly Huanna que me ajudou na seleção e separação das amostras para realização desta dissertação.

Ao Grupo do Laboratório de Flavivirus do Instituto Oswaldo Cruz, por todo apoio e pela agradável convivência. Em especial a Fernanda de Bruycker, Alisson De Fabri, Priscila Conrado, Manoela Heringer, Celeste Torres pelo apoio e ajuda.

A todos os colegas e professores pela amizade além das salas de aula.

Aos meus pais Edvaldo D'Athaide e Iracelha D'Athaide, irmãos Ewerton, Edvaldo Junior e Adrieli, ao meu esposo Junior Ribeiro, a minha filha Manuela Maria e enteado Leonam Victor e aos meus cunhados Keyla, Alipio Junior obrigada pelo amor, alegria, atenção sem reservas e por ser sempre o meu porto.

Aos meus tios Francisco e Maria do Carmo por sempre me receber em sua casa me dando incentivo e apoio todas as vezes que precisei estar no Rio de Janeiro.

A todos os meus amigos e amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

O meu agradecimento a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

As coisas importantes para um homem saber e cujo conhecimento é necessário para sua felicidade não são talvez muito numerosas; contudo, seja qual for esse número, elas são um bem que lhe pertence, que ele tem direito de reivindicação onde quer que o encontre e do qual não podemos privá-lo sem cometer o mais injusto de todos os roubos, pois é um desses bens comuns a todos, cuja transmissão não priva aquele que o dá.

Jean-Jacques-Rousseau

RESUMO

A incidência de dengue no estado do Amapá e no município de Macapá apresentou um padrão observado na região Norte e no Brasil, com os ciclos de alta transmissão influenciados pela predominância de diferentes sorotipos. O vírus dengue, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* é constituído de RNA de fita simples que codifica proteínas estruturais e não estruturais e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A existência de um programa contínuo de vigilância epidemiológica tem como objetivo detectar e monitorar a circulação dos sorotipos DENV no país, onde existe a co-circulação de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer um procedimento operacional padrão (POP) para a implantação de método molecular para o diagnóstico laboratorial de dengue em apoio à vigilância epidemiológica da doença no país, investigar os casos febris suspeitos de dengue ocorridos no estado do Amapá, descrevendo os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de casos recebidos sob demanda espontânea no LACEN/AP, entre janeiro de 2014 a março de 2015, e aplicar a técnica de RT-PCR. Para tal, foi realizado um estudo analítico, observacional e transversal. Foi desenvolvido o POP de extração de RNA viral e amplificação genômica para identificação do sorotipo de DENV por RT-PCR de acordo com o protocolo de Lanciotti et al (1992). Um total de 2.408 casos febris suspeitos de infecção por dengue foi recebido no LACEN/AP no período de estudo, testados pelo diagnóstico laboratorial sorológico de rotina (MAC-ELISA e NS1 ELISA) e, 89,3% (2.151/2.408) foram confirmados. Deste total, 79,6% (1.918/2.408) foram confirmados por MAC-ELISA e 9,7% (233/2.408) por NS1 ELISA. A RT-PCR confirmou 12% dos casos analisados, sendo DENV-1 (n=9) e DENV-4 (n=3) os sorotipos identificados. Os resultados discordantes entre a RT-PCR e o MAC-ELISA foram significativos, mas o mesmo não foi observado quando os resultados discordantes da RT-PCR e NS1 foram avaliados. Os resultados obtidos ressaltam a contribuição do presente trabalho para a vigilância deste agente nesta região e, a implementação de um método de identificação viral rápido e sensível encontra uma efetiva aplicação.

Palavras Chaves: Dengue. Amapá. Vigilância epidemiológica, RT-PCR

ABSTRACT

The incidence of dengue in the state of Amapá and in the city of Macapá showed a pattern observed in the North and in Brazil, with high transmission cycles influenced by the predominance of different serotypes. The dengue virus belongs to the Flaviviridae family, genus flavivirus. It consists of single-stranded RNA encoding structural and nonstructural proteins. It has four serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. The existence of an ongoing program of surveillance aims to detect and monitor the movement of DENV serotypes in the country, where there is the co-circulation of DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4. The aim of this study was to establish a standard operating procedure (SOP) for the implantation of a molecular method for laboratory diagnosis of dengue in support of the epidemiological surveillance of the disease in the country and to investigate dengue suspected febrile cases occurred in the state of Amapá, describing the epidemiological, clinical and laboratorial aspects of cases received spontaneously in LACEN/AP from January 2014 to March 2015, and to apply the RT-PCR technique. For this purpose, an analytical, observational and cross-sectional study was performed. Viral RNA extraction SOP and a genomic amplification SOP to identify DENV serotypes by RT-PCR according to the protocol Lanciotti et al (1992) were established. A total of 2,408 cases of dengue suspected cases was received at LACEN / AP during the studied period. The cases were submitted to routine serological laboratory diagnostics (MAC-ELISA and ELISA NS1) and 89.3% (2,151 / 2,408) were confirmed. Of this total, 79.6% (1,918 / 2,408) were confirmed by MAC-ELISA and 9.7% (233 / 2,408) for NS1 ELISA. The RT-PCR identified the infecting serotype in 12% of the cases analyzed. DENV-1 (n = 9) and DENV-4 (n = 3) were the serotypes characterized. The differences observed in the RT-PCR and MAC-ELISA were significant, but the same was not observed when the results obtained by the RT-PCR and NS1 ELISA were compared. The results obtained here shows the contribution of this work to the monitoring of this agent in this region and the implementation of a rapid and sensitive viral identification method is an effective application.

Key words: Dengue, Amapá, Epidemiological surveillance, RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Número acumulado dos sorotipos de dengue registrados desde 1943.....	16
Figura 2 Distribuição global do risco de infecção pelos vírus dengue.....	17
Figura 3 Partícula (a) e genoma (b) do vírus dengue (DENV): proteína precursora da proteína de membrana (prM); proteína de membrana (M); proteína do envelope (E); proteína do capsídeo (C); proteínas não estruturais 1 – 5 (NS1-5); regiões não traduzidas (UTR)	19
Figura 4 Ciclos de transmissão dos vírus dengue (DENV).....	21
Figura 5 Esquema representativo das etapas do processo de replicação dos vírus dengue.....	23
Figura 6 Representação esquemática da cinética de antígeno e anticorpo nas infecções por dengue	24
Figura 7 Classificação dos casos de dengue de acordo com a WHO, 2009.....	25
Figura 8 História evolutiva do diagnóstico das infecções por dengue	26
Figura 9 Comparação entre a disponibilidade e especificidade dos métodos diretos e indiretos para o diagnóstico das infecções por dengue	31
Figura 10 Distribuição dos sorotipos de dengue nas Américas, 1990-2014	33
Figura 11 Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2013 a 2015.....	35
Figura 12 Distribuição dos sorotipos de dengue no Brasil, 2015.....	36
Figura 13 Incidência de casos prováveis de dengue, Brasil, região norte, Amapá e Macapá, 2000 a 2010.....	37
Figura 14 Municípios com notificação de casos de dengue no estado do Amapá, 2014	37
Figura 15 Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992). A: Transcrição reversa e amplificação do RNA viral utilizando iniciadores consensuais. B: Tipagem dos vírus dengue (semi-nested PCR) utilizando iniciadores tipo-específicos	48
Figura 16 Distribuição dos casos estudados (n=100), confirmados por MAC-ELISA e/ou NS1 ELISA, de acordo os municípios do estado do Amapá, no período de janeiro de 2014 a março de 2015, para investigação do sorotipo infectante	50
Figura 17 Frequência das manifestações clínicas observadas em casos confirmados de dengue (n=100) ocorridos no Amapá, de Janeiro de 2014 a Março de 2015.....	51
Figura 18 Eletroforese em gel de agarose de produtos da amplificação por RT-PCR de casos	

representativos, para tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti et al. (1992).
Análise representativa de casos de DENV-1 (A) e DENV-4 (B)..... 52

Figura 19 Distribuição da confirmação laboratorial de casos de dengue (n=100) por MAC-ELISA, NS1 ELISA e RT-PCR de acordo com o número de dias de sintomas dos pacientes provenientes do Amapá 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação genotípica baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver e Vasilakis (2009)	20
Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue	45
Tabela 3 Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia (RT-PCR)	45
Tabela 4 Distribuição dos casos notificados e confirmados de infecção por dengue, por município de ocorrência, Janeiro de 2014 a Março de 2015	49
Tabela 5 Distribuição dos casos confirmados por dengue (n=100) no Amapá, por gênero e faixa etária, Janeiro de 2014 a Março de 2015	51
Tabela 6 Diagnóstico laboratorial (MAC-ELISA e NS1ELISA) em casos confirmados de dengue (n=100) ocorridos no Amapá, no período de Janeiro de 2014 a Março de 2015	52
Tabela 7 Caracterização dos casos de dengue confirmados por RT-PCR (n=12) em relação aos testes de MAC-ELISA e NS1 ELISA.2014 a Março de 2015	53
Tabela 8 Comparação entre os resultados obtidos nos testes de RT-PCR e MAC-ELISA utilizados na investigação dos casos de dengue provenientes do Amapá, entre Janeiro de 2014 a Março de 2015	54
Tabela 9 Comparação entre os resultados obtidos nos testes de RT-PCR e NS1 ELISA utilizados na investigação dos casos de dengue provenientes do Amapá, entre Janeiro de 2014 a Março de 2015	54

SIGLAS E ABREVIATURAS

Ae.	<i>Aedes aegypti</i>
Acs	Anticorpos
AP	Amapá
AP-61	Célula de superfície de mosquito <i>Ae. pseudoscutellaris</i> passagem 61
AP-64	Célula de superfície de mosquito <i>Ae. pseudoscutellaris</i> passagem 64
BHK21	Rim de hamster recém-nascido (do Inglês: Baby hamster kidney)
°C	Grau Célsius
C	Proteína do capsídeo ou core
C6/36	Célula de mosquito <i>Ae. Albopictus</i> clone 6 passagem 36
CLA-1	Glicoproteína de membrana plasmática 1
CVS	Coordenadoria de Vigilância em Saúde
DC	Dengue clássico
DC-SIGN	Células dendríticas ICAM-3 integrina não aderida (do inglês: <i>dendritic cell ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>)
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Proteínas do envelope
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FD	Febre Dengue
FHD	Febre hemorrágica do dengue
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LABFLA	Laboratório de Flavivirus
LACEN	Laboratório Central

LLC-MK2	Células epiteliais de rim de macaco Rhesus
M	Proteína de membrana
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimáticos de captura do anticorpo M (do Inglês: <i>IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
mL	Mililitro
NK	Célula matadora natural (do Inglês: <i>Natural killer</i>)
Nm	Nanômetros
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de Base
PCR	Reação da cadeia pela polimerase
POP	Procedimento operacional Padrão
PEAa	Programa de Erradicação do <i>Ae. aegypti</i>
prM	Proteína pré-membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
RDT	Teste rápido (do Inglês: <i>Rapid Diagnostic Test</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida da reação pela cadeia da polimerase
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TRA-284	Linhagem celular de mosquito <i>Toxorhynchites amboinensis</i>
VERO	Célula de rim de macaco verde Africano (do Inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from an African green monkey</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 BREVE HISTÓRICO	18
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO	19
1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE	20
1.4 TRANSMISSÃO DOS VÍRUS DENGUE.....	22
1.5 REPLICAÇÃO VIRAL E RESPOSTA IMUNE NAS INFECÇÕES POR DENGUE..	23
1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NAS INFECÇÕES POR DENGUE.....	25
1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR DENGUE	27
1.7.1 Amostras biológicas para o diagnóstico do dengue	28
1.7.2 Isolamento viral e imunofluorescência	28
1.7.3 Métodos sorológicos	29
1.7.4 Métodos moleculares para a detecção do genoma dos DENV.....	30
1.7.4.1 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)	31
1.7.4.2 RT-PCR em Tempo Real.....	32
1.8 EPIDEMIOLOGIA	33
1.8.1 Dengue nas Américas.....	33
1.9 DENGUE NO BRASIL	34
1.10 DENGUE NO ESTADO DO AMAPÁ	37
1.11 CONTROLE E PREVENÇÃO.....	39
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	42
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR CONVENCIONAL	43

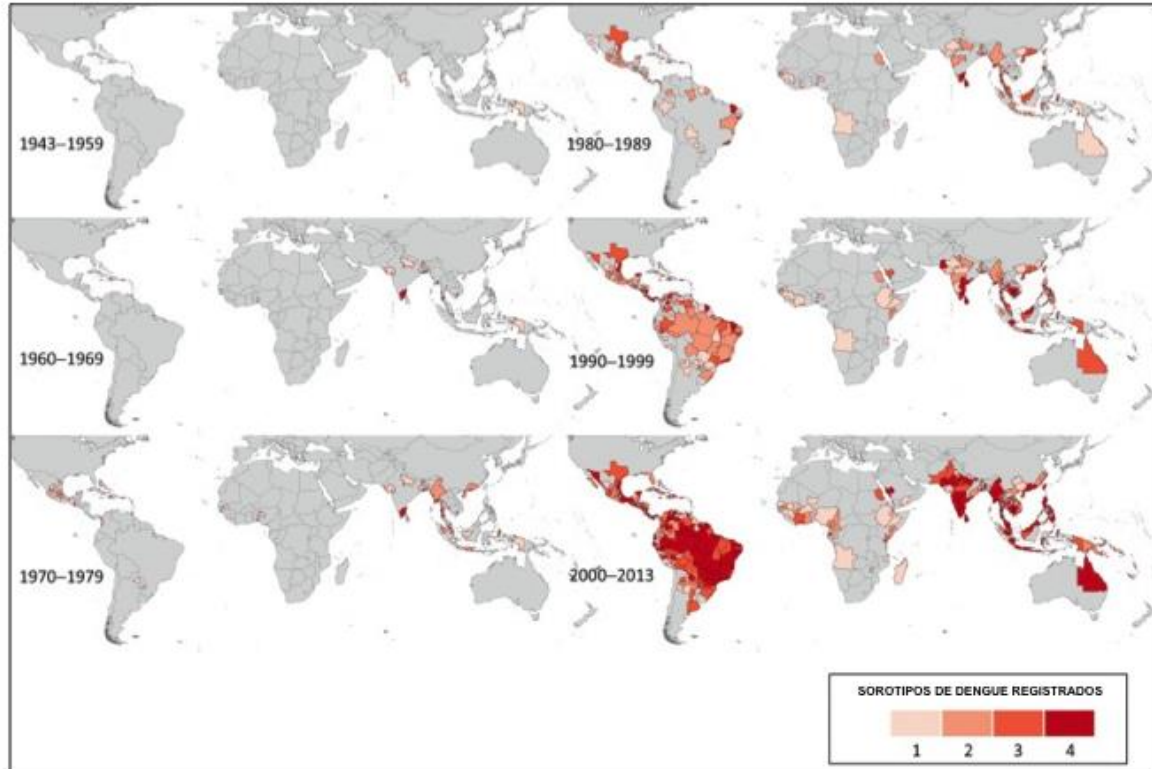
4.2 INVESTIGAÇÃO DOS CASOS FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ	43
4.2.1 Considerações éticas	43
4.2.2 Desenho de estudo.....	43
4.2.3 Amostragem e banco de dados.....	44
4.2.4 Estocagem e conservação das amostras biológicas.....	44
4.2.5 Triagem dos casos suspeitos de dengue por métodos sorológicos.....	44
4.2.6 Determinação de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)	45
4.2.7 Teste de captura de antígeno NS1	45
4.2.8 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).....	45
4.2.9 Infraestrutura disponível	47
4.2.10 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 ELABORAÇÃO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR CONVENCIONAL DE ACORDO COM O PROTOCOLO DE LANCIOTTI ET AL. (1992) NO LACEN/AP.....	48
5.2 INVESTIGAÇÃO DOS CASOS FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ	49
5.2.1 Descrição dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais	49
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXO I.....	79
ANEXO II	86

1 INTRODUÇÃO

A dengue é hoje uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo em termos de morbidade e mortalidade e, nos últimos 50 anos a dengue vem progressivamente alcançando o status de pandemia, hospitalizando mais de 5 milhões de crianças e com o registro de mais de 70.000 mortes devido à forma mais grave da doença. Em todo o mundo estima-se que aproximadamente três bilhões de pessoas, 2/5 da população mundial, estão sob risco de contrair dengue e que ocorram anualmente cerca de 50 milhões de casos. Desse total, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos 20 mil morrem em consequência da doença (WHO, 2013).

Desde o primeiro isolamento do vírus na década de 40, a doença dispersou, principalmente devido à urbanização e tráfego aéreo, com a co-circulação dos quatro sorotipos do vírus ocasionando a uma situação hiperendêmica em muitas regiões do mundo como demonstrado na (Messina et al., 2014). Figura 1.

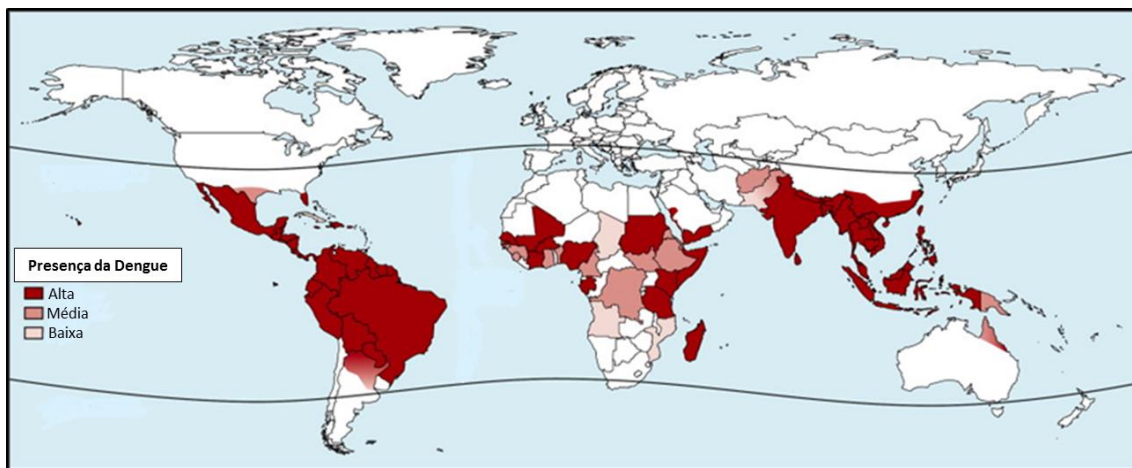
Figura 1 - Número acumulado dos sorotipos de dengue registrados desde 1943.



Fonte: Adaptado de Messina et al., (2014).

Atualmente, todos os sorotipos do vírus estão circulando na África, Sul e Sudeste da Ásia, Regiões do Pacífico Ocidental, Caribe, e Américas Central e do Sul e introduções frequentes no sudeste da América do Norte são regularmente reportadas (Rodriguez-Roche & Gould, 2013). A Figura 2 demonstra a distribuição global do risco de infecção pelos DENV (Guzmán & Harris, 2014).

Figura 2 - Distribuição global do risco de infecção pelos vírus dengue.



Fonte: Adaptado de Guzmán & Harris, 2014.

1.1 BREVE HISTÓRICO

A origem geográfica dos vírus dengue (DENV) tem sido um tópico de intensa especulação, uma vez que alguns defendem a origem Africana do vírus devido à mesma origem do principal vetor, *Aedes (Ae.) aegypti* (Christophers, 1960). No entanto, nos estudos de Smith e Rudnick (Smith, 1956; Rudnick & Lim, 1986), foi demonstrada uma relativa susceptibilidade do vetor *Ae. aegypti formosus* da África aos DENV (Diallo et al., 2005) e análises filogenéticas apontaram para uma origem asiática (Wang et al., 2000). Independentemente da sua origem, os DENV provavelmente evoluíram como um vírus de mosquito arbóreo antes de se adaptar a primatas em ambientes silvestre (Gubler, 1997).

Os primeiros relatos de grandes epidemias de uma doença compatível com dengue datam de 1779 e 1780 e foram relatadas na Ásia, África e América do Norte, porém há registros da ocorrência desta doença no século III (Gubler, 2006).

