

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (SISTEMA
TAQMAN) PARA DENGUE TIPO 3 (DENV-3) E VIGILÂNCIA VIROLÓGICA
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO NOS ANOS 2004-2005

por

JOSÉLIO MARIA GALVÃO DE ARAÚJO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2006

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (SISTEMA TAQMAN) PARA
DENGUE TIPO 3 (DENV-3) E VIGILÂNCIA VIROLÓGICA NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO NOS ANOS 2004-2005

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (SISTEMA TAQMAN) PARA
DENGUE TIPO 3 (DENV-3) E VIGILÂNCIA VIROLÓGICA NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO NOS ANOS 2004-2005

por

JOSÉLIO MARIA GALVÃO DE ARAÚJO

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de Virologia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Rita Maria Ribeiro Nogueira

Co-orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bispo de Filippis

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2006

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta Dissertação intitulada:

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (SISTEMA TAQMAN) PARA
DENGUE TIPO 3 (DENV-3) E VIGILÂNCIA VIROLÓGICA NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO NOS ANOS 2004-2005

apresentada por

JOSÉLIO MARIA GALVÃO DE ARAÚJO

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr (Presidente)

Prof. Dra. Constança F. de Paoli de C. Britto

Prof. Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha

Prof. Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar (Suplente)

Prof. Dr. Edson Elias da Silva (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em 22 de fevereiro de 2006

Trabalho realizado no Laboratório de Flavivírus do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, com apoio financeiro e operacional do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação Oswaldo Cruz.

À minha Mãe, Ivanice dos Santos Galvão, de quem herdei o precioso hábito da leitura, origem de todo o meu interesse pela Ciência e a vida acadêmica.

A meu Pai, Francisco Galvão de Araújo, de quem herdei a vontade e a coragem de perseguir meus sonhos com honestidade e esmero.

Aos meus sete sobrinhos: Thayana, Thales, Lamartine Jr., Iramí Neto, Paula, Lucas e Júlia, razões da minha luta pela sobrevivência nesse mundo.

Ao meu Amigo do Exército Glalber Joate *“in memorian”*. Guerreiro e companheiro nas horas de sol e chuva... nas noites de lama, sede e fome... você me ensinou que a vida é rápida, assim... rápido como coisa de soldado.

*“Gostaríamos, muitas vezes, de pensar que nossas viagens de exploração
no mundo do conhecimento se fizeram com orientação precisa
ou que seguiram os ventos dominantes da erudição.
Entretanto, com freqüência, é a tormenta inesperada que nos impele para praias
insuspeitadas e nos leva a descobrir a América,
apesar de estarmos à procura das Índias”*

(Derek de Solla Price)

*“Algumas pessoas têm na beleza a sua forma de talento,
enquanto outras têm no talento
e na inteligência a sua forma de beleza”*

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A vida me presenteou com raros mestres. Cada um, no seu tempo e hora, plantou sementes definitivas em mim. Um deles, a mais generosa e minha orientadora, tranqüila com a carga do seu conhecimento, me dizia: “Nada é de graça!”.

Difícil agradecer a um mestre, então, prefiro agradecer a Deus por conceder-me o privilégio e a sorte de ter cruzado o seu caminho. Deixo então, o meu reconhecimento a Rita M Ribeiro Nogueira, pela orientação deste trabalho, confiança e interesse no nosso desenvolvimento científico.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão àqueles sem os quais esse trabalho não seria possível. A todos abaixo, solidários sempre, não poderia deixar de menciona-los.

Ao Dr. Hermann Gonçalves Schatzmayr, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis e de decisão, e pelo exemplo ímpar de amor a virologia, que nos enche de orgulho, motivando-nos a perguntar sempre mais.

A Dra. Ana Maria Bispo de Filippis, pioneira do PCR em tempo real em nosso laboratório, pela orientação, amizade e disponibilidade constante durante a realização deste trabalho.

A Dra. Constança Britto, pela oportunidade de realizar parte desta dissertação em seu Laboratório, pela confiança e revisão minuciosa deste trabalho. Agradeço também a todos do seu grupo em especial Maria Angélica Cardoso, pelos ensinamentos da técnica de PCR em tempo real, muitas vezes ficando até altas horas da noite esperando meus experimentos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz e as secretárias Eliete e Cleide, pela colaboração.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa .

A Dra. Ana Maria Coimbra Gaspar, Chefe do Departamento de Virologia - IOC, pela acolhida e disponibilizar seu computador, importante para a elaboração deste trabalho.

A Dra. Flávia Barreto dos Santos, pelos ensinamentos das técnicas moleculares, e pela paciência e disponibilidade em tirar minhas dúvidas.

A Márcia Gonçalves de Castro pela amizade e exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa científica.

Ao Dr. Pedro Hernan Cabello Acero, ex-Coordenador do Curso de Biologia Celular e Molecular, pela análise de nossos dados.

Ao Dr. Luiz Antônio Bastos Camacho pelas sugestões ao nosso banco de dados e análise estatísticas de nossos resultados.

A Tecnologista Eliane Saraiva Machado de Araújo pelo compromisso com o Laboratório de Flavivirus e pela amizade.

À Bióloga Monique da Rocha Queiroz, nossa guardiã da qualidade, pela amizade e apoio.

À Jaqueline, Gerusa, Nieli, Juliana, Fernanda, Thatiane, Denilde, Francisco, Leda e Aparecida pela amizade e apoio.

À Gisela Freitas Trindade, amiga e colaboradora desde os tempos de especialização, sempre disposta a contribuir e a compartilhar experiências, pela agradável convivência.