O termo dengue originou-se na Espanha e foi introduzido na literatura médica inglesa entre 1827 e 1828, durante uma epidemia de exantema com artralgia ocorrida no Caribe. Em 1869, foi estabelecido pelo *London Royal College of Physicians* para denominar esta

enfermidade, até então referida na literatura como "febre articular", "febre quebra ossos", "dinga", "polka", entre outros (Siler *et al.*, 1926; Halstead, 1980). Este termo é um homônimo espanhol para o Swahili "Ki denga Pepo", que significa pancada ou golpe, causada por um espírito do mal, que provoca um ataque doloroso semelhante à câimbra (CDC, 2006).

Graham em 1903 foi o primeiro a publicar que a transmissão do DENV se dava através de mosquitos e a transmissão pelo *Ae aegypti* foi confirmada em 1926 por Siler, Hall e Hitchens (Siler *et al.*, 1926). Ashburn e Craig, em 1907, observaram que a doença era causada por um organismo filtrável e de tamanho ultramicroscópico, descartando a hipótese de uma infecção por bactérias e/ou protozoários.

As primeiras cepas dos DENV foram isoladas em 1944 durante a Segunda Guerra Mundial, a partir de soros de soldados que contraíram a infecção na Índia, Nova Guiné e Havaí (Sabin, 1952). Os vírus provenientes da Índia, do Havaí e de uma das cepas de Nova Guiné foram antigenicamente semelhantes e denominados vírus dengue 1 (DENV-1) e a cepa havaiana considerada protótipo. Outras cepas de Nova Guiné apresentaram características antigênicas diferentes, permitindo a identificação de outro sorotipo-vírus dengue tipo 2 (DENV-2), sendo considerado protótipo. Dois novos vírus foram isolados durante uma epidemia ocorrida em Manila (1953) e estes vírus foram classificados como vírus dengue tipo 3 (DENV-3) e vírus dengue tipo 4 (DENV-4) (Hammon *et al.*, 1960), sendo as cepas H87 e H241 consideradas protótipos para estes sorotipos, respectivamente.

Embora umas séries de epidemias estivessem ocorrendo no Sudeste Asiático, não houveram epidemias notificadas nas Américas, África e Oceania durante os 20 anos seguintes, principalmente devido ao programa de erradicação do *Ae. aegypti* por parte da Organização Pan-Americana de Saúde, que visava evitar epidemias de febre amarela urbana. No entanto, com a descontinuidade desse programa no final dos anos 70, o *Ae. aegypti* voltou a infestar a maioria dos países americanos (Gubler, 1997).

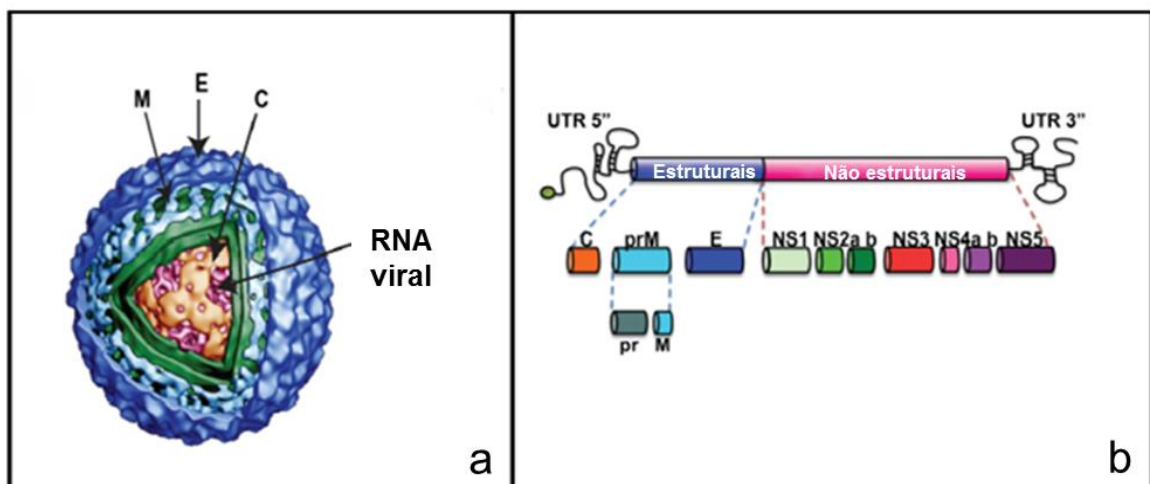
1.2 AGENTE ETIOLÓGICO

Os quatro sorotipos de dengue (DENV-1 a 4) pertencentes à família *Flaviviridae*, são mantidos na natureza por um ciclo de transmissão que envolve hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, onde o homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler, 1997). Estudos recentes sugeriram o

isolamento e a caracterização de um novo sorotipo de DENV de transmissão silvestre em Sarawak, Malásia, detectado em humanos (Vasilakis et al 2013; Normile, 2013).

O vírus é esférico, com 40 a 60 nm de diâmetro, contendo um capsídeo de simetria icosaédrica envolto por envelope lipídico. O genoma viral é constituído por RNA de fita simples com aproximadamente 11.000 pares de base, polaridade positiva e uma única fase aberta de leitura que codifica para três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína pré-M/M associada à membrana e proteína E do envelope além de sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Figura 3 (Miller et al., 2010; Rosa Maria Del Angel, 2013).

Figura 3 - Partícula (a) e genoma (b) do vírus dengue (DENV): proteína precursora da proteína de membrana (prM); proteína de membrana (M); proteína do envelope (E); proteína do capsídeo (C); proteínas não estruturais 1-5 (NS1-5); regiões não traduzidas (UTR).



Fonte: Adaptado de Rosa Maria Del Angel, 2013.

1.3 DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS DENGUE

Os quatro sorotipos de DENV apresentam alta variabilidade genética devido à falta do mecanismo de correção da RNA polimerase viral durante a replicação, as rápidas taxas de replicação, ao grande tamanho populacional e pressão frente à reposta imunológica do hospedeiro (Homes & Twiddy et al., 2003).

Dados filogenéticos e de epidemiologia molecular subdividem os DENV em diferentes genótipos, que são geralmente associados a diferentes áreas geográficas (Chen, 2011). Até 2009 era utilizada uma classificação genotípica estabelecida por Rico-Hesse (2003), que se baseava

no sequenciamento da região do gene E do genoma. Esta classificação caracterizou cinco genótipos para DENV-1, quatro para DENV-2 e DENV-3 e três genótipos para DENV-4. Baseados no sequenciamento completo do gene E, Weaver e Vasilakis (2009) caracterizaram o DENV-1 em 5 genótipos, DENV-2 em 6 genótipos, DENV-3 em 5 genótipos e DENV-4 em 4 genótipos (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação genotípica baseada na análise filogenética do sequenciamento do gene que codifica para a proteína E, de acordo com Weaver e Vasilakis (2009).

Sorotipo	Genótipo	Distribuição geográfica
DENV-1	I	Sudeste Asiático, China, Leste da África
	II	Tailândia (1950-1960)
	III	Malásia (cepas selvagens)
	IV	Ilhas do Oeste do Pacífico e Austrália
	V	Américas, Oeste da África Africano, Ásia
DENV-2	Asiático I	Malásia e Tailândia
	Asiático II	Vietnã, da China, Taiwan, Sri Lanka e Filipinas
	Cosmopolita	Austrália, Leste e Oeste Africano, Ilhas dos oceanos Pacífico e Índico, Subcontinente Indiano e Oriente Médio
	Americano	América Latina, Caribe (1950-1960), Subcontinente Indiano e Ilhas do Pacífico
	Sudeste	Tailândia, Vietnã, Américas (últimos 20 anos)
	Selvagem	Oeste Africano e Sudeste Asiático
DENV-3	I	Indonésia, Malásia, Filipinas e Sul da Ilhas do Pacífico
	II	Tailândia, Vietnã e Bangladesh
	III	Sri Lanka, Índia, África, Samoa, Tailândia (1962)
	IV	Porto Rico, Américas Latina e Central, Taiti (1965)
	V	Filipinas (1956), Japão (1973), China (1980) América do Sul
DENV-4	I	Tailândia, Filipinas, Sri Lanka e Japão (provenientes do Sudeste Asiático)
	II	Indonésia, Malásia, Taiti, Caribe e Américas
	III	Tailândia (cepas recentes)
	IV	Malásia (cepas selvagens)

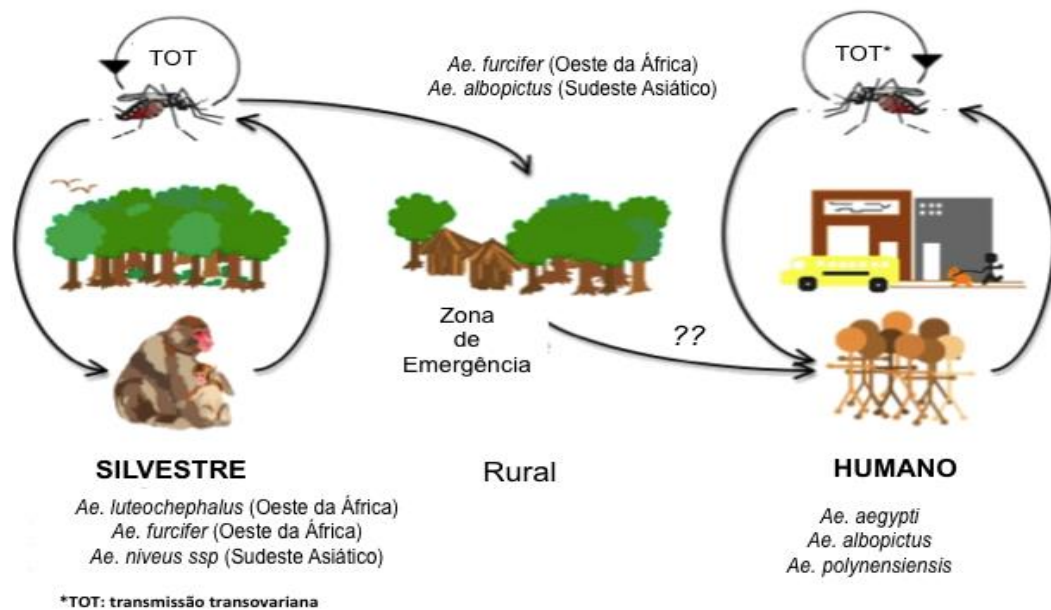
No Brasil atualmente circula o genótipo Américas/África ou genótipo V de DENV-1, porém três linhagens distintas dentro deste genótipo foram descritas (dos Santos et al., 2011; de Bruycker-Nogueira et al., 2015). Para o DENV-2, foi descrita a existência de duas linhagens do genótipo do Sudeste Asiático/Americano (Faria et al., 2013) e de quatro linhagens do genótipo do Subcontinente Indiano ou genótipo III para os DENV-3 (Araújo et al., 2009). Para o DENV-4 já foi descrita a existência de dois genótipos (I e II) no país (Nunes et al., 2012; Figueiredo et al., 2013).

1.4 TRANSMISSÃO DOS VÍRUS DENGUE

Os vírus são mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler, 2002).

O *Ae. aegypti* está envolvido no ciclo urbano da doença, em consequência de seus hábitos domésticos, preferindo alimentar-se em humanos e depositar seus ovos em locais próximos ou dentro de residência, sendo portanto, o vetor mais importante na transmissão da doença para o homem. Entretanto, outras espécies de *Aedes*, como o *Ae. albopictus*, estão envolvidas em diferentes ciclos de transmissão rural e enzoótica destes vírus (Chen & Vasilakis, 2011), Figura 4.

Figura 4 - Ciclos de transmissão dos vírus dengue (DENV).



Fonte: Adaptado de Chen & Vasilakis, 2011.

O mecanismo de transmissão dos DENV ocorre durante o repasto sanguíneo, pela fêmea do mosquito vetor. Após a ingestão de sangue contaminado, é necessário um tempo de incubação extrínseca, que varia de 8 a 12 dias e é o tempo necessário para que o vírus se replique, até a localização nas glândulas salivares do inseto, o que permite sua passagem para um hospedeiro humano susceptível por meio de um novo repasto sanguíneo, determinando um novo ciclo (Gubler, 1998; Chan & Johansson, 2012). Existe, ainda, a transmissão do vírus da

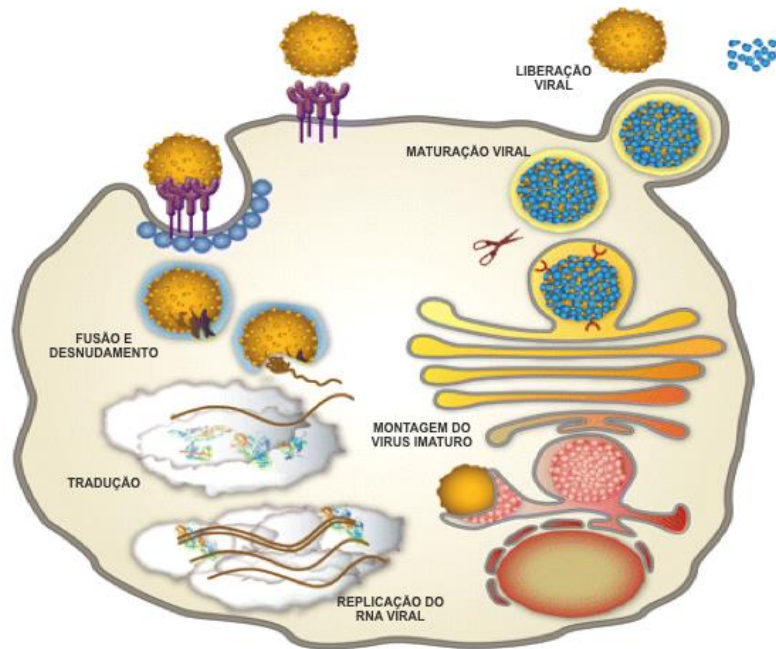
fêmea do mosquito para sua prole, denominada de transmissão transovariana ou vertical, não havendo a necessidade de outro hospedeiro neste ciclo (Anderson & Rico-Hesse, 2006).

1.5 REPLICAÇÃO VIRAL E RESPOSTA IMUNE NAS INFECÇÕES POR DENGUE

Após a picada do vetor infectado com o vírus, durante o repasto sanguíneo, as células dendríticas na pele são, provavelmente, as primeiras células infectadas após a picada do vetor infectado com o vírus. Estudos conduzidos em autópsias de tecidos humanos e camundongos, identificaram os monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas e maduras como algumas células alvos das infecções pelos DENV. Após a replicação inicial e migração para os linfonodos, os vírus aparecem na corrente sanguínea (Balsitis et al., 2009; Laughlin et al., 2012).

Os vírus entram na célula por ligação específica da proteína E com diversos receptores celulares, incluindo DC-SIGN e receptores de manose (Rodenhuis-Zybert et al., 2010) seguido do processo de endocitose (van der Schaar et al., 2008). O pH ácido do endossoma induz a fusão do envelope do vírion com a membrana celular. Após o desnudamento, o RNA viral é liberado no citoplasma e as proteínas virais são traduzidas como poliproteína única que é clivada por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma viral inicia com síntese da fita negativa de RNA, que serve como molde para a síntese de fitas positivas de RNA da progênie (Zaitseva et al., 2010). A montagem das partículas virais ocorre associada ao retículo endoplasmático das células hospedeiras, os vírus brotam para dentro do lúmen do retículo endoplasmático, adquirem uma membrana lipídica (envelope) e são liberadas através do sistema de Golgi conforme a figura 5, (Laughlin et al., 2012).

Figura 5 - Esquema representativo das etapas do processo de replicação dos vírus dengue.



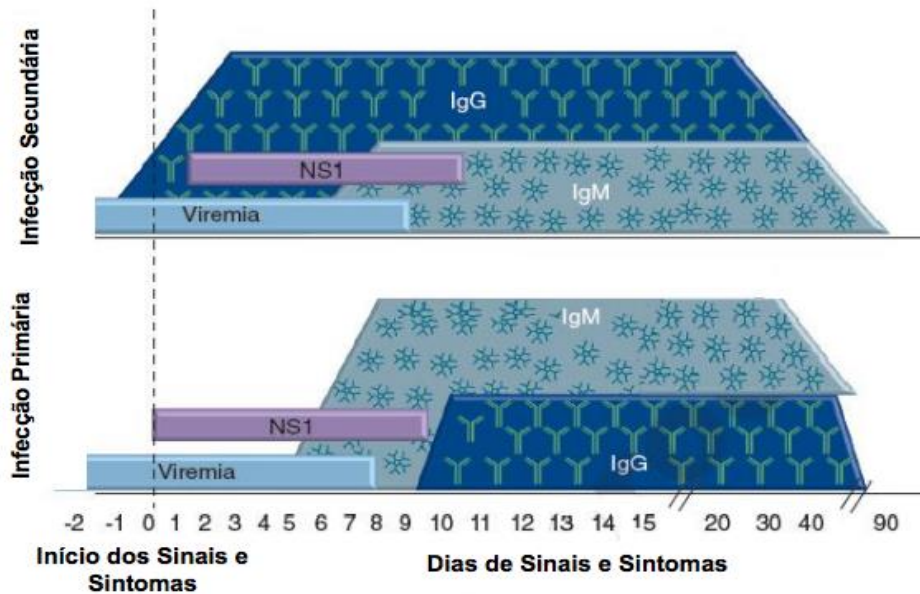
Fonte: Adaptado de Laughlin et al., 2012.

O período de viremia ocorre antes mesmo do aparecimento dos primeiros sintomas, que permanece detectável durante a fase febril aguda, geralmente por três a cinco dias (Vorndam & Kuno, 1997).

A resposta imune adquirida na infecção pelos DENV consiste na produção de anticorpos principalmente dirigidos contra a proteína do envelope viral. Na infecção primária pelo vírus há uma resposta lenta e com baixo título de anticorpos, sendo os da classe IgM os primeiros a aparecer (Guzman et al 2010). A maioria dos pacientes apresenta níveis detectáveis de IgM no sexto dia após o aparecimento dos sintomas. Os níveis de IgM alcançam seu pico por volta de duas semanas, mantendo-se detectáveis por 2 a 3 meses e diminuindo após este período (Nogueira et al., 1992).

Os anticorpos IgG começam a aparecer a partir do quinto dia de doença, na infecção primária. Os títulos de IgG, após um aumento a partir da primeira semana de infecção, continuam detectáveis por toda a vida. Já na infecção secundária há um alto título de IgG que pode ser detectado mesmo na fase aguda, além de alto grau de reação cruzada, mesmo contra outros flavivírus (Guzman et al 2010). Por outro lado, os níveis de IgM na resposta secundária são mais baixos do que na resposta primária (Figura 6). Com isso, a relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos podem ser usados na caracterização da resposta imune em primária ou secundária (Halstead, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática da cinética de antígeno e anticorpo nas infecções por dengue.



Fonte: Adaptado de Lima et al., (2014).

1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NAS INFEÇÕES POR DENGUE

Os quatro sorotipos podem produzir um amplo espectro de sinais e sintomas que vão desde uma doença febril leve até as formas graves. O período de incubação do vírus no homem pode variar de 3 a 14 dias, mas usualmente é de 5 a 7 dias (WHO, 2013). Os principais sinais e sintomas consistem de febre súbita, dor retro-orbitária associada com o movimento dos olhos e congestão conjuntival, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, exantema máculopapular generalizado, prurido, astenia, náuseas, vômitos, dor abdominal, sabor metálico nos alimentos, mudança no estado psicológico, podendo ocorrer depressão pós-doença. Em alguns casos, ocorre um segundo pico de febre que pode durar dois a três dias, desaparecendo em seguida (Dietz et al., 1990).

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma leve da doença, a dengue clássica que tem uma evolução benigna. Em uma proporção menor dos casos, entre 1 a 2%, a doença apresenta evolução muito mais grave, como a febre hemorrágica da dengue/síndrome de choque da dengue. Esta segunda forma da doença se caracteriza pelo aumento da permeabilidade

capilar, extravasamento de plasma e anormalidades homeostáticas que podem evoluir para insuficiência circulatória e choque hipovolêmico (WHO, 2009).

Estudos sugeriram um novo modelo para classificar a forma clínica da doença que utiliza critérios para definir casos de dengue e níveis de gravidade: dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave. Este modelo vem sendo testado em 18 países e tem demonstrado ser de uso prático para a decisão médica. (Figura 7). Desde janeiro de 2014 o Brasil adotou a nova classificação de acordo com a OMS 2009. (WHO, 2009)

Não existe um tratamento específico para dengue, o tratamento recebido pelos pacientes é de suporte e inclui repouso, hidratação, antipiréticos, analgésicos e antieméticos (WHO, 2009). Enquanto não houver uma vacina efetiva disponível para a população, o controle efetivo do mosquito, envolvendo a comunidade e a vigilância epidemiológica laboratorial são as melhores estratégias para prevenir epidemias de dengue e reduzir o impacto social (De Simone et al., 2004).

Figura 7 - Classificação dos casos de dengue de acordo com a WHO, 2009.



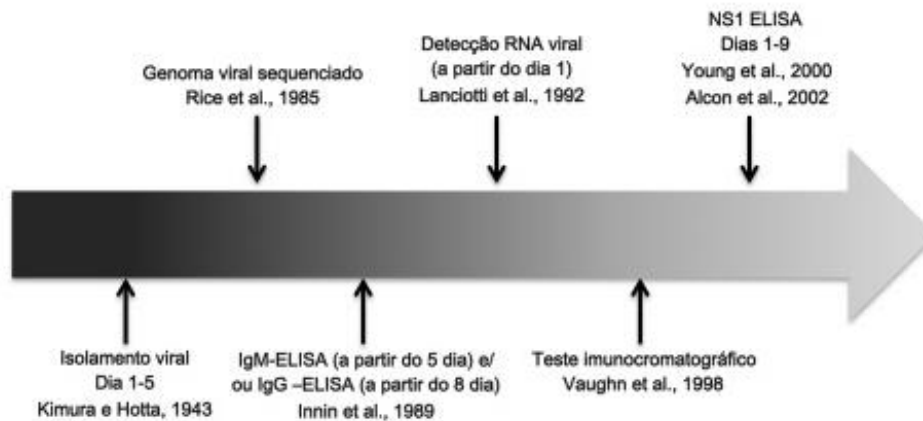
Fonte: Adaptado de WHO, 2009.

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS INFECÇÕES POR DENGUE

Em muitas situações, como na assistência ao paciente, vigilância, investigações de surtos e epidemias, estudo de vacinas e diagnóstico diferencial, um diagnóstico laboratorial preciso é de grande relevância (Lima et al., 2014).

O diagnóstico laboratorial das infecções pelos DENV pode ser realizado pelo isolamento viral e/ou detecção do ácido nucléico viral, de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos (IgM/IgG), de antígeno (NS1) e pela detecção de antígenos virais em tecidos (Guzman et al., 2010; Fatima & Wang, 2015). Desde o primeiro isolamento do vírus a partir do soro de pacientes no Japão em 1943, por Kimura e Hotta, o diagnóstico da doença evoluiu e permitiu cada vez mais a confirmação de casos (Figura 8).

Figura 8 - História evolutiva do diagnóstico das infecções por dengue.



Fonte: Adaptado de Fatima & Wang, 2015.

O período da doença em que o paciente se encontra é importante para decisão de qual o método para diagnóstico mais apropriado para ser utilizado e para uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento não dependa do diagnóstico virológico (Simmons, et al 2012).

A escolha do método de diagnóstico irá depender não apenas do objetivo do teste, mas de fatores como a infraestrutura do laboratório, expertise técnica disponível, coleta da amostra, condições de envio e armazenamento.

1.7.1 Amostras biológicas para o diagnóstico do dengue

Para o diagnóstico das infecções pelos DENV, a amostragem ideal consiste na obtenção de duas amostras de sangue pareadas, sendo uma coletada no início dos sintomas e outra na fase de convalescença. O sangue obtido deve ser preferencialmente centrifugado, sob refrigeração, para separação do soro, que é então transferido para tubos estéreis bem vedados e mantidos sob refrigeração (4° C por até 24 horas) ou congelado a -20° C. O plasma também pode ser utilizado e no momento da coleta deve se usar tubos com EDTA. Na eventual disponibilidade do líquido, pode-se realizar a pesquisa de vírus e anticorpos.

Na ocorrência de casos fatais, tecidos como fígado, baço, rim, linfonodos, pulmão, coração e cérebro podem ser submetidos ao isolamento viral e testes moleculares e devem ser colocados em recipientes separados, secos, estéreis, com a identificação de cada tecido e mantidos refrigerados após a coleta. Tecidos que se destinam a testes histopatológicos e imunohistoquímicos, devem ser colocados em solução de formalina tamponada a 10% e transportados em temperatura ambiente (Nogueira & dos Santos, 2015).

No Brasil, as amostras deverão ser enviadas ao Laboratório Central (LACEN) de cada estado e eventualmente ao laboratório de referência da região para a complementação de diagnóstico, caso necessário. As amostras enviadas deverão ser acompanhadas da ficha de identificação contendo todos os dados do paciente e informações sobre viagens, vacina contra febre amarela e a evolução do caso (Nogueira & dos Santos, 2015).

1.7.2 Isolamento viral e imunofluorescência

O isolamento viral é considerado como “padrão ouro” pois é a evidência direta da infecção viral e com ele é possível diagnosticar a dengue durante a fase aguda da doença, quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis.

Os sistemas de isolamento dos DENV mais utilizados incluem a inoculação intracerebral em camundongos recém nascidos, cultura de células de mamíferos (ex. células LLC-MK2, Vero e BHK21), inoculação intratorácica em mosquitos adultos e cultura de células de mosquitos (AP-61, TRA-284, C6/36, AP64 e CLA-1). EM termos de sensibilidade, a inoculação de amostras diretamente em mosquitos adultos é considerada o melhor sistema de isolamento, mas demanda experiência técnica e infraestrutura (Gubler, 1997).

O estabelecimento da cultura de células de mosquito no sistema de isolamento viral representou um grande avanço aos métodos virológicos utilizados no diagnóstico do dengue. O clone C6/36 (Igarashi, 1978) tem sido o mais utilizado nas últimas décadas, pois demonstrou ser altamente sensível à infecção pelos DENV, além de sua fácil manutenção, já que pode ser mantida à temperatura ambiente. A presença viral pode ser detectada pelo efeito citopático (ECP) na monocamada celular ou pela técnica de imunofluorescência indireta, com a utilização de soros hiperimunes aos quatro sorotipos dos DENV. Para a identificação dos DENV, utilizam-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos (Gubler et al., 1984).

1.7.3 Métodos sorológicos

A sorologia é o método utilizado para confirmação laboratorial de rotina. Por meio destas técnicas sorológicas é possível detectar infecções atuais ou recentes, pela da captura das imunoglobulinas da classe M (IgM) por ELISA (MAC-ELISA). Na maioria dos casos, somente uma amostra de soro coletada é suficiente para a confirmação diagnóstica, contudo um resultado negativo em amostra coletada em fase precoce (6 a 10 dias após o início dos sintomas) não exclui o diagnóstico de dengue, uma vez que, em alguns casos, os níveis de IgM tornam-se detectáveis pelo teste somente após esse período. O anticorpo IgM anti-dengue desenvolve-se rapidamente, geralmente a partir do quinto dia do início da doença, e tanto em infecções primárias, quanto secundárias, apresentam esses anticorpos detectáveis (Innis et al., 1989; Peeling et al, 2010).

O teste de inibição de hemaglutinação (IH) descrito por Clarke e Casals (1958) é considerado o ‘padrão ouro’ para a quantificação de anticorpos IgM e IgG anti-DENV, permitindo a caracterização do tipo de infecção em primária ou secundária. O aparecimento, aumento ou diminuição de quatro vezes no título de anticorpos anti-DENV entre amostras pareadas de um mesmo paciente, confirma a soroconversão sorológica e, portanto, a infecção. No entanto, esse método é trabalhoso e necessita de coletas pareadas para uma correta interpretação dos resultados (Nogueira & dos Santos, 2015).

O ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA) também pode ser utilizado para classificar o tipo de infecção em primária ou secundária, de acordo com os títulos obtidos no teste e foi desenvolvido em substituição ao teste de IH (Miagostovich et al, 1999). Anticorpos IgG são produzidos, em uma resposta primária, alguns dias após o IgM, em geral, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença, aumentando

lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecendo detectáveis por toda a vida (Innis et al., 1989; Miagostovich et al., 1999).

O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) é considerado ‘padrão ouro’ e a ferramenta mais específica para a determinação de imunidade sorotipo específica aos DENV (Calisher et al., 1989), sendo o teste recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para os estudos de eficácia das vacinas em desenvolvimento (Hombach & Barrett, 2008). No entanto, diante das características laboriosas desses testes, atualmente, na grande maioria dos casos, sua utilização está restrita a poucos laboratórios.

A proteína NS1 é uma glicoproteína com cerca de 50 kDa ausente na partícula viral, porém é produzida em duas formas: associada às membranas e secretada, estando presente no soro de indivíduos infectados desde o primeiro dia do aparecimento dos sintomas (Young et al., 2000; Alcon et al., 2002; Libraty et al., 2002). Aproveitando-se dessas características, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica deste antígeno foram desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Dussart et al., 2006; Kumarasamy et al., 2007; Lapphra et al., 2008; Phuong et al., 2009; Lima et al., 2010; 2011; 2014). A detecção de antígeno NS1 pode ser realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) ou por testes imunocromatográficos rápidos, disponíveis comercialmente. No Brasil, o Ministério da Saúde disponibiliza kits de teste NS1 ELISA para triagem das amostras para isolamento viral em unidades sentinelas (SVS/MS, 2010).

1.7.4 Métodos moleculares para a detecção do genoma dos DENV

De uma forma geral, antecedendo à utilização de métodos moleculares para a detecção de genomas virais, deve-se proceder a extração do ácido nucleico do vírus das amostras biológicas e, a extração e purificação destes, são etapas importantes na eficácia da detecção molecular. O protocolo descrito por Boom et al., (1990), amplamente utilizado para a extração de DNA ou RNA de amostras de sangue ou urina, utiliza sílica e pode ser realizado manualmente ou de forma automatizada (de Bruycker-Nogueira, 2015). Contudo, atualmente, diversos kits comerciais para extração dos ácidos nucleicos baseados em extração orgânica, sílica, separação magnética ou de troca iônica, encontram-se disponíveis.

1.7.4.1 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada na amplificação enzimática *in vitro* de sequências específicas de DNA direcionada por iniciadores (*primers*), que resulta na geração de um número exponencial de cópias. A técnica consiste em ciclos repetidos de desnaturação do ácido nucleico, hibridização dos *primers* no alvo e síntese da cadeia por uma enzima DNA polimerase, em temperaturas específicas (de Bruycker-Nogueira, 2015).

Diversos protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) importantes por identificar o sorotipo infectante, têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções pelos DENV, sendo úteis tanto para a clínica quanto para a vigilância virológica (Lanciotti et al., 1992; Brown et al., 1996; Harris et al., 1998; De Paula et al., 2002).

O protocolo mais utilizado é o descrito por Lanciotti et al. (1992), sugerido pela OPAS, detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento “*semi-nested*”, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV. Em uma primeira etapa, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as sequências dos genes C e prM. No procedimento *nested*, são utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente. Os produtos obtidos após a amplificação por RT-PCR são submetidos à eletroforese, em gel de agarose, para a diferenciação, pelo peso molecular, permitindo a visualização, através de moléculas intercalantes de DNA, como o brometo de etídeo, revelados em luz ultravioleta (Guzman et al., 2004; De Paula et al., 2002; Chua et al., 2011).

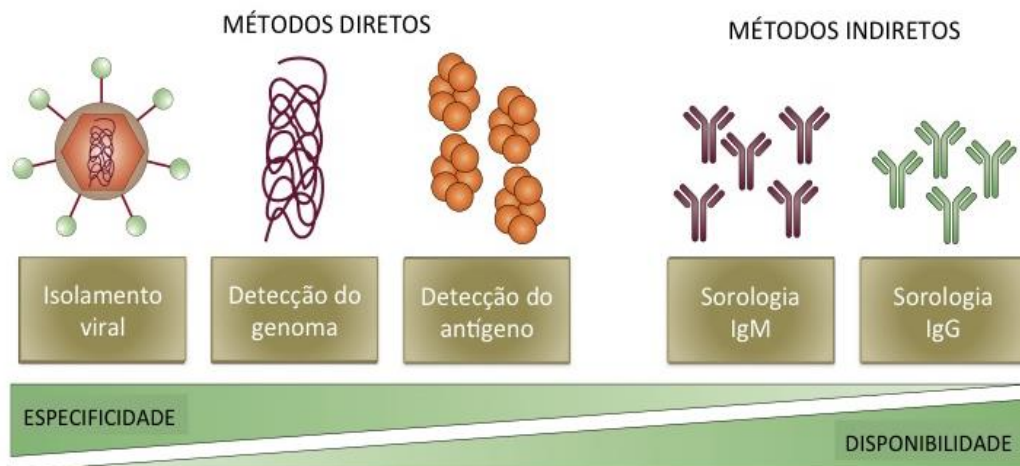
Além dos métodos de diagnóstico utilizados na rotina, métodos moleculares como a PCR seguido a sequenciamento genômico viral são de grande importância para a vigilância dos sorotipos e/ou genótipos de DENV circulantes em uma dada região. Para a caracterização molecular e genotipagem dos sorotipos circulantes de DENV, utiliza-se o sequenciamento parcial (gene E) ou completo, com o uso de *primers* que amplificam o genoma dos DENV (Miagostovich et al., 2006).

1.7.4.2 RT-PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real permite que a detecção dos fragmentos amplificados de forma simultânea à reação de amplificação e, o monitoramento da presença do amplicon em tempo real seja possível graças à marcação de sondas, iniciadores ou do próprio produto de PCR com moléculas fluorogênicas (Mackay et al., 2002). A técnica possibilita também a quantificação do genoma e, portanto, a determinação da carga viral, em uma ampla faixa de concentração (Niesters, 2002). Diversos protocolos utilizando essa abordagem para o diagnóstico ou para a quantificação do RNA dos DENV já foram descritos (Callahan et al., 2001; Drosten et al., 2002; Ito et al., 2004; Johnson et al., 2005; Kong et al., 2006; Lai et al., 2007; Gurukumar et al., 2009; Pok et al., 2010; Hue et al., 2011; Waggoner et al., 2013).

Nem sempre os métodos diretos de detecção, como o isolamento viral, detecção do genoma e do antígeno, que são mais específicos (Figura 9), são os mais disponíveis para o diagnóstico das infecções por DENV (Peeling et al., 2010).

Figura 9 - Comparação entre a disponibilidade e especificidade dos métodos diretos e indiretos para o diagnóstico das infecções por dengue.



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

1.8 EPIDEMIOLOGIA

1.8.1 Dengue nas Américas

Nas Américas, inúmeras epidemias em intervalos irregulares foram registradas a partir de 1896, nos Estados Unidos e em países do Caribe, sem conhecimento dos sorotipos envolvidos. No final do século XIX e início do século XX, uma ampla distribuição de doença semelhante a dengue foi descrita, incluindo países do norte, como os Estados Unidos e até do sul, como Chile e Argentina. Entre 1941 e 1946 a doença continuou a dispersar, com surtos no Texas nos Estados Unidos, Panamá, Cuba, Porto Rico, Venezuela, Bermudas, Bahamas e Sonora e México (Brathwaite et al., 2012). Um programa de erradicação do *Ae. aegypti* iniciado pela OPAS nas décadas de 1940 e 1950 para prevenir epidemias urbanas de febre amarela resultou na diminuição significativa das epidemias de dengue nas Américas. No entanto, a descontinuação do programa no início da década de 1970 e a falta de eliminação do vetor em algumas regiões resultaram em reinfestação do vetor nas décadas subsequentes (Gubler, 1997).

Em 1953 foram isoladas as primeiras amostras de DENV-2 e, dez anos depois, as primeiras amostras de DENV-3 em Porto Rico. Em 1977, o DENV-1 foi introduzido nas Américas e, nos anos seguintes, este mesmo sorotipo foi isolado nos EUA (Gubler, 1992). Em 1981, o DENV-4 foi introduzido no continente, houve a expansão da área de transmissão da doença e o aumento do número de casos notificados. Naquele mesmo ano, ocorreu em Cuba, a primeira epidemia de febre hemorrágica do dengue/ síndrome do choque por dengue (FHD/SCD) das Américas, causada pelo DENV-2 (Kouri et al, 1986). Em 1994, ocorreu a reintrodução do DENV-3 na Nicarágua, tendo este sorotipo sido isolado nos anos seguintes, em todos os países da América Central (Guzman et al, 1996).

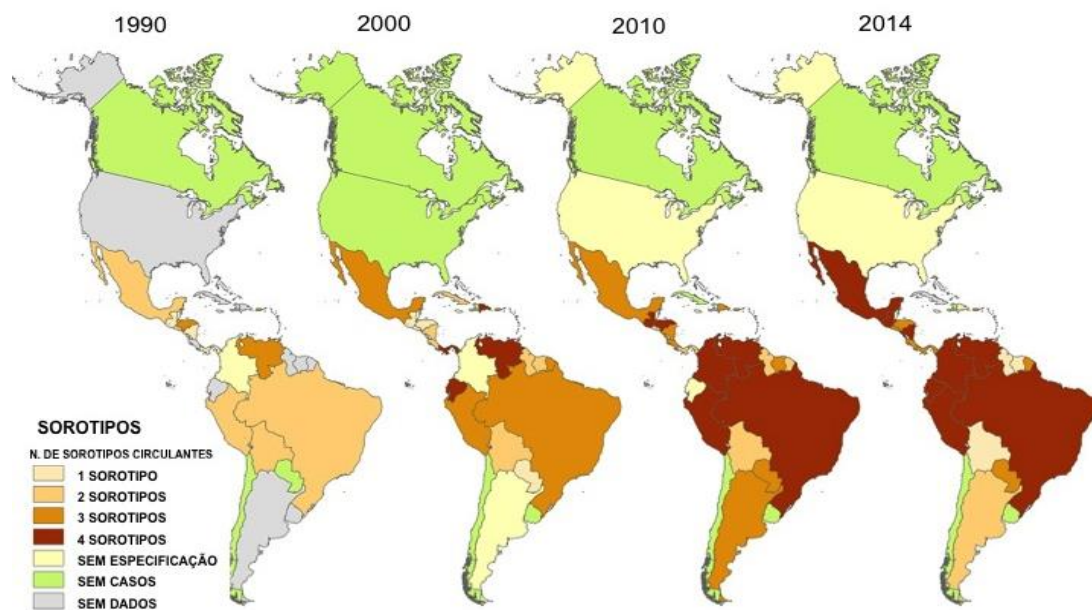
Entre 2000 e 2007, todos os sorotipos virais foram identificados simultaneamente em Barbados, Colômbia, República Dominicana, El Salvador, Guatemala, Guiana Francesa, México, Peru, Porto Rico e Venezuela. Neste período, os países do Cone Sul (Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai) notificaram 64,6% (2.798.601) de todos os casos registrados nas Américas, sendo o Brasil responsável pela notificação de 98,5% deste total (San Martin, et al, 2010).

Em 2014, foram notificados nas Américas um total de 1.176.529 casos de dengue, 16.238 casos de dengue grave e 761 óbitos. Até a 41ª semana epidemiológica de 2015 (06/11/2015), um total de 2.007.421 casos de dengue, 7.444 casos de dengue grave e 1.007

óbitos foram notificados nas Américas, sendo 1.523.858 casos e 764 óbitos registrados somente no cone sul (PAHO, http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en, acesso em 09/11/15).

Atualmente, ocorre a circulação dos quatro sorotipos do DENV em vários países da América do Sul e Caribe e, o continente americano evoluiu de uma situação não endêmica para hiperendêmica, onde se observou um aumento na densidade vetorial, na co-circulação de múltiplos sorotipos e na ocorrência de casos graves,(Figura 10).