Ao Técnico José Farias Filho (Sr. Zeca) pela competência e dedicação a nossas culturas de células.

A Dra. Maria Genoveva Von Hubinger, Prof^a Adjunta do Departamento de Virologia da UFRJ, pelos ricos ensinamentos na área da Virologia.

Agradeço, Pai, por não permitires que a luz se apagasse, pelas mãos amigas que me foram estendidas, pelo desejo enorme de tomar as decisões certas, pelas decisões cheias de entusiasmos, pela coragem e perseverança que não me faltaram, pelo Amor com que me dedico ao aprendizado, por ter-me feito lúcido e livre como um pássaro, porém, firme como a mais firme das rochas.

RESUMO

Neste estudo são apresentados a implantação da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) para o vírus dengue tipo 3 (DENV-3), a qual constitui uma nova abordagem no diagnóstico de dengue no país. Esta técnica foi aplicada a 30 amostras de fígado provenientes de 28 casos fatais ocorridos durante a epidemia de dengue de 2002 no estado do Rio de Janeiro, sendo o vírus DENV-3 o único sorotipo identificado e admitido como o agente etiológico daquela casuística. A positividade dos casos por esta nova metodologia 64,2% (18/28), foi superior quando comparados a outras metodologias como o PCR convencional (RT-PCR) que confirmou 29,6% (8/27) e o isolamento viral 7,6% (2/26). Na mesma população a imunohistoquímica confirmou 63,6% (14/22) dos casos. Esses dados demonstram a importância do PCR em tempo real em tecidos na confirmação de casos fatais suspeitos de dengue e confirmou seis casos os quais resultaram negativos por outros métodos.

A Vigilância Viroológica no período 2004-2005 envolveu 839 casos suspeitos de dengue sendo confirmados 4% (34/839) considerando-se o isolamento viral e/ou RT-PCR. Considerando-se cada metodologia, o isolamento viral confirmou 0,4% (3/723) e o RT-PCR 3,8% (31/815). O DENV-3 foi o único sorotipo identificado no período 2004-2005. Entretanto, a maior circulação do vírus ocorreu em 2005 com dois surtos, um deles no município de Campos dos Goytacazes (Região Norte Fluminense) e o outro no município do Rio de Janeiro, com dois óbitos confirmados. A caracterização genética

das amostras confirmou o genótipo III, o mesmo circulante até o momento no estado do Rio de Janeiro.

ABSTRACT

In this study, the implantation of Real Time PCR (TaqMan™ System) for dengue virus type 3 (DENV-3) is presented, which constitutes a new approach to dengue diagnosis in Brazil. This technique was applied to 30 liver samples originating from 28 fatal cases occurring during the dengue epidemic of 2002 due to DENV-3 in Rio de Janeiro State. DENV-3 was the only serotype identified as the etiological agent of this casuistic. Positivity in 64.2% (18/28) of cases by this new methodology was higher when compared to other methodologies like conventional PCR (RT-PCR), which confirmed 29.6% (8/27), and viral isolation, 7.6% (2/26). In the same population, immunohistochemistry verified DENV-3 in 63.6% (14/22) of cases. These data demonstrate the importance of Real Time PCR on tissues in the confirmation of dengue fatal cases and confirmed six cases that showed negative results by the other methods.

Virological Surveillance involved 839 suspected dengue cases in the period 2004-2005, with 4% (34/839) confirmed considering viral isolation and/or RT-PCR. When considering each methodology, viral isolation confirmed 0.4% (3/723) and RT-PCR 3.8% (31/815). DENV-3 was the only serotype identified in the period 2004-2005. However, greater circulation of the virus occurred in 2005 with two outbreaks, one in the municipality of Campos dos Goytacazes (Northern Fluminense Region) and the other in the City of Rio de Janeiro, with two confirmed death. Genetic characterization of the samples showed genotype III, the same which is in circulation at present in Rio de Janeiro State.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

**Figura 1.1 – Partícula viral e composição esquemática dos DENV
.....04**

Figura 1.2 – Organização do genoma dos *Flavivirus*05

Figura 1.3 – Modelo de biossíntese das partículas de *Flavivirus*08

Figura 1.4 – Representação esquemática do genoma viral dos DENV09

Figura 1.5 – Representação esquemática da região promotora dos *Flavivirus*09

Figura 1.6 – Ciclos de transmissão e manutenção dos DENV.....15

Figura 3.1 – Estratégia utilizada para amplificação dos fragmentos sobrepostos de aproximadamente 500 pb da região prM, M e E pela RT-PCR e reação de sequenciamento41

Figura 3.2 – Estratégia de amplificação e iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™)
.....46

Figura 3.3 – Campo “ <i>Amplification plot</i> ”	48
Figura 3.4 – Campo “ <i>spectra</i> ”	49
Figura 3.5 – Campo “ <i>Component</i> ”	50
Figura 3.6 – Campo “ <i>Standard Curve</i> ”	51
Figura 4.1 – Teste de concentração de RNA. Perfil de amplificação do RNA do DENV-3 extraído quando eluído em 30 μ L (em verde) e 60 μ L (em vermelho) de AVE	54
Figura 4.2 – Teste do volume de 12,5 μ L (verde) e 25 μ L (vermelho) de Máster Mix	54
Figura 4.3 – Figura indicando as diluições 10 ⁵ , 10 ⁴ , 10 ³ , 10 ² , 10 ¹ antes e depois da extração do RNA viral.....	55
Figura 4.4 – Teste de sensibilidade. Curva de amplificação representada pela intensidade de fluorescência relativa (ΔR_n) contra o número de ciclos.....	56
Figura 4.5 – Curva padrão. O coeficiente de correlação foi mantido entre 0,97 e 1,0; e o “slope” abaixo de -3,5	56
Figura 4.6 – Reprodutibilidade dos experimentos de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™)	58
Figura 4.7 – Casos confirmados de DENV-3 por diferentes metodologias.....	59
Figura 4.8 – Contribuição de cada metodologia se considerada única na casuística para confirmação dos casos.....	60
Figura 4.9 – Cultura de células de mosquito <i>Ae. albopictus</i> clone C6/36 inoculada com soro agudo ou amostras de tecido fresco de paciente com suspeita de infecção pelos vírus dengue para isolamento viral	62

Figura 4.10 – Eletroforese em gel de agarose a 1% de produtos amplificados pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para tipagem dos DENV 63

Figura 4.11 – Distribuição mensal dos casos estudados suspeitos de DENV ocorridos no Estado do Rio de Janeiro durante o período de 2004 a 2005 64

Figura 4.12 – Distribuição dos DENV-3 no estado do Rio de Janeiro no período de 2004 – 2005..... 65

Figura 4.13 – (A) Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de RT-PCR. (B) Eletroforese em gel de agarose utilizado para quantificação dos produtos pós-purificados para a reação de sequenciamento e (C) Eletroferograma dos produtos submetidos ao sequenciamento.....66

Figura 4.14 – Análise filogenética das amostras seqüenciadas (regiões prM, M e E) (posição 437 a 2413) representantes dos DENV-3 circulantes nos anos 2004-2005 no estado do Rio de Janeiro67

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.1 – Critérios para a distinção do dengue clássico (DC) dos graus de febre hemorrágica do dengue (FHD)
..... 12

Tabela 3.1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV 35

Tabela 3.2 – Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR das regiões prM, M e E do DENV-3
.....40

Tabela 3.3 – Iniciadores utilizados para sequenciamento interno dos produtos da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa das regiões que codificam as proteínas de prM, M e E do DENV-340

**Tabela 3.4 – Preparo do Mix para a reação de “cycle sequence”
.....43**

Tabela 3.5 – Iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) aplicado nos DENV-3
.....45

Tabela 3.6 – Preparo do Mix para a reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™)
.....47

Tabela 4.1 – Comparação das curvas padrão diluindo o vírus (DENV-3) e o RNA antes e após a extração.....55

Tabela 4.2 – Teste de especificidade aplicado a técnica de PCR em tempo real para detecção do DENV-3
.....57

Tabela 4.3 – Detecção de DENV-3 em 30 amostras clínicas provenientes de 28 casos fatais por diferentes metodologias59

Tabela 4.4 – Distribuição mensal dos casos estudados por isolamento viral e RT-PCR durante o período de 2004 a 2005, provenientes de casos clínicos compatíveis com infecção por DENV, no estado do Rio de Janeiro61

Tabela 4.5 – Amostras submetidas ao sequenciamento nas regiões dos genes que codificam as proteínas prM, M e E dos DENV-3.....65

Tabela 7.1 – Protocolos de detecção dos DENV por PCR em tempo real.....78

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1.1 – Percentual de detecção dos DENV em amostras de fígado provenientes de casos humanos no mundo.....13

Quadro 3.1 – Reagentes utilizados na Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) 37

Quadro 3.2 – Concentração de DNA a ser utilizada de acordo com o tamanho do amplicom a ser seqüenciado43

Quadro 3.3 – Condições de termociclagem utilizadas para a reação de PCR em tempo Real (Sistema TaqMan™)47

Quadro 10.1 – Resultado da aplicação de diferentes metodologias para detecção de DENV-3 em 30 amostras clínicas de tecidos (fígado) provenientes de 28 casos fatais..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa Aminoácido
atm Atmosfera
BHE Barreira Hematocefálica
C6/36 Linhagem de cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*

CDC Center for Disease Control and Prevention

cDNAÁcido desoxirribonucléico complementar
cm Centímetro
Ct Ciclo de amplificação exponencial a partir do qual é detectado um aumento significativo da fluorescência acima do background
d.C. Depois de Cristo
DC Dengue Clássico
DENV Vírus Dengue
DNA Ácido desoxirribonucléico
dNTP Desoxirribonucleotídeo
DTT Dithiotreitol
ECP Efeito Citopático
EDTA Ácido etilenodiamiotetracético
EIA Enzyme Immune Assay
FHD Febre Hemorrágica do Dengue
g Grama
G/C Guanina/Citosina
gp Grupo
Hg Mercúrio
IF Imunofluorescência
IFI Imunofluorescência Indireta
IgG Imunoglobulina da Classe G
IgM Imunoglobulina da Classe M
kDa Kilodaltons
LCR Líquido Céfalo-Raquidiano

M Membrana
MAC-ELISA Ensaio Imunoenzimático para captura de anticorpos IgM
mL Mililitro
mM Milimolar
Mm³ Milímetro Cúbico

NC
Não-Codificante

ng Nanograma
nM Nanomolar
nt Nucleotídeo
OMS Organização Mundial de Saúde
OPAS Organização Pan Americana de Saúde
pb Pares de Bases
pM PicoMol
PBS Salina Fosfatada Tamponada
PCR Reação da Polimerase em Cadeia
PFU Unidade Formadora de Placa
pH Potencial Hidrogeniônico
prM Pré-Membrana
q.s.p. Quantidade Suficiente para
RNA Ácido Ribonucléico
RNAse Ribonuclease
rpm Rotações por Minuto
RT-PCR Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase
SBF Soro Fetal Bovino
SCD Síndrome do Choque por Dengue
SMS Secretaria de Saúde Municipal
SNC Sistema Nervoso Central
SVS/MS Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
TEB Tris/borato/EDTA
Tris Tris (hidroximetil) aminometano
μ Micrômetro