Figura 10 - Distribuição dos sorotipos de dengue nas Américas, 1990-2014.



Fonte: Adaptado de PAHO (disponível em http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3273&Itemid=40734&lang=en, acesso em 09/11/2015).

1.9 DENGUE NO BRASIL

Em 1981 ocorreu um surto de dengue na cidade de Boa Vista, Roraima, onde o DENV-1 e DENV-4 foram isolados, e um total de sete mil casos da doença foram notificados (Osanaí et al., 1983). Porém, foi após a introdução do DENV-1 no estado do Rio de Janeiro em 1986 que a atividade dos DENV cresceu de modo significativo no Brasil (Schatzmayer et al., 1986). A grande circulação de pessoas naquela região resultou na rápida dispersão do vírus, causando uma epidemia com 92 mil casos nos anos de 1986-1987 (Nogueira et al., 1999).

O DENV-2 foi isolado na cidade de Niterói, região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro no ano de 1990, e a situação do dengue no país se agravou, sendo notificados os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira et al., 1990). Em 1995-1996, uma nova epidemia foi registrada no Estado do Rio de Janeiro, sendo DENV-1 e DENV-2, os sorotipos isolados (Nogueira et al, 1999).

A introdução do DENV-3 em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro no final de 2000 (Nogueira et al, 2000) resultou em 2002, na co-circulação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) e na maior e mais grave epidemia do país registrada até então (Nogueira et al, 2002; De Simone et al, 2004).

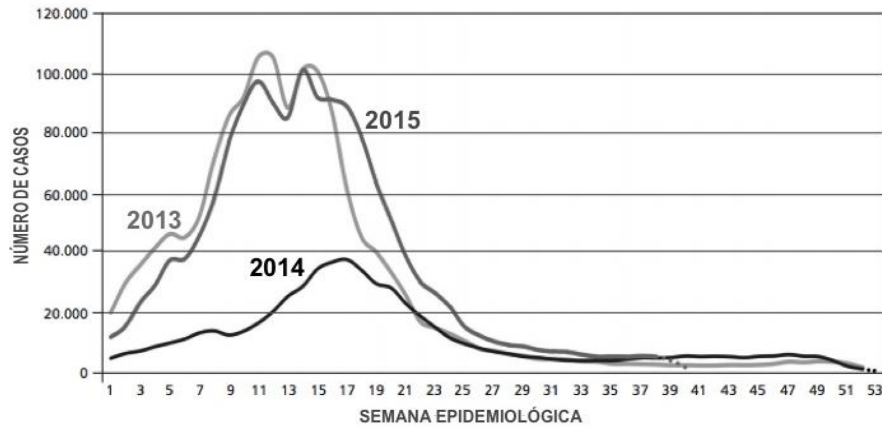
Entre 2002 e 2007, o DENV-3 foi o sorotipo predominante no país, porém, em 2007, o DENV-2 reemergiu, resultando em uma extensa epidemia em 2008, com 657.818 casos notificados, 4.455 casos de FHD e 259 óbitos (SVS/MS, 2008). Esta epidemia foi caracterizada por um aumento significativo no número de casos graves em menores de 15 anos, representando cerca de 50% dos casos e 86% dos óbitos registrados (Teixeira et al., 2009).

Em 2009 foram notificados 417.028 casos de dengue, 10.418 casos de dengue grave e 341 óbitos (SVS/MS, 2009). Neste mesmo ano, o DENV-1 reemergiu e causou em 2010 uma epidemia explosiva, com 1.029.678 casos de dengue registrados, 17.474 casos graves e 656 óbitos. Naquele ano, os estados de Minas Gerais e São Paulo contribuíram com cerca de 90% do total dos casos (SVS/MS, 2010). Uma característica desta epidemia consistiu na ocorrência de óbitos em pacientes que apresentavam como morbidades e uma maior hospitalização em maiores de 60 anos de idade (Siqueira Júnior, et al 2011).

Em julho de 2010, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima, cerca de 30 anos após a primeira detecção deste sorotipo no país e os primeiros casos decorrentes da dispersão deste sorotipo foram detectados somente a partir de janeiro de 2011 no Amazonas e Pará. Em março, o vírus foi detectado no Piauí, Pernambuco, Bahia, Ceará Rio de Janeiro e São Paulo (Temporão et al, 2011; SVS/MS, 2011). Naquele ano, um total de 775.060 casos de dengue, 10.546 casos graves e 482 casos fatais foram notificados. Em 2012 foram notificados 594.343 casos da doença e 327 óbitos, no entanto, em 2013, um aumento no número de notificações aumentou expressivamente e 1.452.489 de casos de dengue foram registrados (SVS/MS, 2013).

No ano de 2014, uma redução nas notificações foi observada (589.107 casos e 433 óbitos), no entanto até a 40ª semana epidemiológica de 2015, 1.485.397 casos de dengue e 761 óbitos, o que representa um aumento de 76% em comparação ao mesmo período de 2014, foram registrados (Figura 11).

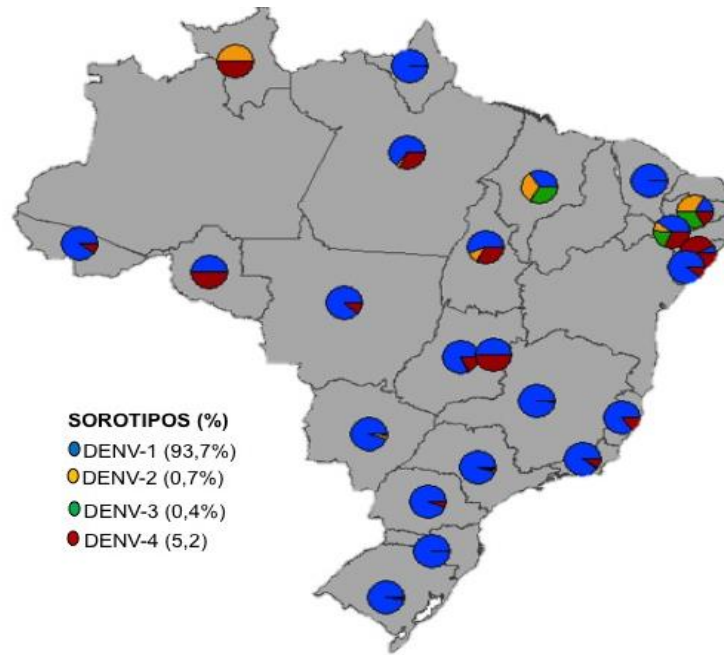
Figura 11 - Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2013 a 2015.



Fonte: Adaptado de SVS/MS, 2015.

Em 2015, a região Sudeste do país registrou o maior número de casos (950.144 casos; 64,0%) em relação ao total do país e, 93,7% dos casos foram causados pelo DENV-1 (SVS/MS, 2014; 2015), Figura 12.

Figura 12 - Distribuição dos sorotipos de dengue no Brasil, 2015.

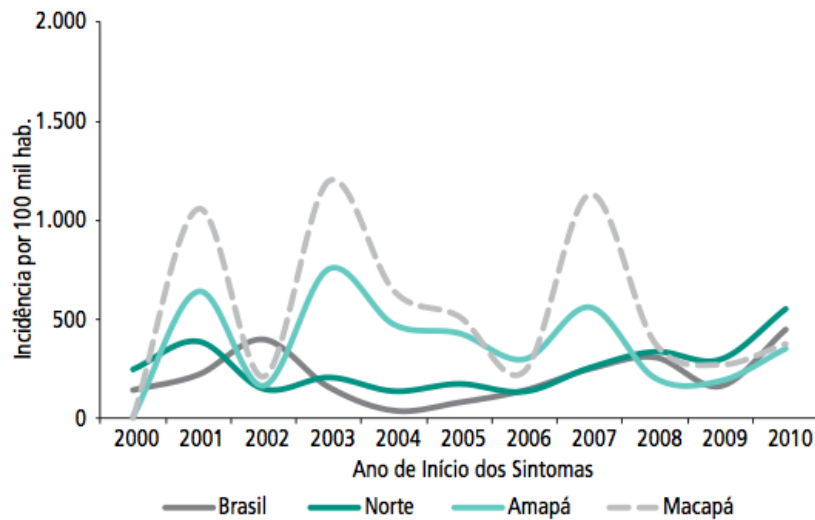


Fonte: Adaptado de SVS/MS, 2015.

1.10 DENGUE NO ESTADO DO AMAPÁ

A incidência de dengue no estado do Amapá e no município de Macapá, no período de 2000 a 2010, apresentou um padrão observado na região Norte e no Brasil, com os ciclos de alta transmissão influenciados pela predominância de diferentes sorotipos: DENV-3 entre os anos de 2001 a 2006 e DENV-2 entre os anos de 2007 a 2009 (Figura 13). O ano de 2010 foi marcado pelo predomínio do DENV-1 e uma incidência de 384,7 casos por 100 mil habitantes na capital Macapá (Brasil, 2011).

Figura 13 - Incidência de casos prováveis de dengue, Brasil, região norte, Amapá e Macapá, 2000 a 2010.

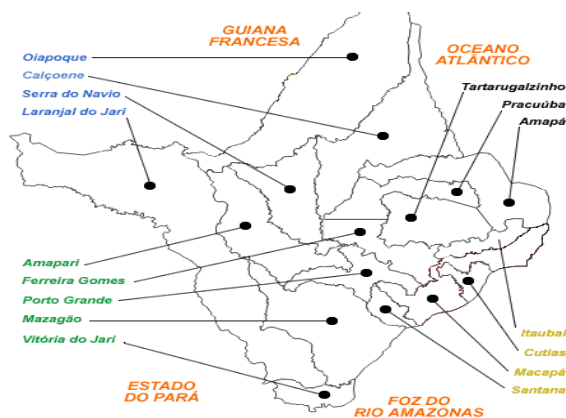


Fonte: Adaptado de Brasil, 2011.

Em 2013, foram confirmados 1.213 casos de dengue e 2 casos de dengue grave, apresentando o Estado um aumento do número de casos notificados e confirmados, quando comparado ao mesmo período de 2012. Os municípios de Macapá, Oiapoque, Porto Grande e Pedra Branca do Amapari foram os que mais notificaram casos da doença. Dentre estes, os municípios de Macapá e Oiapoque foram responsáveis por 41,3% e 25% das notificações, respectivamente (SES/AP, 2013).

Em 2014 foram notificados 1.421 casos de dengue, 2 casos de dengue grave e 1 óbito no Amapá, distribuídos na maioria dos municípios do estado (SVS, 2014), Figura 14.

Figura 14 - Municípios com notificação de casos de dengue no estado do Amapá, 2014.



Fonte: SVS/MS, 2014

Segundo a Coordenadoria de Vigilância em Saúde (CVS), os casos de dengue no Amapá dobraram em 2015. De janeiro a maio de 2015, foram 2.172 casos confirmados da doença. Os municípios de Macapá, Oiapoque e Santana foram os que apresentaram o maior número de notificações da doença. Na capital Macapá, foram registrados 771 casos confirmados nos primeiros cinco meses de 2015. Em Santana, 272 casos foram notificados. De acordo com a CVS, o estado do Amapá encontra-se na classificação de "alta incidência" de acordo com o Ministério da Saúde. Até a 40ª semana epidemiológica, já foram notificados 2.892 casos de dengue no estado (SVS/MS, 2015).

1.11 CONTROLE E PREVENÇÃO

O controle e prevenção da dengue se baseia em três aspectos fundamentais que consistem na vigilância epidemiológica para um bom planejamento e resposta, redução da doença e mudança de conduta para melhorar o controle do vetor. Apesar disso, o controle da doença tem se tornado um grande problema em países endêmicos, que ainda possuem um programa insuficiente baseado em controle vetorial e programas comunitários para manter o ambiente livre de potenciais criadouros (Machado et al., 2009; Gubler et al., 2011). Estes programas combinam métodos de melhoramento ambiental e métodos químicos, como administração de larvicidas e “*sprays*” ambientais adulticidas (OMS, 2009; Guzman et al., 2010).

Em 1996, o Ministério da Saúde propôs o Programa de Erradicação do *A. aegypti* (PEAa) que possuía como objetivo principal a redução de sua infestação, a incidência da doença e a letalidade por FHD. Entretanto, a introdução de um novo sorotipo, DENV-3, e a re-emergência de DENV-2 no país, com rápida disseminação, levaram à circulação de novos sorotipos e genótipos virais. Neste cenário epidemiológico, o Ministério da Saúde apresentou em 2002 o Programa Nacional de Controle de Dengue (PNCD), para a intensificação e implantação de medidas de controle, visando à redução do impacto do dengue no país (FUNASA, 2002).

A Organização Mundial da Saúde considera como prioritário o desenvolvimento de demonstrou a prioridade de desenvolver uma vacina contra o DENV, porém o desenvolvimento tem enfrentado algumas dificuldades, tais como a necessidade de imunizar contra os quatro sorotipos com alta eficiência para evitar o desencadeamento de uma doença grave em caso de infecção secundária e a ausência de um modelo experimental para estudar a resposta pós-

vacinal. Uma vacina ideal deve promover uma imunização prolongada contra os quatro sorotipos do DENV; ser de baixo custo e toxicidade e manter títulos virais sob refrigeração ou à temperatura ambiente (Figueiredo et al, 1999).

Diversas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina eficaz estão sendo utilizadas como as vacinas de vírus vivo atenuado, de vírus inativados vacinas recombinantes, quiméricas e de DNA. Atualmente as vacinas desenvolvidas e em fase experimental utilizando vírus vivo atenuado são as da GlaxoSmithKline (GSK), em fase II; Biological E, Panacea, em fase I/II; Biotec, Butantan, em fase I/II; e Vabiotech, fase I/II. Já as vacinas contendo vírus vivo quimérico são as da Sanofi Pasteur, em fase III e Inviragen, em fase I (Murrel et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

As arboviroses constituem um importante problema de saúde pública em todo o mundo e, na última década, grandes epidemias por arbovírus emergentes e reemergentes foram reportadas na Ásia, Europa, África e Américas. O Brasil com dimensões continentais apresenta condições ideais para a circulação destes vírus e grande maioria dos relatos desta circulação e isolamento destes é concentrada na Região Norte do país.

A dispersão dos DENV pelo território brasileiro, com um aumento nas notificações de casos de dengue, dengue grave e óbitos ressalta a importância da vigilância destes agentes em todas as regiões do país. O monitoramento dos sorotipos de DENV em uma região é extremamente importante, tanto durante os períodos epidêmicos como endêmicos, uma vez que o conhecimento dos vírus associados às epidemias poderá ajudar a prever a gravidade de surtos futuros. Dadas às limitadas opções de prevenção e controle das epidemias, ficou demonstrado que o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental no Sistema de Vigilância Epidemiológica, através do monitoramento contínuo das infecções, confirmando novos casos e identificando os sorotipos circulantes. Adicionalmente, é de relevância para o diagnóstico diferencial com outros arbovírus, uma vez que muitos dos sinais e sintomas de dengue e outras arboviroses são compartilhados.

O diagnóstico laboratorial clássico do dengue tem sido realizado por isolamento viral e a sorologia. Entretanto, em virtude da complexidade antigênica deste e outros arbovírus, a intensidade das reações cruzadas observada entre espécies diferentes de um mesmo grupo, e ainda as particularidades das respostas imunológicas a estes vírus, é difícil em muitos casos, discernir e interpretar os resultados obtidos pelos métodos sorológicos. Uma abordagem viável e mais específica para o diagnóstico do dengue consiste na detecção de ácidos nucleicos virais que pode ser aplicado na pesquisa de qualquer vírus.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um procedimento operacional padrão para a implantação de método molecular para o diagnóstico laboratorial de dengue em apoio à vigilância epidemiológica da doença no país e investigar os casos febris suspeitos ocorridos no estado do Amapá.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Realizar treinamento na técnica de RT-PCR convencional no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue;
- Estabelecer um procedimento operacional padrão para implantação da RT-PCR convencional no LACEN/AP;
- Descrever os aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais de casos febris suspeitos de dengue recebidos sob demanda espontânea no LACEN/AP entre janeiro de 2014 a março de 2015;
- Aplicar a técnica de RT-PCR à investigação de casos febris suspeitos de dengue recebidos sob demanda espontânea no LACEN/AP e triados para dengue.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ELABORAÇÃO DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR CONVENCIONAL

O POP foi elaborado seguindo o modelo padronizado pelo Sistema de Gestão da Qualidade do LACEN-AP. A técnica de RT-PCR convencional é composta por duas etapas principais - extração de RNA viral da amostra biológica e reação de amplificação genômica para identificação do sorotipo viral e foi descrita de acordo com o treinamento recebido no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro de Referência Regional para Dengue (Anexo I).

4.2 INVESTIGAÇÃO DOS CASOS FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ

4.2.1 Considerações éticas

As amostras utilizadas neste estudo provêm da demanda espontânea do Laboratório Central do Amapá (LACEN –AP). O estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa número 720.338 da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde sob a Resolução CNS 466/12, Anexo II.

4.2.2 Desenho de estudo

Este estudo é do tipo analítico, observacional e transversal. O estado do Amapá, situado na região Norte tem como capital a cidade de Macapá, com 669.526 habitantes distribuídos em uma área de 142.827,897 km² e é composto por 16 municípios, sendo Macapá e Santana, os mais populosos. A incidência de dengue no estado do Amapá e do município de Macapá, no período de 2000 a 2010, apresentou um padrão observado na região Norte e no Brasil, com os ciclos de alta transmissão influenciados pela predominância de diferentes sorotipos (Brasil, 2011).

4.2.3 Amostragem e banco de dados

Foram analisados casos suspeitos de dengue ocorridos no estado do Amapá no período de janeiro de 2014 à março de 2015. As amostras de soro foram provenientes dos hospitais, postos de saúde que fazem parte da rede sentinela do estado e de pacientes recebidos por demanda espontânea no LACEN – AP.

Para a investigação do sorotipo viral por método molecular (RT-PCR), foram selecionadas, amostras confirmadas ($n=100$) pelas metodologias de diagnóstico de rotina realizadas no LACEN/AP (MAC-ELISA e/ou NS1 ELISA) até 12 dias após o início dos sintomas e com fichas de notificações completas.

As amostras recebidas foram acompanhadas por fichas epidemiológicas contendo identificação e dados referentes à coleta, observações clínicas do caso, entre outros dados relevantes para o seu processamento. Todas as informações disponíveis na ficha epidemiológica, assim como todos os resultados obtidos pela realização dos testes de diagnóstico foram inseridos em Banco de Dados do Programa Microsoft Access. A coleta de sangue foi realizada por punção venosa através do sistema a vácuo ou seringa, em tubos sem anticoagulante com o intuito de obter o soro após centrifugação de 1000rpm por 20 minutos.

4.2.4 Estocagem e conservação das amostras biológicas

As amostras de soro dos casos estudados foram enviadas ao LABFLA, IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, sob refrigeração, após todas as coletas serem realizadas. Os soros foram mantidos à -70°C ou a -20°C , dependendo da metodologia para a qual eram destinados. A partir das informações fornecidas pela ficha epidemiológica, as amostras foram aliquotadas em tubos diferenciados em cabines de segurança para o devido congelamento até serem processadas.

4.2.5 Triagem dos casos suspeitos de dengue por métodos sorológicos

A data da coleta foi considerada para a eleição do método diagnóstico apropriado, discriminando a fase aguda da doença para a detecção viral (até 7 dias) e fase convalescente para a sorologia (após 7 dias).

4.2.6 Determinação de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)

A captura dos anticorpos da classe IgM foi realizada de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante do kit Panbio dengue IgM Capture ELISA (Brisbane, Austrália). O anticorpo IgM anti-DENV pode aparecer precocemente antes do quinto dia, porém os maiores percentuais de positividade são alcançados após 5 dias do início dos sintomas, permanecendo até 30 a 60 dias.

4.2.7 Teste de captura de antígeno NS1

Para a captura de antígeno NS1 foi utilizado o teste de ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, França), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.2.8 Extração do RNA viral e transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR)

A extração do RNA viral das amostras de soro foi realizada utilizando-se o QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Brevemente, 140 µl de soro foi tratado sob condições de desnaturação para inativar RNAses e assegurar o isolamento de RNA viral intacto e em seguida carregado em coluna de purificação. Após a ligação do RNA à membrana de sílica-gel, os contaminantes foram removidos através de duas lavagens por dois tampões de lavagem diferentes. O RNA foi eluído da coluna com uma solução aquosa livre de RNase, para posterior armazenagem a - 70 °C, até o momento do uso.

Para a geração do cDNA e amplificação genômica para a detecção e tipagem dos DENV, foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et al. (1992). Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento semi-nested, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos em pares de base (pb) para cada sorotipo dos DENV. Em uma primeira etapa, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes C e prM e os reagentes No procedimento semi-nested, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue.

Oligonucleotídeo iniciador* (Sentido)	Sequência	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (em pares de base [pb])
D1 (+)	5'- TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG- 3'	134-161	} 511
D2 (-)	5'- TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC- 3'	616-644	
TS1 (-)	5'- CGTCTCAGTGATCCGGGGG- 3'	568-586	482 (D1 + TS1)
TS2 (-)	5'- CGCCACAAGGGCCATGAACAG- 3'	232-252	119 (D1 + TS2)
TS3 (-)	5'- TAACATCATCATGAGACAGAGC- 3'	400-421	290 (D1 + TS3)
TS4 (-)	5'- CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA - 3'	506-527	392 (D1 + TS4)

*Invitrogen, California, EUA

O RNA extraído foi transcrito reversamente em cDNA (42°C/60 minutos) em uma primeira etapa e as condições de termociclagem para a amplificação do DNA consistiram de 30 ciclos subsequentes de desnaturação (94°C/35 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e um ciclo de extensão final (72°C/10 minutos), utilizando os reagentes da Tabela 3.

Em uma segunda etapa (etapa semi-nested) para a tipagem dos DENV, os produtos obtidos na primeira etapa foram diluídos (1/100) em água livre de DNase e RNase (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water – Invitrogen, California, EUA) e submetidos a 18 ciclos de desnaturação (94°C/30 segundos), anelamento (56°C/1 minuto), extensão (72°C/2 minutos) e extensão final (72°C/5 minutos), utilizando os reagentes da Tabela 3. Após a semi-nested PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% acrescido de 5µL de solução de brometo de etídeo 10 mg/mL (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) por 60 minutos e visualizados em luz ultravioleta em captador de imagem Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA).

Tabela 3 - Reagentes utilizados na transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

Reagentes	Mistura para RT- PCR (1X)	Mistura para Semi-nested (1X)
Água livre de Nucleases	2,45 µL	1,85 µL
PCR Master Mix Promega	6,25 µL	12,5 µL
0,1 M Dithiothreitol (DTT)*	0,62 µL	-----
10 µM iniciador D1*	0,32 µL	0,65 µL
10 µM iniciador D2*	0,32 µL	-----
20 µM iniciadores TS1-4*	-----	1,25 µL
2,5 U/ µl enzima AMV- RT*	0,025 µL	-----

* Invitrogen, California, EUA

4.2.9 Infraestrutura disponível

O Laboratório de Flavivírus IOC/ FIOCRUZ, Rio de Janeiro, estabelecido desde 1986, como Centro de Referência Regional de Dengue e Febre Amarela dispõe da infraestrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do estudo proposto e atua dentro das normas de Qualidade e Biossegurança. O LACEN-AP, situado na cidade do Macapá é responsável pela investigação de diversos agravos e possui infraestrutura estabelecida e apoio técnico para a realização dos testes sorológicos na investigação de casos suspeitos.

4.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa BioEstat versão 5.0 pelos testes estatísticos não paramétricos de Qui-Quadrado e McNemar.

5 RESULTADOS

5.1 ELABORAÇÃO DO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR CONVENCIONAL NO LACEN/AP DE ACORDO COM O PROTOCOLO DE LANCIOTTI ET AL. (1992).

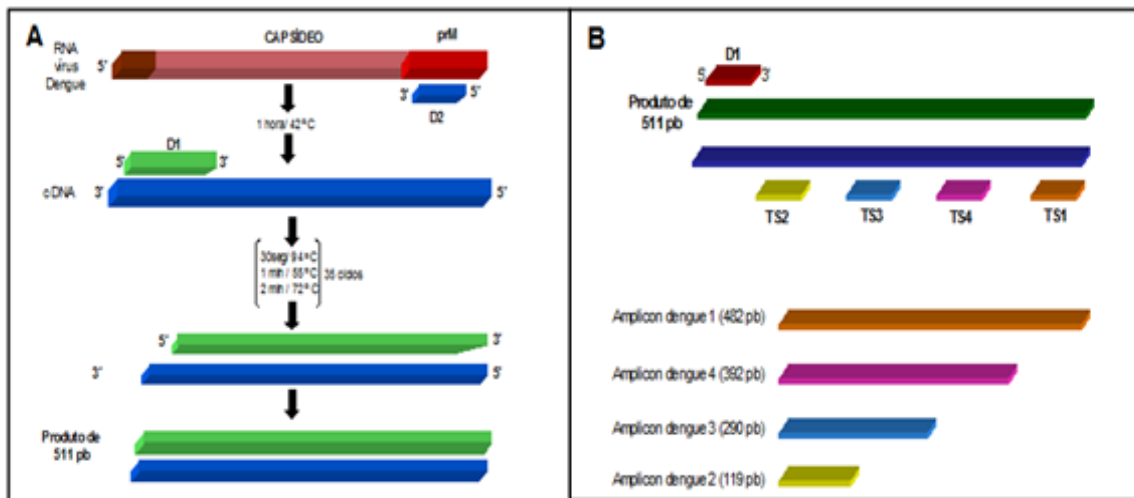
Os modelos de POP adotados no laboratório Central de Saúde Pública do Amapá-LACEN, são baseados na ABNT NBR ISO 9001-2008.

Os documentos de descrição de metodologia são imprescindíveis nas instituições pois garantem que todas as técnicas sejam executadas de forma uniforme por diferentes operadores. Estabelece as sequências, frequência e requisitos para a realização dos ensaios com confiabilidade e qualidade dos exames (Anexo I).

O POP tem o objetivo de se padronizar e minimizar a ocorrência de desvios na execução de tarefas fundamentais, para o correto funcionamento do processo. Ou seja, um POP coerente garante ao usuário que a qualquer momento que ele se dirija ao estabelecimento, as ações tomadas para garantir a qualidade sejam as mesmas, de um turno para outro, de um dia para outro, ou seja, aumentando a previsibilidade de seus resultados, minimizando as variações causadas por imperícia e adaptações aleatórias, independente de falta, ausência parcial ou férias do executor.

Neste trabalho foram desenvolvidos os POP de extração de RNA viral e amplificação genômica para identificação do sorotipo de DENV por RT-PCR de acordo com o protocolo de Lanciotti et al (1992). Tal metodologia baseia-se na técnica de Semi-Nested PCR, que permite em uma primeira etapa a detecção de uma região gênica comum aos quatro sorotipos do vírus. Na segunda etapa da PCR são utilizados *primers* específicos para cada sorotipo viral, garantindo desta forma, maior especificidade do teste como esquematizado na Figura 15.

Figura 15 - Estratégia de amplificação do RNA viral dos vírus dengue (DENV) pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), de acordo com protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992). A: Transcrição reversa e amplificação do RNA viral utilizando iniciadores consensuais. B: Tipagem dos vírus dengue (semi-nested PCR) utilizando iniciadores tipo-específicos.



Fonte: Adaptado de Lanciotti et al., 1992.

5.2 INVESTIGAÇÃO DOS CASOS FEBRIS SUSPEITOS DE DENGUE OCORRIDOS NO AMAPÁ

5.2.1 Descrição dos aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais

Entre o período de janeiro de 2014 a março de 2015, um total de 3.974 casos suspeitos de dengue foram notificados no estado do Amapá. Destes, 41,8% (1.662/3.974) foram confirmados. Uma maior notificação foi registrada no município de Macapá, seguido dos municípios de Oiapoque, Laranjal do Jari, Mazagão, Calçoene, Santana, Porto Grande e Pedra Branca. No entanto, um maior percentual de confirmação de casos foi observado em Laranjal do Jari (53,3%; 505/948), Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos casos notificados e confirmados de infecção por dengue, por município de ocorrência, janeiro de 2014 a março de 2015.

MUNICÍPIOS	CONFIRMADOS/NOTIFICADOS	%
Amapá	1/6	16,6
Calçoene	46/318	14,4
Cutias	0/3	-
Ferreira Gomes	14/47	29,7
Itaubal	-	-
Laranjal Do Jari	505/948*	53,3
Macapá	546/1.139*	47,9
Mazagão	109/319*	34,1
Oiapoque	277/978*	28,3
Pedra Branca	58/178	32,6
Porto Grande	1/240	0,4
Pracuuba	0/1	-
Santana	104/312*	33,3
Serra do Navio	1/45	2,22
Tartarugalzinho	0/36	-
Vitória do Jari	0/4	-
TOTAL	1.662/3.974	41,8

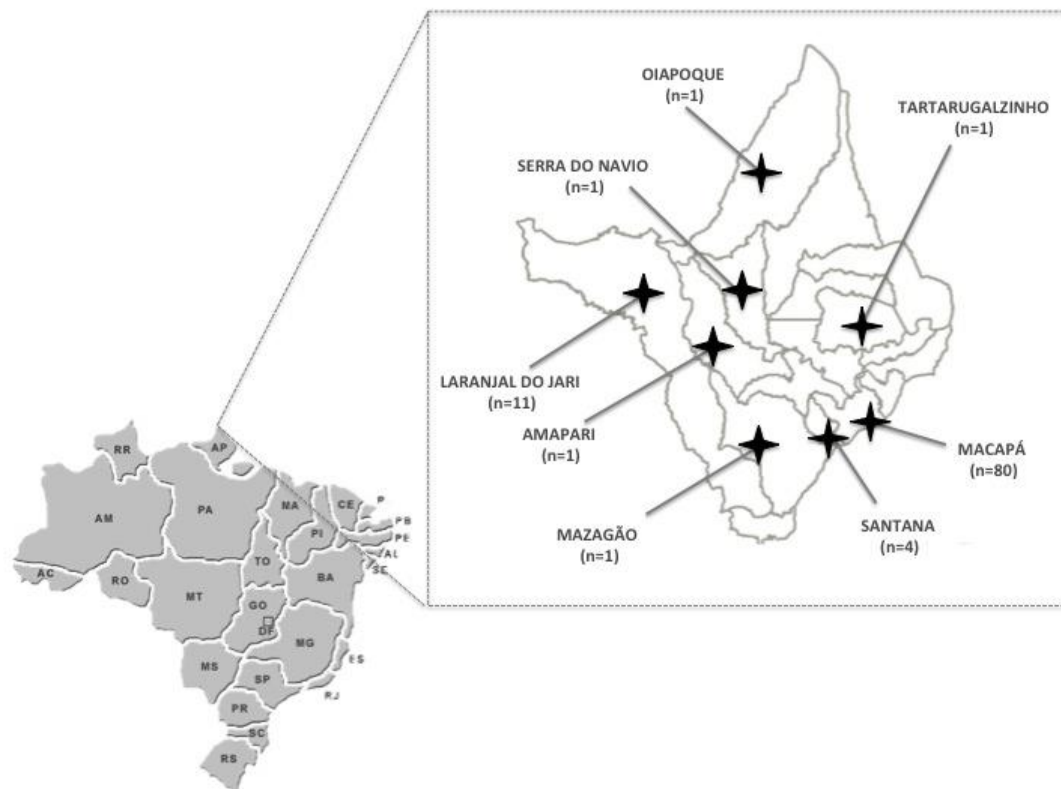
Um total de 2.408 casos febris suspeitos de infecção por dengue foi recebido no LACEN/AP no período de estudo. Os casos foram submetidos ao diagnóstico laboratorial sorológico de rotina (MAC-ELISA e NS1 ELISA) e, 89,3% (2.151/2.408) foram confirmados. Deste total, 79,6% (1.918/2.408) foram confirmados por MAC-ELISA e 9,7% (233/2.408) por NS1 ELISA.

Após a capacitação na técnica de RT-PCR convencional no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ e confecção do respectivo POP, procedeu-se a investigação de casos confirmados.

Visando identificar o sorotipo infectante responsável pelos casos de dengue ocorridos no Amapá, no período estudado, pela técnica a ser implementada no LACEN/AP, casos confirmados foram selecionados aleatoriamente. Foram analisadas amostras agudas ($n=100$, até 7 dias após o início dos sintomas, com exceção de uma com 10 dias e uma com 12 dias), confirmadas como dengue no LACEN/AP por MAC-ELISA e/ou NS1 ELISA, no período de Janeiro de 2014 a Março de 2015. O maior número de casos desta casuística ($n=80$), foi

proveniente do município de Macapá, seguido de Laranjal do Jari ($n=11$) e Santana ($n=4$), Figura 16.

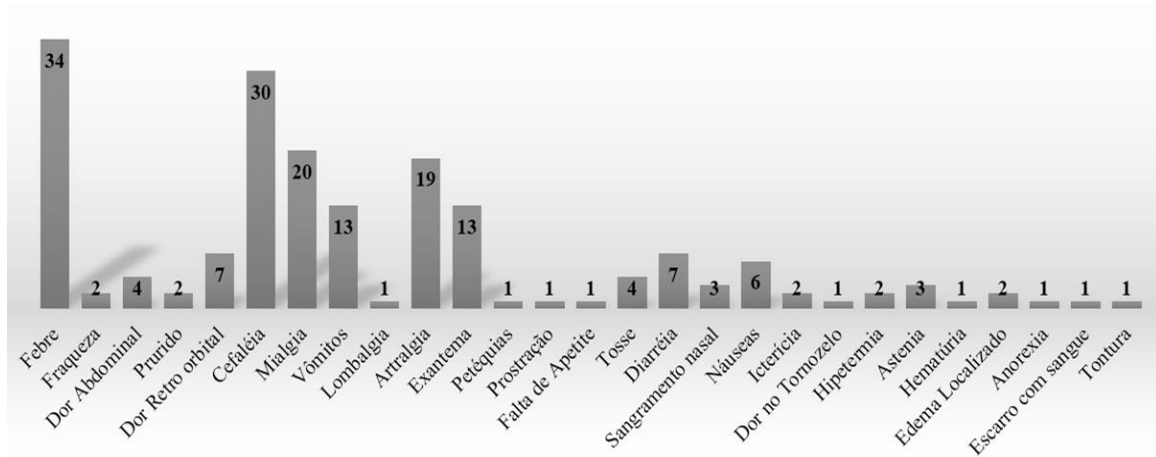
Figura 16 - Distribuição dos casos estudados ($n=100$), confirmados por MAC-ELISA e/ou NS1 ELISA, de acordo os municípios do estado do Amapá, no período de janeiro de 2014 a março de 2015, para investigação do sorotipo infectante.



Fonte: Flávia Barreto dos Santos (2015)

A frequência das manifestações clínicas observadas nos casos confirmados ($n=100$) ocorridos de janeiro de 2014 a março de 2015, foi caracterizada. Os sinais e sintomas mais frequentemente observados foram febre, cefaléia, mialgia, vômitos, artralgia e exantema, Figura 17. Não foram reportados nesta casuística, a ocorrência de hemorragias e óbito.

Figura 17 - Frequência das manifestações clínicas observadas em casos confirmados de dengue ($n=100$) ocorridos no Amapá, de janeiro de 2014 a março de 2015.



A análise da distribuição da faixa etária dos pacientes infectados pelos DENV demonstrou que a média de idade foi de 26 anos e máxima foi de 66 anos. A variável idade foi categorizada em três faixas etárias: < 15 anos, 15 a 30 anos e >30 anos, Tabela 5. Foi observado uma maior frequência de indivíduos acometidos na faixa acima de 30 anos. Em relação ao gênero, 53% (53/100) eram do sexo feminino e 47% (47/100) do sexo masculino. Crianças menores de 15 anos do sexo masculino foram mais acometidas do que as do sexo feminino (25,5% e 17,0%, respectivamente), enquanto que os jovens adultos (entre 15 a 30 anos) do sexo feminino foram mais acometidos do que os masculinos (41,5% e 29,5%, respectivamente). Em maiores de 30 anos, uma distribuição de casos acometidos similar entre os gêneros foi observada. Não houve diferença significativa entre a distribuição dos casos de pacientes acometidos em relação as diferentes faixas etárias ($p=0,598$).

Tabela 5 - Distribuição dos casos confirmados por dengue ($n=100$) no Amapá, por gênero e faixa etária, Janeiro de 2014 a Março de 2015.

FAIXAS ETÁRIAS EM ANOS (%)				
GÊNERO	<15	15-30	>30	TOTAL
Masculino	12 (25,5)	14 (29,5)	21 (45,0)	47
Feminino	9 (17,0)	22 (41,5)	22 (41,5)	53
TOTAL	21 (21,0)	36 (36,0)	43 (43,0)	100

A análise do diagnóstico laboratorial demonstrou que 79% (79/100) dos casos foram positivos por MAC-ELISA e negativos por NS1 ELISA. Este último confirmou 21% (21/100)

dos casos, em que o IgM não foi detectado. O total de casos confirmados por ambas metodologias foi de 2% (2/100). Nesta casuística, o RT-PCR identificou o sorotipo infectante em 12% (12/100) dos casos. Os DENV-1 e DENV-4 foram os sorotipos identificados em 9 e 3 casos, respectivamente, Figura 18, Tabela 6.

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose de produtos da amplificação por RT-PCR de casos representativos, para tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti et al. (1992). Análise representativa de casos de DENV-1 (A) e DENV-4 (B).

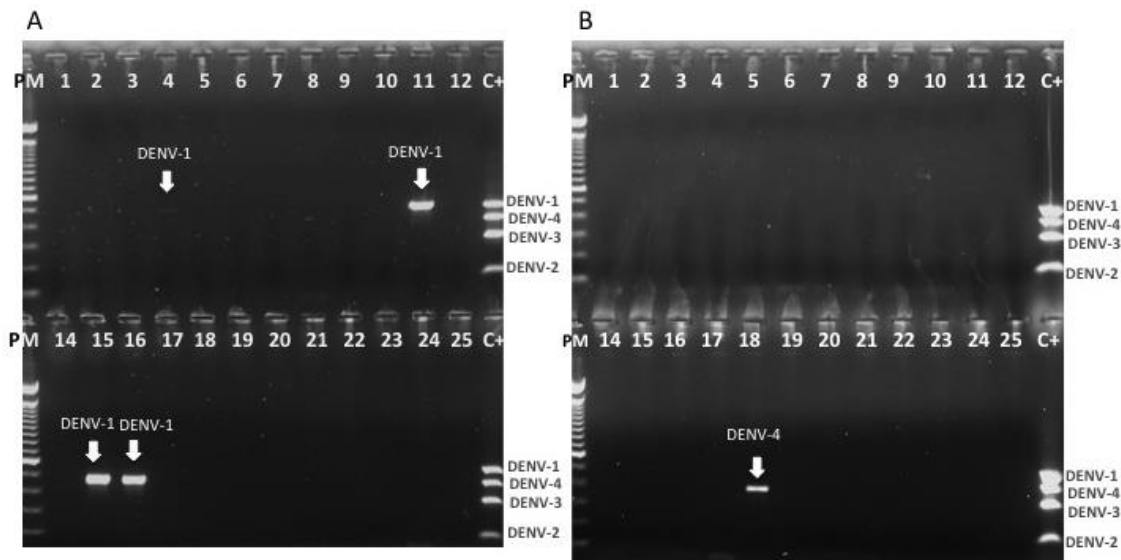
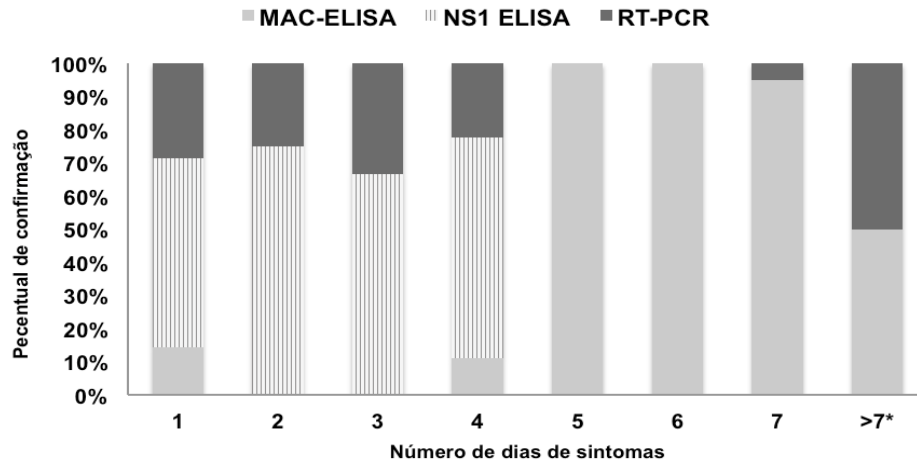


Tabela 6 - Diagnóstico laboratorial (MAC-ELISA e NS1 ELISA) em casos confirmados de dengue ($n=100$) ocorridos no Amapá, no período de Janeiro de 2014 a Março de 2015.