U Unidade de Atividade Enzimática
μL Microlitro
μM MicroMol
V Volts
WHO World Health Organization
°C Graus Centígrados

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO

.....	01
1.1 Histórico	02
1.2 Classificação	03
1.3 Morfologia	04
1.4 Características Físico-Químicas	04
1.5 Estrutura do Genoma	05
1.6 Replicação	05
1.7 Diversidade Genética	09
1.8 Dengue Clássico e Dengue Hemorrágico	10
1.9 Patogenia	13
1.10 Epidemiologia	14
1.10.1 Dengue nas Américas	16
1.10.2 Dengue no Brasil	17
1.11 Diagnóstico Laboratorial	19
1.11.1 Isolamento Viral e IFI	19
1.11.2 Testes Imunoenzimáticos e de Inibição de Hemaglutinação.....	19
1.11.3 Teste de Imunohistoquímica	20
1.11.4 RT-PCR (Sistema <i>Semi-Nested</i>)	20
1.11.5 PCR em tempo Real (Sistema TaqMan™)	21
1.12 Prevenção e Controle	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Amostras para PCR em tempo real.....	25

3.1.1	Amostra de DENV-3 para Curva Padrão	25
3.1.2	Amostras Clínicas	25
3.2	Amostras para Vigilância Viroológica	25
3.3	Tratamento de Vísceras	26
3.4	Isolamento Viral	26
Metodologia	26
Modo de Preparo das Soluções	27
3.5	Técnica de Imunofluorescência Indireta	28
Metodologia	28
Modo de Preparo das Soluções	30
3.6	Extração do RNA viral pelo Método da Sílica	31
Metodologia	32
Modo de Preparo das Soluções	32
3.7	Extração do RNA viral pelo Kit Qiagen	34
3.8	RT-PCR (<i>Sistema Semi Nested</i>)	35
Metodologia	35
	Modo de Preparo das Soluções	37
3.9	Sequenciamento dos DENV-3	39
3.9.1	Amplificação por RT-PCR para Sequenciamento	41
Purificação do Produto de RT-PCR	42
Quantificação do DNA	42
3.9.2	Sequenciamento dos Produtos de PCR	43
3.9.3	Análise de Seqüências e Filogenia	44
Modo de Preparo das Soluções	45
3.10	PCR em Tempo Real (<i>Sistema TaqMan™</i>)	45
Metodologia	46
Interpretação do Teste	47
Modo de Preparo das Soluções.....	51
3.11	Imunohistoquímica	52
3.12	Análise e Banco de Dados	52
4.	RESULTADOS	53

4.1 Implantação da Técnica de PCR em Tempo Real (Sistema TaqMan™) para para o DENV-3	53
4.1.1 Teste de Sensibilidade	55
4.1.2 Teste de Especificidade	57
4.1.3 Reprodutibilidade dos Experimentos	57
4.2 Aplicação da Técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) em amostras de fígado provenientes de casos fatais de DENV-3.....	58
4.3 Vigilância Viroológica do dengue no estado do Rio de Janeiro no período 2004-2005.....	60
4.3.1 Isolamento e Identificação dos sorotipos	60
4.3.2 Caracterização Genética dos sorotipos isolados	65
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÕES	76
7. PERSPECTIVAS.....	78
8. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS ÉTICOS	80
9. LISTA DE REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
10. ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

O estado do Rio de Janeiro, como importante centro turístico, principalmente nos meses de verão, tem sido de grande importância epidemiológica para a introdução e dispersão dos vírus dengue no Brasil. A atividade desses vírus tem sido caracterizada pela ocorrência quase anual de epidemias em diferentes municípios, o que tem mantido um número elevado de casos notificados no estado (Nogueira *et al.*, 1999a; 2005). A introdução do DENV-3 (genótipo III) em dezembro de 2000 neste estado causou um grande impacto sobre a população. Este genótipo é associado a epidemias de DH/SCD no Sri Lanka e Índia e casos de DH no México e países da América Central (Figueroa & Ramos, 2000).

As limitadas opções de controle do dengue tornam a vigilância epidemiológica um dos principais instrumentos para se prevenir surtos ou extensas epidemias (Gubler, 1989). Neste contexto, o laboratório exerce um papel fundamental atuando constantemente no monitoramento destas infecções.

A vigilância virológica através de métodos rápidos de diagnóstico e a caracterização molecular das amostras circulantes, têm como objetivo detectar a introdução de novos sorotipos e/ou genótipos (Nogueira *et al.*, 1999b). Devido à associação genótipo/virulência, a detecção precoce de uma nova variante pode repercutir nas medidas de controle, diminuindo o impacto desta doença.

Diferentes protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções por (DENV).

A implantação e aplicação de novas técnicas moleculares com maior sensibilidade e especificidade, principalmente nos casos graves da doença, possibilitam aumentar o limiar de detecção viral, na confirmação de casos fatais de forma rápida e precisa.

Nesse contexto, apresentamos neste trabalho dois aspectos: a implantação da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) para o DENV-3 e sua aplicação em amostras de fígado de casos fatais ocorridos na epidemia de dengue em 2002 no estado do Rio de Janeiro; e o monitoramento do dengue no período de 2004-2005 com a caracterização genética das amostras isoladas.