METODOLOGIA	CASOS ESTUDADOS ($n=100$) POSITIVOS/TESTADOS (%)	SOROTIPO (n)
MAC-ELISA	79 /100 (79,0)	-
NS1 ELISA	21/100 (21,0)	-
MAC-ELISA e NS1 ELISA	2/100 (0,02)	-
RT-PCR	12/100 (12,0)	DENV-1 (9) DENV-4 (3)

A análise da confirmação laboratorial das diferentes metodologias, estratificada pelo número de dias de sintomas do paciente, demonstrou um maior percentual de positividade pelo NS1 ELISA e RT-PCR nos primeiros quatro dias de sintomas e do MAC-ELISA, a partir do quinto dia. No entanto, a RT-PCR foi capaz de identificar o sorotipo infectante em dois casos acima de sete dias de doença, Figura 19.

Figura 19 - Distribuição da confirmação laboratorial de casos de dengue ($n=100$) por MAC-ELISA, NS1 ELISA e RT-PCR de acordo com o número de dias de sintomas dos pacientes provenientes do Amapá.



Dos casos positivos para DENV-1 ($n=9$) por RT-PCR, 4 foram positivos por MAC-ELISA e 5 por NS1 ELISA. Nos casos de pacientes infectados por DENV-4 ($n=3$), 1 foi positivo por MAC-ELISA e 2 por NS1 ELISA. Nenhum dos casos foi positivo por ambas metodologias, Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização dos casos de dengue confirmados por RT-PCR ($n=12$) em relação aos testes de MAC-ELISA e NS1 ELISA.

CASO #	NÚMERO DE DIAS DE DOENÇA	SOROTIPO IDENTIFICADO	RESULTADO	
			MAC-ELISA	NS1 ELISA
1	2	DENV-1	-	+
2	4	DENV-1	-	+
3	1	DENV-1	-	+
4	3	DENV-1	-	+
5	1	DENV-1	-	+
6	10	DENV-1	+	-
7	7	DENV-1	+	-
8	4	DENV-1	+	-
9	12	DENV-1	+	-
10	4	DENV-4	-	+
11	4	DENV-4	-	+
12	7	DENV-4	+	-

Legenda: (-): negativo; (+): positivo.

A análise estatística dos resultados discordantes entre a RT-PCR e o MAC-ELISA revelou diferenças significativas entre as duas metodologias ($p=0,0001$, Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação entre os resultados obtidos nos testes de RT-PCR e MAC-ELISA utilizados na investigação dos casos de dengue provenientes do Amapá, entre janeiro de 2014 a março de 2015.

MAC-ELISA	RT-PCR		
	Positivo	Negativo	TOTAL (%)
Positivo	5	74	79
Negativo	7	14	21
TOTAL (%)	12 (12,0)	88 (88,0)	100 (100)

A análise dos resultados discordantes entre a RT-PCR e o NS1 revelou que não houve diferenças significativas entre as duas metodologias ($p=0,0636$, Tabela 9).

Tabela 9 - Comparação entre os resultados obtidos nos testes de RT-PCR e NS1 ELISA utilizados na investigação dos casos de dengue provenientes do Amapá, entre Janeiro de 2014 a Março de 2015.

NS1 ELISA	RT-PCR		
	Positivo	Negativo	TOTAL(%)
Positivo	7	14	21
Negativo	5	74	79
TOTAL (%)	12 (12,0)	88 (88,0)	100(100)

6 DISCUSSÃO

Embora o isolamento viral seja considerado como padrão ouro para o diagnóstico dos DENV, evidenciando a infecção viral durante a fase aguda da doença quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis, esta técnica pode demorar dias ou semanas para ser concluída e muitas vezes não apresenta sucesso devido à presença de uma pequena quantidade de partículas viáveis do vírus no inóculo, formação de complexo vírus-anticorpo e contaminação em decorrência de uma manipulação inapropriada das amostras (Lanciotti, 1992). Além do tempo necessário para a realização do isolamento viral, esta técnica exige também uma estrutura laboratorial muito dispendiosa (Gubler, 1997). Sendo assim, devido à necessidade de ferramentas rápidas e específicas para a detecção e tipagem deste vírus, o RT-PCR destaca-se como método importante para a confirmação da infecção pelo DENV em áreas epidêmicas como o Brasil, auxiliando assim na prevenção, tratamento e controle desta doença.

A RT-PCR vem sendo cada vez mais utilizada como um método diagnóstico para dengue (Paula et al., 2002), permitindo a detecção de diminutas quantidades de RNA viral mesmo em amostras onde o vírus está inativo ou associado a anticorpos (OMS, 1997). Além disso, vários protocolos para detecção do RNA do vírus e determinação do seu sorotipo já foram desenvolvidos, como o uso de quatro iniciadores sorotipos-específicos em uma única reação (Harris et al., 1998), reações de amplificação utilizando um único par de iniciadores universais para dengue seguidas de nested PCR (Lanciotti et al., 1992), análise com enzimas de restrição (Paula et al., 2002), ou hibridação com sondas específicas (Henchal et al., 1991).

O protocolo mais utilizado é o descrito por Lanciotti et al. (1992), preconizado pela Organização Mundial de Saúde, que utiliza iniciadores de regiões conservadas das proteínas C e prM do genoma viral e, em uma segunda etapa ocorre a tipagem dos vírus, com iniciadores específicos para cada sorotipo (Guzman & Kouri, 2004; De Paula & Fonseca, 2004).

A implementação da técnica de RT-PCR para a detecção e tipagem do vírus dengue em laboratórios de diagnóstico exige alguns cuidados, como por exemplo, a manipulação das amostras de soro em Cabine de Segurança Biológica Nível 2 para evitar a contaminação, mantendo assim a qualidade e integridade das amostras. É importante também a cautela no desenho dos *primers*, condições de termociclagem, qualidade e quantidade dos reagentes, o tamanho do produto a ser amplificado e a padronização das condições específicas para cada experimento. Para tal, o laboratório responsável por realizar procedimentos de Biologia Molecular deve dispor de áreas e espaços bem delimitados para as diferentes etapas de

execução, desde a preparação de amostras até a fase de detecção do produto amplificado, conferindo assim a confiabilidade dos resultados e prevenção de contaminações.

Segundo a RDC nº50/2002, o Laboratório de Biologia Molecular é classificado no Nível de Biossegurança 2 (NB-2), nos quais os procedimentos envolvem um alto potencial para produção de aerossóis que podem aumentar os riscos de exposição dos funcionários, quem devem utilizar barreiras de contenção primárias e secundárias (Ministério da Saúde, 2002).

Devido aos cuidados necessários para a realização o RT-PCR, é recomendável que o laboratório disponha das seguintes áreas: 1) Área de manipulação das amostras, onde será realizada a extração dos ácidos nucléicos e adição do DNA à reação de PCR através de Câmara de Segurança Biológica Nível 2 com Ultravioleta; 2) Área de preparação de reagentes, que é destinada à preparação da mistura de amplificação (*mix*); 3) Área de Amplificação, onde se localizam os termocicladores e também realiza-se a segunda etapa do RT-PCR (*nested*) e 4) Área de Detecção, onde o gel de agarose será revelado. Esta área deverá ser instalada completamente separada das áreas anteriores devido ao risco de contaminação com o brometo de etídeo (Ministério da Saúde, 2002).

É importante também que, o procedimento de RT-PCR esteja registrado em Procedimento Operacional Padrão (POP), que consiste em instruções detalhadas descritas para alcançar a uniformidade na execução do procedimento. A importância do estabelecimento de POP consiste no melhor preparo na condução do diagnóstico, harmonização dos processos, credibilidade, garantia da qualidade por meio da padronização e da rastreabilidade do processo em auditorias e inspeções. Cada uma das etapas de elaboração do POP deverá ter a participação da equipe envolvida, que poderá avaliar e validar seus procedimentos, e, se necessário, contratar pessoal especializado para esta função. O POP deve ser escrito de forma detalhada para a obtenção da uniformidade, seja na produção ou na prestação de um serviço (Barbosa, 2011).

No estado do Amapá, os modelos de POP adotados pelo LACEN/AP são baseados na ABNT NBR ISO 9001-2008, sendo que a realização do POP para a implementação de novas metodologias é de fundamental importância para a execução correta da metodologia e preparação técnica dos profissionais.

Tendo em vista a proposta deste estudo, a implementação da técnica de RT-PCR para o diagnóstico de dengue no LACEN/AP representa importância fundamental para a melhoria na eficácia e rapidez no diagnóstico de DENV em toda a região do Amapá, tendo em vista que o LACEN é o laboratório de referência para o diagnóstico de dengue no estado atendendo as demandas da capital, hospitais e unidade básicas de saúde, bem como as demandas municipais.

Neste último caso, a necessidade de envio de amostras pelos municípios exige uma estrutura de logística adequada que quase sempre não está disponível, o que explicaria a baixa frequência de amostras oriundas do interior. A heterogeneidade desses municípios em relação aos serviços de saúde prestados pode contribuir para a ocorrência de subnotificações, visto que as ações de saúde se concentram nas áreas com melhor assistência.

Neste estudo, casos de dengue recebidos no LACEN/AP, de janeiro de 2014 a março de 2015, foram submetidos ao diagnóstico de rotina (MAC-ELISA e/ou NS1 ELISA) e, posteriormente, casos confirmados foram selecionados aleatoriamente e submetidos à técnica de RT-PCR para tipagem viral. Independente do método de diagnóstico utilizado, 89,3% dos casos analisados foram confirmados. Deste total, 79,6% foram confirmados por MAC-ELISA.

Os métodos sorológicos, levando em conta suas vantagens como facilidade e baixo custo, continuam sendo uma ótima ferramenta para o diagnóstico de dengue em epidemias (Peeling et al., 2010). Durante a infecção primária por DENV, o anticorpo IgM é primeiro a aparecer. Este método mostra uma sensibilidade e especificidade de 90% e 98%, respectivamente, nas amostras colhidas após a soroconversão. Os ELISA podem ter maior sensibilidade, porém as principais desvantagens de todos IgM a são de que elas podem reagir de forma cruzada com outros flavivírus e podem fornecer resultados imprecisos se os pacientes apresentarem uma infecção recente de dengue (Parkash & Shueb, 2015).

A IgM de fase convalescente atinge seu maior pico após 2-4 semanas, com uma sensibilidade de 89,1% diminuindo com o passar das semanas (Guzman et al., 2010). Hu et al. (2011) relata sensibilidades no MAC-ELISA de 42% para casos de infecções primárias em amostras coletadas até o 3º dia de sintomas e 42,9% para amostras obtidas após o 8º dia, com 100% de sensibilidade. Apesar de ser o método de escolha para a investigação de casos de dengue na fase convalescente (da Silva 2011), uma menor sensibilidade é observada em infecções secundárias quando comparadas às infecções primárias (Chatterji et al., 2011).

A proteína NS1 é altamente conservada nos quatro sorotipos de DENV e é encontrada circulando no soro de pacientes do primeiro ao nono dia após o início dos sintomas (Falconar, 1997; Young et al., 2000, Alcon et al., 2002, Xu et al., 2006). Aproveitando-se destas características, ensaios imunoenzimáticos para a detecção específica da proteína NS1 têm sido desenvolvidos e avaliados para a confirmação de casos agudos primários e secundários de dengue (Xu et al., 2006; Kumarasamy et al, 2007; Lapphra et al., 2008; Phuong et al., 2009; Chaiyaratana et al, 2009; Guzman et al, 2010; Duong et al, 2011; Blacksell et al, 2012; Huang et al, 2013; Sánchez-Vargas et al, 2014). O teste de captura do antígeno NS1 permite o

diagnóstico da dengue mesmo em laboratórios com equipamentos e recursos humanos limitados (Andries et al., 2012). No entanto, os níveis de circulação do NS1 em indivíduos infectados de dengue pode variar dependendo da gravidade da doença, o seu estado imunológico - infecção primária ou secundária (Antunes Paula, 2015).

Em 2008, o Ministério da Saúde implantou unidades sentinelas em municípios estratégicos do país, utilizando o teste de captura de NS1 como um método de triagem e diagnóstico precoce das infecções pelos DENV, no entanto, sem uma avaliação detalhada do desempenho destes testes.

Neste estudo, 9,7% dos casos testados foram confirmados por NS1 ELISA. Estudos prévios demonstraram uma maior sensibilidade do teste NS1 ELISA em casos positivos para RT-PCR e/ou isolamento viral. Dussart et al. (2006) confirmaram 94,1% de casos positivos por isolamento viral e 85% dos casos de RT-PCR positivos utilizando o Platelia NS1 ELISA. McBride et al (2009) mostraram que a captura do antígeno NS1 foi positivo em 87% dos casos positivos por RT-PCR. O estudo realizado por Castro-Jorge et al (2010) que avaliou um teste comercial para captura de antígeno NS1 em uma amostragem de 105 indivíduos confirmados por dengue através da combinação de isolamento por cultura e/ou RT-PCR e/ou presença de anticorpos IgM, demonstrou uma sensibilidade de 95,9% e a especificidade de 81,1%. Outro estudo ocorrido nesse mesmo ano foi realizado por Lima et al. (2010) avaliando o uso potencial de 3 kits comerciais do NS1 ELISA para amostras positivas para dengue em epidemias ocorridas no Rio de Janeiro entre 1986 a 2008, encontrou uma sensibilidade de 72,3% e especificidade de 100% para o kit comercial da Panbio. Utilizando a versão imunocromatográfica do teste NS1, o estudo confirmou 98,7% dos casos positivos por isolamento viral e 82,3% dos casos positivos por RT-PCR, semelhantes aos resultados obtidos por Zainah et al. (2009). Contudo, na presença de anticorpos IgM, o teste Platelia NS1 ELISA confirmou 64,5% dos casos. A maior sensibilidade para detecção do NS1 é até o terceiro dia de doença e do quarto ao sexto dia a sensibilidade é menor, resultado da elevação dos níveis de anticorpos IgM (da Silva et al 2011). A avaliação do teste imunocromatográfico SD Bioline Dengue Duo, que combina a detecção de IgM e NS1 em um único teste, demonstrou uma sensibilidade de 90,6% e especificidade de 89,6% em casos de dengue ocorridos em uma região endêmica do México e, casos agudos foram significativamente mais confirmados do que casos convalescentes (Sánchez-Vargas et al, 2014).

Um resultado negativo por NS1 não exclui a possibilidade da doença, uma vez que ser resultantes da formação de imunocomplexos do antígeno NS1 com a IgG, particularmente em

infecções secundárias, onde antígenos alvos não são mais acessíveis ao anticorpo monoclonal utilizado nos testes de ELISA (Hang et al, 2008; Lima et al., 2014). A análise prévia do soro de pacientes com infecções secundárias demonstrou uma circulação mais curta da NS1 e menor sensibilidade (60 a 80%) de detecção em ensaios ELISA (Guzman et al, 2010).

Atualmente, o país vive uma situação onde o dengue é hiperendêmico, com a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, e conseqüentemente a ocorrência, cada vez maior de casos de infecções secundárias. Após a introdução do DENV-4 no país em 2010, uma menor sensibilidade dos testes de NS1 foi relatada (Colombo et al, 2013; Lima et al., 2014). Visando aumentar a sensibilidade do NS1 ELISA em casos de DENV-4, Lima et al (2014) estabeleceu um protocolo de dissociação térmica para tratar imunocomplexos formados, principalmente em casos de infecção secundária. Após este processo, as sensibilidades do teste em casos primários e secundários de DENV-4, foram significativamente aumentadas de 54,4% para 82% e de 39,0% para 73,1%, respectivamente.

Casos confirmados de dengue ($n=100$) foram selecionados aleatoriamente para tipagem por RT-PCR convencional, de acordo com o protocolo de Lanciotti (1992), preconizado pela OMS. Nesta casuística, os sinais e sintomas mais frequentemente observados foram febre, cefaléia, mialgia, vômitos, artralgia e exantema e, a ocorrência de hemorragias e óbito não foi observada neste estudo.

Apesar de ter sido o sintoma mais frequentemente reportado, é importante ressaltar que febre não é considerada um bom marcador para o diagnóstico, visto que é bastante referido na maioria das doenças infecciosas (Figueiredo et al, 1992). A cefaléia, geralmente de localização frontal, e a dor retro-orbitária podem estar muitas vezes associadas a sintomas otorrinolaringológicos, simulando outras doenças, como quadro de sinusite aguda. É uma manifestação frequente, atingindo 93% dos casos (Ponte et al, 2011).

A média de idade dos pacientes foi de 26 anos e máxima de 66 anos. Foi observado maior frequência de indivíduos acometidos na faixa acima de 30 anos. Pacientes do sexo feminino (53%) foram mais acometidos do que os do sexo masculino e não houve diferença significativa em relação às diferentes faixas etárias dos pacientes ($p=0,598$). No estudo de Teixeira et al (2013) foi demonstrado que houve uma mudança na distribuição etária da doença durante o período de estudo e uma grande proporção de hospitalizações relacionadas com a dengue (40,8%) ocorreu em menores de 10 anos. Durante a epidemia de 2008, uma maior hospitalização ocorreu em crianças menores de 15 anos, em comparação com a epidemia de 2002 ocorrida no país.

A RT-PCR identificou o sorotipo infectante em 12% dos casos testados e, DENV-1 ($n=9$) e DENV-4 ($n=3$) foram os sorotipos caracterizados. Apesar do predomínio do DENV-1 no país em 2014 e 2015, o DENV-4 também tem circulado na região Norte do país. No entanto, dados da investigação de casos de dengue do Amapá pelo Ministério da Saúde nos dois anos, reportam apenas o DENV-1 no estado (SVS/MS, 2014; 2015).

Embora a técnica molecular apresente alta sensibilidade, neste trabalho verificou-se que, em 14 amostras positivas por NS1 ELISA, não foi possível detectar o RNA viral pela RT-PCR convencional, provavelmente em decorrência do processo de armazenamento de algumas amostras testadas que, na fase inicial do estudo, foram armazenadas a -20°C .

Um maior percentual de positividade foi obtido pelo NS1 ELISA e RT-PCR nos primeiros quatro dias de sintomas e pelo MAC-ELISA, a partir do quinto dia. A pesquisa de IgM deve ser empregada na fase convalescente enquanto que a detecção do RNA viral, na fase aguda da doença, onde a viremia está presente. Na análise dos dados discordantes entre a RT-PCR e o ELISA IgM, a diferença entre esses métodos foi significativa ($p=0,0001$). O estudo de Cruz et al (2014) demonstrou que, o uso combinado da RT-PCR e MAC-ELISA na fase aguda aumentou a sensibilidade na confirmação dos casos para 86,3%, diferindo do obtido por Castro-Jorge et al. (2010) que relataram uma sensibilidade de 67,1% para essa combinação. Na disponibilidade da amostra convalescente, a combinação da RT-PCR com MAC-ELISA pode aumentar a sensibilidade para 100%. Esses resultados evidenciam a importância da coleta de uma segunda amostra de sangue principalmente se o paciente apresentar sintomatologia característica da doença e o resultado da primeira avaliação sorológica negativa.