1.1 Histórico

Uma Enciclopédia Chinesa publicada na Dinastia de Chin, 265 a 420 d.C. e reeditada em 990 d.C apresenta relatos compatíveis com dengue, reforçando a origem asiática da doença. Na ocasião, a doença foi denominada de “veneno da água” sendo associada a insetos voadores e a água (Gubler, 1998; Burke & Monath, 2002).

O nome “dengue” foi atribuído a doença a partir do Século XIX em virtude da aparência dos enfermos. Várias versões foram dadas à palavra dengue, atribuindo a origem africana, que em Swahile, a expressão *Ka dinga pepo* significa “pancada ou golpe causado por um espírito mau que provocava um ataque doloroso” (Halstead, 1971).

Em 1828, o termo dengue foi introduzido na literatura médica inglesa e em 1869, foi adotado pelo Colégio Real de Medicina de Londres (Halstead 1980).

A ocorrência simultânea de surtos em Jakarta (ilha de Java), em Alexandria e Cairo (Egito) e na Filadélfia (USA) durante os anos de 1779-80 (apud Siler *et al.*, 1926), sugere que seus agentes e mosquitos vetores tiveram uma dispersão mundial nos trópicos, por mais de 200 anos (Burke & Monath, 2002).

A transmissão do dengue por mosquitos (*Culex fatigans*) foi sugerida em 1903 por Graham e em 1907, Bancroft atribuía este papel ao *Stegomyia fasciata*, antiga denominação do *Aedes aegypti* (Graham, 1903; Bancroft, 1907).

Ashburn & Craid (1907) foram os primeiros a demonstrar experimentalmente a presença de vírus infectante na circulação sanguínea, admitindo que a doença era causada por um organismo filtrável de tamanho ultramicroscópico, após descartarem o envolvimento de bactérias e/ou protozoários e reproduzirem a doença em voluntários saudáveis. Em 1916, John Barton Cleland, em trabalhos experimentais com voluntários humanos na Austrália, confirmou a hipótese de Bancroft, tendo falhado suas tentativas utilizando o *Culex fatigans* como transmissor do dengue (apud Siler *et al.*, 1926).

Dez anos depois nas Filipinas, Siler, Hall e Hitchens chegaram aos mesmos resultados de Cleland (Siler *et al.*, 1926). Também nas Filipinas, James Stevens Simmons em 1930 induziu dengue experimentalmente em voluntários usando o *Aedes albopictus* (Simmons *et al.*, 1931).

Na Grécia, entre junho e outubro de 1928, durante uma grande epidemia, ocorreram casos com hemorragia, alguns deles fatais. Estudos realizados décadas depois em pessoas que viveram aquele episódio sugeriram a circulação simultânea dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 (Rezende, 1997).

O isolamento das primeiras amostras de dengue ocorreu durante a Segunda Grande Guerra Mundial quase simultaneamente por pesquisadores japoneses e americanos, com o isolamento da cepa Mochizuki em 1943 (Kimura e Hotta, 1944) e em 1944, Sabin isolou as cepas Havaí e a Nova Guiné (Sabin & Schelinger, 1945). Ao

constatar a existência de características antigênicas diferentes, passou a denominá-las respectivamente sorotipo 1 e sorotipo 2 (Sabin, 1952), consideradas atualmente como protótipos.

Posteriormente, dois novos vírus sorologicamente relacionados foram isolados durante uma epidemia de dengue hemorrágico (DHF) ocorrida em Manila em 1956. Estes vírus foram classificados como DENV-3 e DENV-4 (Hammon et al., 1960) e as cepas H87 (DENV-3) e H241 (DENV-4) consideradas protótipos.

1.2 Classificação

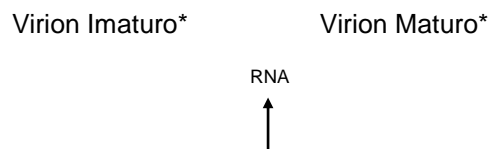
Do ponto de vista epidemiológico, os vírus dengue (DENV) são classificados como arbovírus, sendo mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, sendo o homem, o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção (Gubler, 2002).

Atualmente, os DENV pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, que reúne mais de 70 espécimes e 8 grupos sorologicamente relacionados (4 transmitidos por mosquitos, 2 por carrapatos e 2 sem vetores) e um grupo de vírus que não se classifica dentro destes sorogrupos por neutralização, onde inclui o vírus da febre amarela (Westaway et al., 1985; Burke & Monath, 2001).

São vírus RNA fita simples, polaridade positiva e com propriedades antigênicas distintas, caracterizando quatro sorotipos específicos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Sabin, 1952; Hammon et al., 1960; Westaway et al., 1985).

1.3 Morfologia

São vírus esféricos, envelopados e com cerca de 40 a 50 nanômetros de diâmetro. O virion consiste de RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade positiva e envolto por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, composto por uma única proteína, a proteína de capsídeo (C) e circundada por uma bicamada lipídica associada às proteínas de membrana (M) e envelope (E) (Figura 1.1).



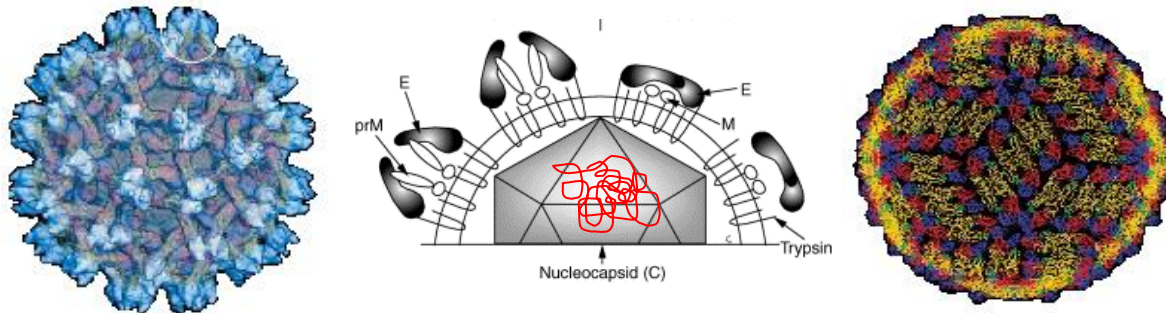


Figura 1.1: Partícula viral e composição dos DENV. Partícula imatura com projeções (à esquerda). À direita, partícula madura lisa e ao centro a composição esquemática dos DENV (M – Proteína de membrana, prM – Proteína pré-membrana, E – Proteína de envelope). As cores representam domínios diferentes (adaptado de Heinz & Allison, 2001; Kuhn *et al.*, 2002 e Mackenzie *et al.*, 2004).

1.4 Características físico-químicas

A densidade de flutuação dos *Flavivirus* é de 1.22 – 1.24 g/cm em Cloreto de Césio e 1.18 – 1.20 g/cm em sacarose. O coeficiente de sedimentação para os DENV em sacarose é de 175-218 S (Brinton, 1986).

Os vírus são rapidamente inativados a 50°C com infectividade decrescendo 50% a cada 10 minutos nesta temperatura. E também sensível à inativação por raios ultravioletas, detergentes iônicos e não iônicos e digestão por tripsina. A infectividade dos DENV é mais estável em pH 7 a 9 e mantendo-se por 5 anos a –70°C ou liofilizado e conservado a 4°C (Guzman, 1980; Brinton, 1986).

1.5 Estrutura do genoma

O ssRNA de polaridade positiva é infeccioso, portando-se como um RNA mensageiro (RNAm) quando utilizado em experimentos em condições adequadas. O genoma dos *Flavivirus* possui cerca de 11.000 nucleotídeos (nt) e apenas uma fase aberta de leitura (*ORF*) codificando uma poliproteína que é posteriormente clivada em proteínas estruturais (C, prM, M e E) e não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (Chambers *et al.*, 1990) (Figura 1.2).

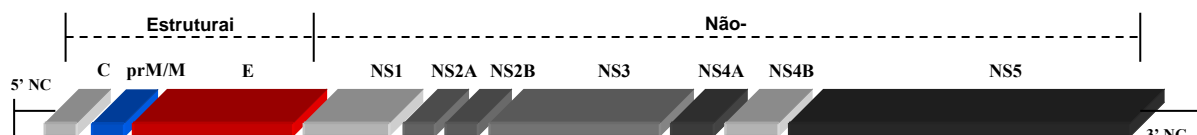


Figura 1.2: Organização do genoma dos Flavivirus (adaptado de Chambers *et al.*, 1990).

1.6 Replicação

As células-alvo de infecções pelos DENV “*in vivo*” incluem macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e linfócitos (Bhamarapavati *et al.*, 1967; Boonpucucknavig *et al.*, 1979; Yoksan & Bhamarapavati, 1983; Kurane *et al.*, 1991; King *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). Em 2000, Wu e colaboradores demonstraram a replicação dos DENV em células de Langerhans, células dérmicas e dendríticas intersticiais (Wu *et al.*, 2000).

O RNA genômico dos DENV apresenta uma “ORF”, flanqueada por regiões não codificantes de 118 e 565 bases nos terminais 3’ e 5’, respectivamente. A tradução dessa ORF resulta numa poliproteína de aproximadamente 350Kda que, enquanto está sendo produzida, é clivada seletivamente tanto por proteases celulares, quanto pelas proteases neo-formadas codificadas pelo genoma viral (Chambers *et al.*, 1995; Yamshchikov & Compans, 1995; Bredenbeek *et al.*, 2003). Resultam dessa clivagem, três proteínas estruturais (C, prM (M) e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Rice *et al.*, 1985; Stocks & Lobigs, 1995), que serão utilizadas pelas células na construção de novos virions.

O processo de interação vírus-célula tem início com a ligação do DENV a receptores presentes na superfície celular do hospedeiro, endocitose das partículas virais, que é mediada pela rede de clatrin, formando a vesícula endocítica. À medida que a vesícula vai sendo transportada, seu interior é gradualmente acidificado. Ao atingir a faixa de pH 6.2 – 6.0 (Post, 1996), ocorre uma mudança conformacional das proteínas E do envelope viral. Essa mudança conformacional desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana da vesícula endocítica (Monath & Heinz, 1996; Rice, 1996), e subsequente liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula. Nesse ambiente, o genoma viral é traduzido como um RNAm da célula numa atividade poliribossomal, inicialmente livre no citoplasma, dando início à síntese da proteína C.

Continuando a tradução do RNA viral (RNA_v), quando são incorporados os aminoácidos hidrofóbicos da seqüência sinal da poliproteína, esta seqüência é reconhecida pela proteína reconhecedora de sinal (PRS) constitutiva da célula. A PRS interage com o complexo formado pelo peptídeo nascente, ribossoma e RNAm e bloqueia a tradução, enquanto desloca o conjunto até encontrar o seu receptor (receptor de proteína reconhecedora de sinal – RPRS). Esse receptor está ancorado na face citoplasmática do retículo endoplasmático. A síntese da proteína continua e o transporte é iniciado para o lúmen do retículo (Albert *et al.*, 1994; Lehninger *et al.*, 1997).