Neste trabalho, foi possível detectar o RNA viral em cinco amostras negativas para NS1. A análise de 150 amostras negativas para NS1 por Meneses et al (2012), detectou o RNA viral de arbovírus em 53. Neste contexto, destaca-se a necessidade da implantação de metodologias com alta sensibilidade para detecção viral em áreas de alto risco para arboviroses como a região Amazônica. Além disso, a não confirmação laboratorial dos casos pode prejudicar a execução de ações de controle de vetores pela vigilância epidemiológica dos estados.

Os dados do Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde sobre o monitoramento do dengue no Brasil reportam que, apenas 2 amostras do Amapá foram analisadas para identificação do sorotipo viral em 2014 e 10 em 2015, destas, o DENV-1 foi o único sorotipo identificado em quatro amostras (SVS/MS, 2014; 2015). Neste contexto, é evidente a contribuição do presente trabalho para a vigilância deste agente na região e, a

implementação de um método de identificação viral rápido e sensível encontra uma efetiva aplicação.

7 CONCLUSÕES

- O estabelecimento do POP para implantação de método molecular para o diagnóstico de dengue (RT-PCR) para utilização no LACEN/AP irá fornecer apoio a Vigilância Epidemiológica para a investigação de casos suspeitos ocorridos no estado do Amapá.
- Apesar da distribuição dos casos de dengue em diversos municípios do estado, um maior número de casos foi proveniente da capital Macapá, onde também foi confirmado um maior número de casos.
- Os sinais e sintomas observados nesta casuística foram os mais frequentemente descritos em casos de dengue e, hemorragias e óbitos não foram reportados.
- Não foram observadas diferenças significativas entre a distribuição dos casos em relação às diferentes faixas etárias e sexo.
- O MAC-ELISA ainda constitui o método de escolha para utilização em larga escala no diagnóstico das infecções por dengue e neste estudo confirmou 79,6% dos casos analisados.
- DENV-1 e DENV-4 foram os sorotipos identificados por RT-PCR que confirmou 12% dos casos analisados.
- É evidente a contribuição do presente trabalho para a vigilância do dengue nesta região uma vez que, segundo o Ministério da Saúde, entre 2014 e 2015, apenas 12 casos foram investigados para a presença do sorotipo infectante.

REFERÊNCIAS

Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* 2002. 40:376-81.

Anderson JR, Rico-Hesse R 2006. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg* 75(5):886-92.

Andries AC, Duong V, Ngan C, Ong S, Huy R, Sroin KK, Te V, Y B, Try PL, Buchy P. Field evaluation and impact on clinical management of a rapid diagnostic kit that detects dengue NS1, IgM and IgG. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1993

Angel RMD, Valle JR-d 2013. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. *PLoS Pathog* 9(10): e1003551. doi:10.1371/journal.ppat.1003551.

Antunes Paula, Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. *Sci Rep.* 2015 Nov 5;5:16145. doi: 10.1038/srep16145

ARAÚJO, J. M. et al. Dengue virus type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 3, p. 526-9, May 2009. ISSN 1678-8060.

Ashburn PM & Craig CF. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. *J Infect Dis.* 1907. 4:440-75.

BALSITIS, S. J. et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg*, v. 80, n. 3, p. 416-24, Mar 2009. ISSN 1476-1645.

Blacksell SD, Jarman RG, Gibbons RV, Tanganuchitcharnchai A, Mammen MP Jr, Nisalak A, Kalayanarooj S, Bailey MS, Premaratna R, de Silva HJ, Day NP, Lalloo DG. Comparison of seven commercial antigen and antibody enzyme-linked immunosorbent assays for detection of acute dengue infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2012 May;19(5):804-10.

BRATHWAITE DICK, O. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*, v. 87, n. 4, p. 584-93, Oct 2012. ISSN 1476-1645.

BROWN, J. L. et al. Rapid diagnosis and determination of duration of viraemia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 90, n. 2, p. 140-3, 1996 Mar-Apr 1996. ISSN 0035-9203.

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van-Dillen PME, Van der Noordaa J 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.

Brasil .Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Amapá / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. (2011), 5⁰ ed. Brasília: Ministério da Saúde.

Callahan JD, Wu, S-JL, Dion-Shultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, Porter KR, Murphy GR, Suharyono W, King C-C, Hayes CG, Temenak JJ. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microb.* 2001;39(11):4119-24.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2006. Emerging Infectious Diseases. [online] www.cdc.gov/eid Vol. 12, No. 6, June.

CALISHER. Printed in Great Britain Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. 1989. *J. gen. Virol.* Vol: 70, 37-43

CASTRO-JORGE, L. A. et al. Clinical evaluation of the ns1 antigen-capture elisa for early diagnosis of dengue virus infection in brazil. *J. Med. Virol.*, v. 82, n. 8, p. 1400-1405, 2010.

Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropode-borne viruses. 1958. *Am J Trop Med Hyg* 7: 561-573.

Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnararatchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009. 64:91-2.

Chan M, Johansson MA 2012. The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLoS ONE* 7(11): e50972. doi:10.1371.

Chatterji et al.; Evaluation of the NS1 rapid test and the WHO dengue classification schemes for use as bedside diagnosis of acute dengue fever in adults. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb;84(2):224-8. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0316

Chen, R.; Vasilakis, N. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses* 2011, 3, 1562-1608.

Christophers SR. Systematic. In “*Aedes aegypti*, The Yellow Fever Mosquito: Its life History, Bionomics and Structure”. Cambridge University Press, London. 1960. 21–53.

Chua KB, Mustafa B, Abdul Wahab AH, Chem YK, Khairul AH, Kumarasamy V, Mariam M, Nurhasmimi H, Abdul Rasid K. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. *Malays J Pathol.* 2011 Jun;33(1):13-20.

Colombo TE, Vedovello D, Araki CS, Cogo-Moreira H, dos Santos IN, Reis AF, Costa FR, Cruz LE, Casagrande L, Regatieri LJ, Junior JF, Bronzoni RV, Schmidt DJ, Nogueira ML. Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil. *J Clin Virol.* 2013 Dec;58(4):710-2.

CRUZ, J. S. Avaliação de testes diagnósticos para a identificação da infecção pelo vírus da dengue em pacientes com síndrome febril aguda. 2014. 67 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

DE BRUYCKER-NOGUEIRA, F. et al. Insights of the genetic diversity of DENV-1 detected in Brazil in 25 years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect Genet Evol.* v. 34, p. 126-36, Aug 2015a. ISSN 1567-7257.

De Paula SO, Pires Neto RJ, Corrêa JA, Assumpção SR, Costa ML, Lima DM, Fonseca BA 2002. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(3):266-9.

De Paula SO & Fonseca BA. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis.* 2004. 8(6):390-8.

Da silva et al, Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da dengue.2011.

DE SIMONE, T. S. et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 98, n. 9, p. 553-62, Sep 2004. ISSN 0035-9203.

Diallo M, Sall AA, Moncayo AC, Ba Y, Fernandez Z, Ortiz D, Coffey LL, Mathiot C, Tesh RB, Weaver SC. Potential role of sylvatic and domestic african mosquito species in dengue emergence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005. 73(2):445–449.

DIETZ, V. J. et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *Am J Epidemiol*, v. 131, n. 4, p. 693-701, Apr 1990. ISSN 0002-9262.

Dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, Simões JB, Sampaio SA, Santos CR, Nogueira RM 2011. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virology Journal* 8:387.

Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Jul;40(7):2323-30.

Duong V, Ly S, Lorn Try P, Tuiskunen A, Ong S, Chroeng N, Lundkvist A, Leparac-Goffart I, Deubel V, Vong S, Buchy P. Clinical and virological factors influencing the performance of a NS1 antigen-capture assay and potential use as a marker of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jul;5(7):e1244.

Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MR, Rodrigues SG, Storck-Herrmann C, Cesaire R, Morvan J, Flamand M, Baril L. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol.* 2006. 13:1185-1189.

Falconar AK 1997. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142(5):897-916.

Faria NR, Nogueira RM, de Filippis AM, Simões JB, Nogueira Fde B, da Rocha Queiroz Lima M, Dos Santos FB 2013. Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010. *PLoS Negl Trop Dis* 7:2095.

FATIMA, A.; WANG, J. Review: progress in the diagnosis of dengue virus infections and importance of point of care test: a review. *Pak J Pharm Sci*, v. 28, n. 1, p. 271-80, Jan 2015. ISSN 1011-601X.

Figueiredo ML, Alfonso HL, Amarilla AA, Figueiredo LT, Aquino VH, da Costa CA, Luz SL 2013. Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil. *Virology Journal* 10:60.

Figueiredo LT, Badra SJ, Pereira LE, Szabó MP. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999 Nov-Dec;32(6):613-9.

Figueiredo et al, Laboratory diagnosis and symptoms of dengue, during an outbreak in the Ribeirão Preto region, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992 Mar-Apr;34(2):121-30.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). Guia de Vigilância Epidemiológica. 2002. 5 ed. Brasília: FUNASA.

Gubler DJ 2011. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine Health* 39(4 Suppl):3-11.

Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Found Symp*. 2006. 277:3-16; discussion 16-22, 71-3, 251-253.

Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 2002. 33: 330-42.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998. 11: 480-96.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. 1 - 22. In: Gubler DJ, Kuno G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International. 1997. New York, New York, USA.

Gubler DJ. Dengue. pp. 223-260. In: Monath TP (ed.). *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. 1992. Vol. II, Chapter 23. Boca Raton, FL: CRC Press.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1984. 33:158-165.

GURUKUMAR, K. R. et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. *Virol J*, v. 6, p. 10, 2009. ISSN 1743-422X.

Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12):S7-16.

Guzman MG & Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004. 8:69—80.

Guzman MG, Rosario D, Mune M, Alvarez M, Rodriguez R, Kouri G. [Genetic relatedness of the dengue 3 virus isolated in the outbreak of dengue hemorrhagic fever in Nicaragua, 1994]. *Rev Cubana Med Trop*. 1996. 48:114-117.

Halstead SB 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica* 20(6):407-15.

Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*. 1980. 58:1-21.

Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960. 131:1102-1103.

Hang et al, Recombinant envelope glycoprotein domain III of dengue virus inhibit virus infection. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 2008 Jun;22(3):177-9

Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*. 1998. 36(9):2634-9.

Henchalet et al.; Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection. *J Infect Dis*. 1991 Aug;164(2):294-301

Huang SS, Li IH, Hong PD, Yeh MK. Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine-loaded microspheres against dengue 2 virus. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3161-9.

HUE, K. D. et al. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *J Virol Methods*, v. 177, n. 2, p. 168-73, Nov 2011. ISSN 1879-0984.

Hu et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection *Virology Journal* 2011, 8:47 <http://www.virologyj.com/content/8/1/47>

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*. 1978. 40:531-544.

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke CH. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. 1989. 40:418-427.
Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J Clin Microbiol*. 2004;42(12):5935-7.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):4977-83.

Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006 138(1-2):123-30.

Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. *Bull Pan Am Health Organ*. 1986. 20:24-30.

Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, Hassan Z, Chem YK, Mohamad M, Chua KB. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2007.140:75-79.

Lai CJ, Goncalvez AP, Men R, Wernly C, Donau O, Engle RE, Purcell RH. Epitope determinants of a chimpanzee dengue virus type 4 (DENV-4)-neutralizing antibody and protection against DENV-4 challenge in mice and rhesus monkeys by passively transferred humanized antibody. *J Virol*. 2007; 81(23):12766-74.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992. 30:545-551.

Lapphra K, Sangcharaswichai A, Chokephaibulkit K, Tiengrim S, Piriyaakarnsakul W, Chakorn T, Yoksan S, Wattanamongkolsil L, Thamlikitkul V. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute dengue infection in patients with acute febrile illness. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008. 60:387-391.

LAUGHLIN, C. A. et al. Dengue research opportunities in the Americas. *J Infect Dis*, v. 206, n. 7, p. 1121-7, Oct 2012. ISSN 1537-6613.

Libraty DH, Endy TP, Houngh 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 infections. *J Infect Dis.* 2002. 85:1213-1221.

LIMA, M. A. R. et al. A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. *J Virol Methods*, v. 204, p. 105-8, Aug 2014. ISSN 1879-0984.

Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, Limonta D, dos Santos FB 2011. A new approach to dengue fatal cases diagnosis: NS1 antigen capture in tissues. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5):e1147.

Lima MdRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FBd (2010) Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 4(7): e738.

Machado CM, Martins TC, Colturato I, Leite MS, Simione AJ, Souza MP, Mauad MA, Colturato VR 2009. Epidemiology Of Neglected Tropical Diseases In Transplant Recipients. Review Of The Literature And Experience Of A Brazilian Hsct Center. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 51(6):309-324.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*30: 1292–1305.

McBride WJ. Evaluation of dengue NS1 test kits for the diagnosis of dengue fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009. 64:39-44.

Meneses et al, Assessing positivity and circulating levels of NS1 in samples from 2012 dengue outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e113634. doi: 10.1371/journal.pone.0113634. eCollection 2014

MESSINA, J. P. et al. A global compendium of human dengue virus occurrence. *Sci Data*, v. 1, p. 140004, 2014. ISSN 2052-4463.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*, v. 22, n. 3, p. 138-46, Mar 2014. ISSN 1878-4380.

Miagostovich MP, dos Santos FB, Fumian TM, Guimarães FR, da Costa EV, Tavares FN, Coelho JO, Nogueira RM 2006. Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus

type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(3):307-13.

Miagostovich MP, Nogueira RM, dos Santos FB, Schatzmayr HG, Araujo ES, Vorndam V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *J Clin Virol.* 1999. 14:183-189.

Miller N. Recent progress in dengue vaccine research and development. *Curr Opin Mol Ther.* 2010; 12: 31-8.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle da **Dengue.** Brasília: **Ministério da Saúde;** 2002 <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>

Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnol Adv.* 2011; 29(2):239-47.

Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol.* 2002 Dec;25 Suppl 3:S3-12. Review.

Nogueira RM, Filippis AM, Coelho JM, Sequeira PC, Schatzmayr HG, Paiva FG, Ramos AM, Miagostovich MP 2002. Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 33(1):68-71.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2000. 16:205-1.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Virol.* 1992 Nov-Dec;143(6):423-7.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85(2):253.

Nogueira RM, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araújo ES, de Filippis AM, de Souza RV, Zagne SM, Nicolai C, Baran M, Teixeira Filho G 1999. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(3):297-304.

NORMILE, D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*, v. 342, n. 6157, p. 415, Oct 2013. ISSN 1095-9203.

Nunes MR, Faria NR, Vasconcelos HB, Medeiros DB, Silva de Lima CP, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Cardoso JF, Sousa EC Jr, Nunes KN, Rodrigues SG, Abecasis AB, Suchard MA, Lemey P, Vasconcelos PF 2012. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. *Emergence Infectious Diseases* 18:1858-64.

Organização Mundial de Saúde (OMS). 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical disease: second WHO report on neglected diseases. Geneva.

OMS (World Health Organization). 2009. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva. Pg 3 -17.

Organização Mundial de Saúde (OMS). 2009. Impact of dengue. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>.

OMS (World Health Organization). 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/index.html>. Acesso em 13/11/2015

Osanaí CH, Travassos da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos AC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1983. 25: 53-54.

PAHO. [Description of the current epidemiological trends of dengue in the Americas](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en). 2015. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=4494&Itemid=2481&lang=en, acesso em 09/11/15.

Parkash & Shueb, Diagnosis of Dengue Infection Using Conventional and Biosensor Based Techniques. *Viruses*. 2015 Oct 19;7(10):5410-27. doi: 10.3390/v7102877.

Paula SO, Pires Neto RJ, Corrêa JA, Assumpção SR, Costa ML, Lima DM, Fonseca BA. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002a May-Jun;96(3):266-9.

Paula SO, Lima DM, da Fonseca BA. Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. *J Med Virol*. 2002b Apr;66(4):529-34.

Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vázquez S, Yoksan S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Dec;8(12 Suppl):S30-8. Review.

POK, K. Y. et al. Evaluation of nonstructural 1 antigen assays for the diagnosis and surveillance of dengue in Singapore. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 10, n. 10, p. 1009-16, Dec 2010. ISSN 1557-7759.

Phuong HL, Thai KT, Nga TT, Giao PT, Hungle Q, Binh TQ, Nam NV, Groen J, de Vries PJ. Detection of dengue nonstructural 1 (NS1) protein in Vietnamese patients with fever. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009. 63:372-8.

Ponte et al, Avaliação de manifestações dolorosas em pacientes internados em hospital de referência, com diagnóstico provisório de dengue. *Rev Dor. São Paulo*, 2011 abr-jun;12(2):104-7.

RICO-HESSE, R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*, v. 59, p. 315-41, 2003. ISSN 0065-3527.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(16):2773-86.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 690835, 2013. ISSN 2314-6141.

Rudnick A & Lim TW (ed.). Dengue fever studies in Malaysia. Bulletin from the Institute for Medical Research, Malaysia (Kuala Lumpur), 241p., 1986.

Sabin AB. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1952. 1:30-50.

Sánchez-Vargas LA, Sánchez-Marce EE, Vivanco-Cid H. Evaluation of the SD BIOLINE dengue duo rapid test in the course of acute and convalescent dengue infections in a Mexican endemic region. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Jan 7. pii: S0732-8893(14)00009-1.

Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of Dengue Virus at Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986. 81(2): 245-6.

Schilling S, Ludolfs D, Van An L, Schmitz H. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J Clin Virol*. 2004. 31(3):179-184.

Sánchez-Vargas LA, Sánchez-Marce EE, Vivanco-Cid H. Evaluation of the SD BIOLINE dengue duo rapid test in the course of acute and convalescent dengue infections in a Mexican endemic region. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014 Jan 7. pii: S0732-8893(14)00009-1.

San Martín JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solórzano JO, Bouckenoghe A, Dayan GH, Guzmán MG. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Jan;82(1):128-35.

Secretaria de Saúde do Estado do Amapá. Boletim Epidemiológico do Agravo Dengue no Estado do Amapá. 2013. Disponível em http://www.saude.ap.gov.br/doc_web/BOL_SEMEST_JAN_JUL_DENGUE_2013pub.pdf Acesso em 12/11/2015.

Siler J, Hal M, Hitchens A. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine Journal of Science*. 1926. 29:1-302.

Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med*. 2012 Apr 12;366(15):1423-32.

Smith CEG. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg*. 1956. 59:243-252.

SIQUEIRA JR, J. B. *et al*. Dengue no Brasil: tendências e mudanças na epidemiologia, com ênfase nas epidemias de 2008 e 2010. In: *Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde*. Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Mato Grosso do Sul, 2011.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2015. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 40, 2015. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/29/2015-035---Dengue-SE-40---29.10.15.pdf>. Acesso em 12/11/2015.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2014. Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 26 de 2014. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/14/Be-2014-45--15---Dengue--SE26-.pdf> . Acesso em 10/06/2014.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Situação Epidemiológica. 2013. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissionais/area.cfm?idarea=1525>.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilancia Epidemiologica. 8ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). Caderno 9 Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental. Guia de Vigilancia Epidemiologica. 7ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2009. Relatório de casos de dengue – 2008. Disponível em: http://www.saude.rj.gov.br/Docs/Acoes/dengue/Relat%C3%B3rio%20de%20Casos%20de%20Dengue%20_21-01-2009%20-%2018h40m_.pdf.

SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde). 2008. Informe epidemiológico da dengue. Janeiro a Novembro de 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_janeiro_novembro.pdf.

Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GL, Bricks L, Joint G. Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Dec 19;7(12):e2520.

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

Teixeira Mda G, Costa Mda C, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cad Saude Publica. 2005 Sep-Oct;21(5):1307-15

Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, da Costa Vasconcelos PF. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. Emerg Infect Dis. 2011; 17(5): 938-40.

THOMAS, S. J.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. Vaccine, v. 27, n. 3, p. 355-68, Jan 2009a. ISSN 0264-410X.