As proteínas NS2B e NS3 neo-formadas, agregam-se em heterodímeros com atividade de serina protease que, clivando a extensão subsequente da poliproteína, liberam as NS4A, NS4B e NS5. Os domínios conservados na região N-terminal da proteína NS5 são reconhecidos pela proteína NS3, para a formação de um complexo que, em seguida, interage com a proteína NS2A. Quando ligada ao complexo, a proteína NS2A é capaz de reconhecer a porção 3’NC do RNA viral (RNA_v). O complexo NS2A-RNA-NS3-NS5 é transportado até à membrana do

retículo endoplasmático onde está inserida a proteína NS4A que, por sua vez, está associada à proteína NS1 (Lindenbach & Rice, 1997; 1999). Como consequência da interação dessas proteínas, ocorre a alteração alostérica na proteína NS5, provavelmente, no domínio de interação com o RNA, dando origem ao chamado complexo de replicação (RC). O RC promove a síntese de novas moléculas de RNA.

Os novos RNA_v produzidos, depois de traduzidos, geram proteínas que se acumulam. Dentre essas, a proteína C que, devido à sua natureza altamente básica, interage com os RNA_v, formando as estruturas precursoras dos nucleocapsídeos (Rice, 1996). Essas, por sua vez, são deslocadas para a membrana do complexo de Golgi. Nesse processo de construção dos DENV, os nucleocapsídeos neo-formados interagem com as espículas prM e E, que estão inseridas na membrana dessa organela, com imediata liberação das novas partículas para o lúmen do complexo de Golgi (Beeck *et al.*, 2003; Mackenzie & Westaway, 2001) ou para o interior das vesículas pós-Golgi. As proteínas prM e E foram instaladas no retículo endoplasmático sob a forma de dímeros (Allison *et al.*, 1995; Wengler & Wengler, 1989; Murphy, 1980). A clivagem de prM em M parece ser catalisada nas vesículas pós-Golgi (Muylaert *et al.*, 1997), por proteases do tipo furina ou de atividade semelhante (Stadler *et al.*, 1997). Essa clivagem distingue os virions das partículas de vírus incompletas (Shapiro *et al.*, 1972).

As partículas virais, assim neo-formadas, são transportadas em vesículas até à membrana plasmática e, por processo semelhante à exocitose, são liberadas para o ambiente extracelular (Figura 1.3).

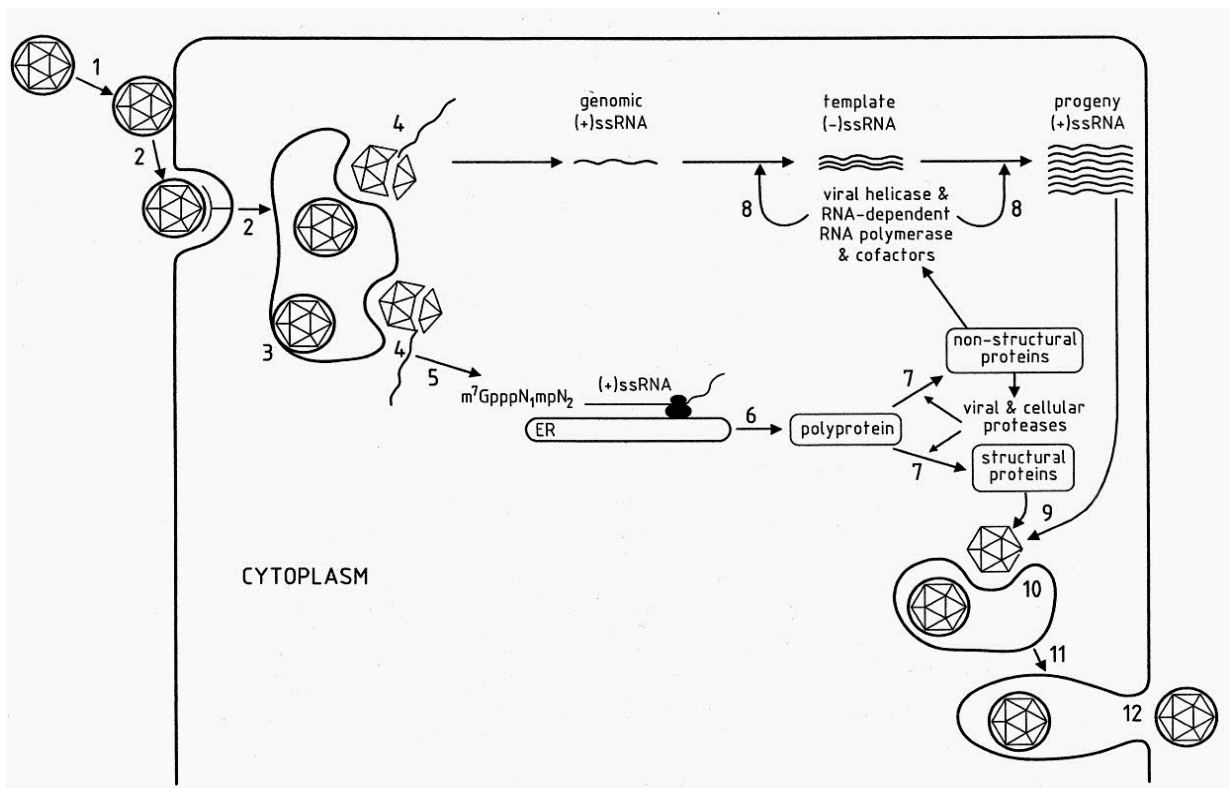


Figura 1.3: Modelo de biossíntese das partículas dos *Flavivírus*.