THOMAS, S. J.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. Scientific consultation on cell mediated immunity (CMI) in dengue and dengue vaccine development. *Vaccine*, v. 27, n. 3, p. 355-68, Jan 2009b. ISSN 0264-410X.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A. Inferring the rate and time-scale of dengue virus evolution. *Mol Biol Evol*, v. 20, n. 1, p. 122-9, Jan 2003. ISSN 0737-4038.

VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog*, v. 4, n. 12, p. e1000244, Dec 2008. ISSN 1553-7374.

Vasilakis N. The Daemon in the forest-emergence of a new dengue serotype in Southeast Asia. 3rd International Conference on Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever; Bangkok, Thailand 2013.

Vinícius dos Santos Santana. Co-infecção por dengue e malária na região Amazônica *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.43 no.5 Uberaba Sept./Oct. 2010.

Vorndam V e Kuno G 1997. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler,DJ, Kuno G. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. 1997. New York: CAB International.

Waggoner JJ, Abeynayake J, Sahoo MK, Gresh L, Tellez Y, Gonzalez K, et al. 2013. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2116. doi:10.1371/journal.pntd.0002116.

Wang E, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol.* 2000. 74(7):3227–3234.

Weaver SC, Vasilakis N 2009. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol* 9:523-40.

Weaver & Reisen, 2010 Present and Future Arboviral Threats *Antiviral Res.* Author manuscript; available in PMC 2011 Feb 1. Published in final edited form as: *Antiviral Res.* 2010 Feb; 85(2): 328.

Xu H, Di B, Pan YX, Qiu LW, Wang YD, Hao W, He LJ, Yuen KY, Che XY 2006. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating


nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 44(8):2872-8.

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. 38:1053-1057.

Zainah S, Wahab AH, Mariam M, Fauziah MK, Khairul AH, Roslina I, Sairulakhma A, Kadimon SS, Jais MS, Chua KB. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. *J Virol Methods.* 2009. 155:157-160.

ZAITSEVA, E. et al. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog*, v. 6, n. 10, p. e1001131, 2010. ISSN 1553-7374.

ANEXO I

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		POP
			Revisão: Folha: 1 / 7
Título: RT-PCR DENGUE			
Revisão:	Data:	Motivo:	
Elaborado:	Edcelha Soares D'Athaide Ribeiro Farm. Bloquímica	Revisado:	Farm. Bloquímica
		Aprovado:	Chefe Virologia

Referências:	
Executante da atividade:	Analistas do laboratório de Virologia.
Hora/freqüência de execução:	Quando necessário.
Prazo de execução:	
Local de execução:	Laboratório de Biologia Molecular.
Resultado esperado:	
Equip. e materiais necessários:	<ul style="list-style-type: none"> • Vórtex; • Pipetas (10µL,20µL,200µL,1000µL) • Ponteiras sem barreira; • Ponteira com barreira • Microtubos (0,2mL e de 1,5mL) • Provetas (100mL e 500mL); • Erlenmeyer de 250mL • Balança de Precisão • Cronômetro • Multi-blok heater -75°C • Béquer de 1000mL • Cuba pra eletroforese • Pente de 14 e 20 • Álcool 70%; • Fonte de eletroforese • Termociclador • Transiluminador de UV • Capturador de Imagens.
EPI necessários:	<ul style="list-style-type: none"> • Jaleco; • Gorro; • Máscara; • Luvas sem talco; • Óculos.
Reagentes e Soluções Necessárias:	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1M Dithiothreitol (DTT) • PCR Master Mix(Promega) • Gel de Agarose 1% em TBE0,5X • Tampão TBE0,5X • Brometo de Etideo1%- Solução aquosa 10mg/ml • Agua tipo II (livre de Dnase/Rnase free water) • 10U/ µL enzima AMV- RT • Azul de Bromofenol • Oligonucleotídeos Iniciadores

Condições Ambientais para o ensaio: Temperatura ambiente entre 20 – 25°C.



Oligonucleotídeo Iniciador* (sentido primer)	Sequência	Posição no Genoma	Tamanho do amplicon(em pares de base[pb])
D1(+)	5'-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG-3'	134-161	
D2(-)	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTT-3'	616-644	
TS1(-)	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	568-586	482(D1+TS1)
TS2(-)	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232-252	119(D1+TS2)
TS3(-)	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400-421	290(D1+TS3)
TS4(-)	5'-CTCTGTTGCTTAAACAAGAGA-3'	506-527	392(D1+TS4)

NOTA: * Os Oligonucleotídeos Iniciadores devem ser diluídos para serem utilizados na Reação de RT-PCR.

Passos:

1-Reagentes e Soluções necessárias para extração do RNA:

- Checar se o tampão AVL está precipitado. Se estiver, incubá-lo a 60°C em banho-maria, até o precipitado dissolver por completo.
- Verificar se os tampões AVE, AW1, AW2 estão à temperatura ambiente e prontos para serem utilizados.
- Todo procedimento deverá ser realizado à temperatura ambiente, com exceção da aplicação da amostra no tubo.

1.1-Adição do carreador de RNA ao tampão AVE:

- Adicionar 310ul de tampão AVE ao tubo do carreador RNA liofilizado para obter uma solução de 1ug/ul. Homogeneizar bem com a ajuda do vortex.
- Distribuir o volume ressuspenso em alíquotas e estocar a -20°C.

Nota: As alíquotas do carreador de RNA acrescido ao Tampão AVE não podem ser congeladas e descongeladas por mais de 3X.

1.2- Preparo dos Tampões AW com Etanol:

- Para os tampões AW1 e AW2, acrescentar etanol absoluto (96-100%) em quantidade específica no rótulo dos respectivos tampões. Homogeneizar bem e alíquotar para uso, evitando assim contaminação. Acrescentar data e o responsável pela preparação do mesmo.

2- Procedimento:

- Equilibre as amostras a temperatura ambiente à temperatura ambiente. Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Verifique se os tampões AW1, AW2 e o carreador do RNA foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (adição RNA carreador ou etanol).
- Prepare o volume de AVL+ carreador de RNA diluído em AVE necessário apenas para o número de amostras a serem processadas.
- Para uma amostra, pipete 560ul de tampão AVL em um microtubo de 1,5mL (Não fornecido pelo kit)
- Pipete 5,6ul de carreador de RNA.



EXEMPLO:

Nº de amostra	Vol. De tampão AVL	Vol. De carreador RNA diluído em AVE
1	0,56mL	5,6 uL
2	1,12mL	11,2 uL
5	2,80mL	28,0 uL
10	5,60mL	56,0 uL
12	6,72mL	67,2 uL
14	7,84mL	78,4 uL
16	8,96mL	89,6 uL
20	11,20mL	112,0 uL
24	13,44mL	134,4 uL

NOTA: Se o volume da amostra for maior que 140ul, aumente a quantidade de tampão AVL proporcionalmente. EX.: para 280uL da amostra coloca-se 1120ul do tampão AVL+ carreador de RNA diluído em AVE.

- Adicione 140ul da amostra (secreção ou sobrenadante de cultura celular) no tubo de microcentrifuga contendo o tampão AVL. Misture por 15 sec com auxílio do vortex.

NOTA: Para garantir eficiente lise, é essencial que a amostra seja completamente misturada ao tampão AVL obtendo-se uma solução homogênea.

- Incube a temperatura ambiente por 10' minutos (a lise da partícula viral é completa depois de 10 minutos a temperatura ambiente).

NOTA: Tempos de incubações superiores a 10' minutos não aumentam o rendimento a quantidade do RNA purificado. Agentes infecciosos e RNAses também são inativados em tampão AVL.

- Centrifugue rapidamente o tubo de 1,5mL para remover gotículas da tampa (se necessário).
- Adicione 560ul de etanol PA (não fornecido pelo kit) ao tubo com a amostra, e misture 15 sec.com auxílio do vortex.
- Centrifugue rapidamente o tubo para remover as gotículas da tampa (se necessário).

Nota: Somente etanol pode ser usado, outros álcoois podem reduzir a quantidade e pureza do RNA. Se o volume da amostra for maior que 140 ul, proceder com o descrito no exemplo acima. Para uma eficiente ligação entre o RNA e a membrana a amostra deve-se obter nesta etapa uma solução homogênea.

- Aplique cuidadosamente 630ul da mistura à coluna QIAmp spin (em um tubo coletor de 2mL), sem tocar a borda e o fundo da coluna. Feche a tampa, e centrifugue a 6000xg(ependorf 5415D = 8000rpm) por 1 minuto. Descarte o volume filtrado. Feche bem cada coluna para evitar contaminação cruzada durante a centrifugação. Caso o volume do lisado não passe completamente pela membrana, centrifugue novamente a uma velocidade maior.
- Descarte o tubo coletor contendo o filtrado e coloque a coluna em um novo tubo coletor. Adicione mais 630ul da solução na coluna e centrifugue a coluna 6000xg((ependorf 5415D =8000rpm) por 1 minuto.

Nota: Não é necessário aumentar o volume do tampão AW1 mesmo que o volume inicial da amostra seja maior que 140ul.



Título: RT-PCR DENGUE

- Descarte o tubo coletor contendo o filtrado e coloque a coluna em um novo tubo coletor. Abra cuidadosamente a coluna e adicione 500 µl do tampão AW1. Centrifugue a coluna 8000rpm/ por 1 minuto.
- Descarte o tubo coletor contendo o filtrado e coloque a coluna em um novo tubo coletor. Abra cuidadosamente a coluna e adicione 500 µl do tampão AW2. Centrifugue a coluna 14000rpm/ por 3 minutos.
- Coloque a coluna em novo tubo coletor (fornecido pelo kit)e descarte o tubo coletor usado com o filtrado. Centrifugue a velocidade de 14000 rpm por 3 minutos.
- Coloque a coluna em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml livre de nucleases(não fornecido pelo kit). Descarte o tubo coletor usado com o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna e adicione no centro da membrana sem toca-la 60µl do tampão AVE equilibrado à TA. Feche a tampa e incubar por 1 minuto.centrifugue à 8000 rpm/ 1 min.
- Desprezar a coluna, reservar o tubo tipo eppendorf com os 60µl de RNA coletados após a centrifugação. O RNA é estável por mais de 1 ano estocado à -70°C.

Antes de iniciar o processo as amostras devem estar descongeladas e agitadas em vórtex.

3- Diluição dos Oligonucleotídeos Iniciadores:

- Estoque (1000pM/µL) Observar as concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores na folha que os acompanha(ex: D1=83,7nM). Acrescentar 83,7µL de água livre de nucleases, neste caso,para obtermos uma concentração de 1nM/µL, que é igual a 1000pM/µL.

→ D1 - D2 para uso (10pM/µL) – diluir a solução estoque1/100, ou seja, 5µL solução estoque+ 495µL água livre de nucleases.

→ TS1-TS2-TS3-TS4 para uso (20pM/µL) – diluir a solução estoque 1/10, ou seja, 10/µL solução estoque+ 90/µL água livre de nucleases.

4-- Tampão Tris- Ácido Bórico – EDTA(TBE) 10X

Trizma Base	121,1 g
Ácido bórico	55,6 g
EDTA sal dissódico dihidratado(Na ₂ EDTA2H ₂ O)	3,7 g
Água tipo I q.s.p	1,0L

Ajustar o pH da solução para 8.6. Após o preparo, a solução deve ser conservada a temperatura ambiente.

Para uso: a solução deve estar 0,5X concentrada.

5- Etanol 70%:

Etanol PA	70mL
Água tipo I	30mL

Estocar a Temperatura ambiente.

6- Gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X:

Agarose	1,5 g
Solução de TBE (0,5X)	100mL

Em um Erlenmeyer, dissolver a agarose em TBE 0,5X, aquecendo a solução micro-ondas (temperatura máxima) por 2 minutos. Resfriar a solução e adicionar 4µL de brometo de etideo 1%:

Título: **RT-PCR DENGUE**

- Colocar o gel no suporte para gel de agarose e colocar os pentes de acordo com o número das amostras. Quando endurecer o gel, aplicar as amostras, segundo protocolo.

7- Diluição do Peso Molecular: O peso molecular (100pb DNA ladder) para uso, deve ser diluído 1/10 com água tipo I. Em tubo de 1,5mL previamente identificado, pipetar 10µL de peso molecular (100pb DNA ladder) + 90 µL de água livre de nucleases.

8- Dithiothreitol (DTT) 0,1M:

O peso molecular do DTT é 154,25.

Peso molecular x molaridade = gramas/ Litro

0,1M = 15,425g/ 100mL

15,425g ----- 0,1

x----- 0,002L

X=0,309g

DTT	0,309g
Água tipo I	2mL

9- AMV 2,5 U

AMV	10µL
5x Reaction Buffer	30µL

10- Reagentes:

- Depois de ter extraído as amostras, preparar as misturas necessárias para a realização da técnica de RT-PCR para dengue.
- Em um microtubo de 1,5mL, colocar os reagentes na seguinte ordem, segundo a quantidade de amostras utilizadas na realização desta metodologia:

Reagentes	Mistura para RT- PCR (1X)	Mistura para Semi-nested (1X)
Água livre de Nucleases	2,45 µL	1,85 µL
PCR Master Mix	6,25 µL	12,5 µL
0,1 M Dithiothreitol (DTT)	0,62 µL	-----
10 µM iniciador D1	0,32 µL	0,65 µL
10 µM iniciador D2	0,32 µL	-----
20 µM iniciadores TS1-4	-----	1,25 µL
2,5 U/ µl enzima AMV- RT	0,025 µL	-----

Nota: o preparo das misturas deve ser feito em banho de gelo ou em estantes refrigeradas.

11- Transcrição reversa e primeira etapa de amplificação:

- Numerar microtubos de 200 µL segundo o protocolo
- Colocar 2,5 µL do RNA extraído nos microtubos correspondentes
- Aquecer o RNA extraído no bloco aquecido a 75°C por 5 minutos e posteriormente mantê-los em banho de gelo.
- Adicionar em seguida 10 µL da mistura RT- PCR e imediatamente colocar os microtubos no bloco aquecido do termociclador.

Reação da RT	42°C	60 min
--------------	------	--------


PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
POP

Revisão:

Folha:

6 / 7

 Título: **RT-PCR DENGUE**

Reação de PCR	94°C	30 sec
	56°C	1 min
	72°C	2 min
	72°C	10 min
	4°C até retirar do termociclador	

Nota: caso não possa dar sequência a segunda etapa de amplificação, colocar a 4°C o produto do primeiro PCR.

12- Segunda Etapa de Amplificação: semi- nested PCR para tipagem do Vírus Dengue:

- Em microtubos de 1,5mL diluir os produtos Obtidos 1:100 bem água tipo I (5 µL produto:495 água)
- Em novos microtubos de 200 µL, adicionar 20 µL da mistura semi-nested PCR e 5 µL do produto da primeira reação diluído.
- Colocar os microtubos de 200 µL no bloco aquecido do termociclador.

	94°C	30 sec
	56°C	1 min
	72°C	2 min
	72°C	10 min
	4°C até retirar do termociclador	

13- Eletroforese em gel de Agarose (1,5%)

- Coloque a bandeja acrílica no suporte encaixe as peças metálicas dos dois lados, vedando bem a bandela acrílica.
- Separe os pentes de acordo com o número de amostras a ser processado.

Nota: Não esquecer a necessidade de poços extras para o padrão de peso molecular e os controles positivos e negativos

- Adicione 1,5g de agarose a 100mL de TBE 0,5X em um erlenmeyer.
- Misture manualmente e leve a mistura às micro-ondas por 1 minuto na potência máxima. Após calçar as luvas isolantes de temperatura (azuis), verifique se a mistura está homogênea. Proceda a novo ciclo de aquecimento até total dissolução da agarose.
- Retire o erlenmeyer do forno micro-ondas e resfrie-o por até 1minuto sob água corrente antes de adicionar o brometo de etídeo.
- Adicionar 4 µL de brometo de etídeo 10mg/mL a solução de agarose contida no erlenmeyer.

Nota: Não derrame a mistura quente na bandeja acrílica. A bandeja pode trincar-se imediatamente.

- Derrame a agarose com cuidado na bandeja. Retire as bolhas formadas e encaixe o pente na bandeja.
- Deixe o gel solidificar por 15 -20 minutos a TA.
- Após a solidificação, retire as peças metálicas, o pente e coloque todo o conjunto imerso em TBE 0,5X na cuba de eletroforese.
- Aplique entre 10µL e 15µL do produto da reação, adicionado de 4µL de corante. Proceder a eletroforese a 110 v – 50mA/60'min.

Nota: No primeiro orifício, aplicar 5 µL do peso molecular + 4 µL azul de bromofenol.


PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
POP

Revisão:

Folha:

7 / 7

Título: RT-PCR DENGUE

- Retire a bandeja acrílica da cuba, transporte a mesma em recipiente apropriado até o captador de imagem ou transiluminador.

Atenção! Não deixar partes do corpo exposta a radiação, especialmente os olhos. Usar sempre os EPI's.

- Cuidadosamente, verter o gel da bandeja acrílica para a superfície do transiluminador
- Observar as bandas apresentadas no gel, salvar a imagem no computador e imprimir a foto que posteriormente deve ser colada no respectivo protocolo.
- Descarte o gel corado em brometo de etídeo como lixo químico.

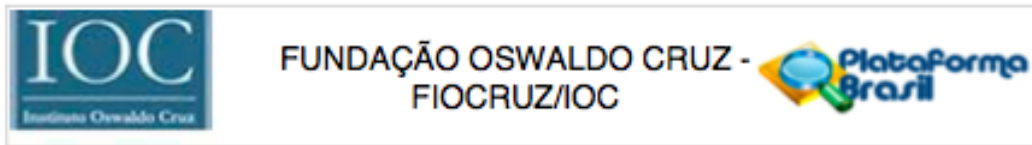
Nota: Espera-se que apenas os produtos do segundo PCR sejam visíveis. Utilizar padrão de peso molecular escalonado de 100 em 100pb.

Posição no Genoma	Tamanho do Amplicon (em pares de base(pb))
Denv-1	482
Denv-2	119
Denv-3	290
Denv-4	392

CONTROLE DE REGISTROS

Identificação	Coleta	Indexação	Acesso	Arquivamento	Armazenamento	Manutenção	Disposição
Ficha de trabalho GAL	Atendimento (Triagem LACEN)	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de biologia molecular	Prateleira em pastas registrador	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.
Protocolo de montagem	Laboratório de biologia Molecular	Nº do registro da amostra.	Analistas e técnicos	Laboratório de biologia molecular	Prateleira em pastas suspensas	1 ano no laboratório e 4 no arquivo morto.	Lixeira de resíduo comum.

ANEXO II



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DE DENGUE E OUTRAS ARBOVIROSES EM CASOS FEBRIS OCORRIDOS EM MACAPÁ E A POTENCIAL UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIMES ALTERNATIVOS

Pesquisador: FLAVIA BARRETO DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30757314.1.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 720.338

Data da Relatoria: 08/07/2014

Apresentação do Projeto:

O monitoramento dos sorotipos de vírus dengue (DENV) numa região é extremamente importante dado que o conhecimento dos vírus associados às epidemias poderá ajudar a prever a gravidade de surtos futuros. Frente às limitadas opções de prevenção e controle das epidemias, o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental no Sistema de Vigilância Epidemiológica, através do monitoramento contínuo das infecções, confirmando novos casos e identificando os sorotipos circulantes. Ademais, é de relevância para o diagnóstico diferencial a investigação de outros arbovírus em casos febris nos quais a infecção por DENV não foi confirmada, uma vez que muitos dos sinais e sintomas dessas arboviroses são compartilhados. Em regiões de difícil acesso ou remotas, como às encontradas nas regiões do estado do Amapá (AP), a utilização de métodos de coleta alternativos e menos invasivos torna-se uma grande contribuição a investigação destes agravos. Portanto, visamos neste Projeto identificar os sorotipos de DENV circulantes no AP detectados a partir de casos suspeitos recebidos no Laboratório Central (LACEN-AP) sob demanda espontânea e investigar os casos febris negativos para dengue para a identificação de outros arbovírus.

Metodologia: Serão analisados casos suspeitos de dengue ocorridos no Estado do Amapá no

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepflocruz@ioc.fiocruz.br