A análise da seqüência nucleotídica e da provável estrutura secundária da região não codificante (NC), do terminal 3' do RNAv, revelou a existência de uma seqüência conservada de aproximadamente 90 bases em forma de *hairpin* (Brinton *et al.*, 1986; Hahn *et al.*, 1987) (Figura 1.4).

A necessidade dessa estrutura para a replicação viral foi demonstrada por Bredenbeek *et al.* (2003), com experimentos de deleção. Próximo à região do *hairpin*, do genoma dos flavivírus, existem duas regiões conservadas, denominadas CS1 (26nts) e CS2 (24nts), separadas entre si por 22 nucleotídeos. Todos os flavivírus apresentam uma região conservada, denominada CS, que está localizada poucos nucleotídeos depois do códon inicial da tradução.

Hahn *et al.* (1987) relataram a existência de uma complementariedade entre as seqüências conservadas dos terminais 5'(CS) e a 3'(CS1), resultando na interação intramolecular no RNA dos flavivírus, com a ciclização do RNAv em uma estrutura semelhante a uma *panhandle* (Figura 1.5). Os mesmos pesquisadores sugeriram que essa estrutura estaria envolvida na modulação da tradução dos genomas virais, em células infectadas por flavivírus.

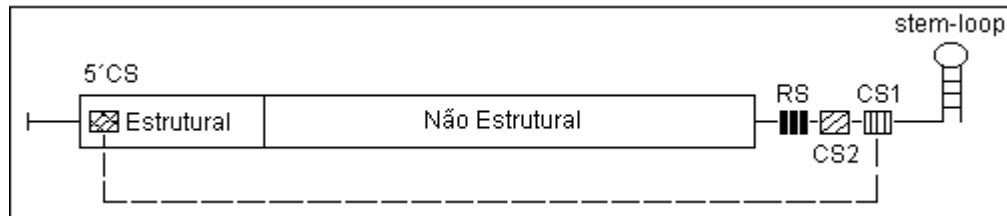


Figura 1.4: Representação esquemática do genoma viral dos DENV. Os retângulos maiores representam a *ORF* codificado as proteínas estruturais e não estruturais. Os retângulos com o interior rachurado representam as seqüências conservadas (CS) nos terminais 3' e 5'. Os retângulos pretos representam as seqüências repetidas (Adaptado de Bredenbeek *et al.*, 2003).

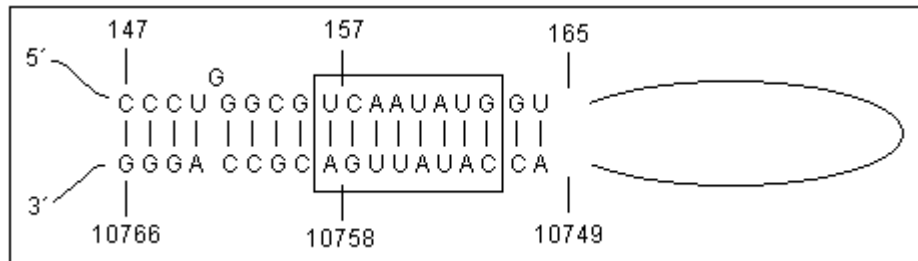


Figura 1.5: Representação esquemática da região promotora dos flavivírus. O core de oito nucleotídeos que são conservados, entre todos os flavivírus, está marcado por um retângulo (Adaptado de Corver *et al.*, 2003).

1.7 Diversidade genética

Admite-se que os vírus dengue tenham sido originados na Ásia, pela presença dos quatro sorotipos virais observada em humanos e em macacos, e pelo relacionamento filogenético de amostras selvagens (Wang *et al.*, 2000). Um ancestral selvagem teria divergido nos quatro sorotipos virais reconhecidos e a transmissão destes para humanos teria ocorrido independentemente em um passado recente há aproximadamente 1000 anos (Wang *et al.*, 2000, Holmes & Twiddy, 2003).

Baseados nas diferenças genéticas detectadas inicialmente por *fingerprinting* (Trent *et al.*, 1983) e, mais recentemente, por sequenciamento parcial do genoma, os quatro sorotipos de DENV foram agrupados em diversos genótipos (Rico-Hesse, 1990; Lanciotti *et al.*, 1994; 1997).

Através do sequenciamento parcial do genoma, os quatro sorotipos de DENV foram agrupados em diversos genótipos (Rico-Hesse *et al.*, 1990; 2003; Lanciotti *et al.*, 1994; 1997). O sequenciamento de 240 nucleotídeos da junção E/NS1 caracterizou, inicialmente cinco grupos genômicos para os DENV-1 e cinco para os DENV-2 (Rico-Hesse, 1990). A caracterização de quatro genótipos para DENV-3 foi demonstrada através do sequenciamento dos genes que codificam as proteínas prM, M e E, enquanto que apenas dois genótipos foram caracterizados com o sequenciamento completo do gene E (Lanciotti *et al.*, 1994; 1997).

Recentemente, na tentativa de esclarecer e unificar a atual classificação dos genótipos de dengue dentro de cada sorotipo, Rico-Hesse (2003) realizou a filogenia dos quatro sorotipos utilizando a análise dos nucleotídeos da região completa do gene E e descreveu 5 genótipos para DENV-1, 4 genótipos para DENV-2, 4 genótipos para o DENV-3 e 3 genótipos para DENV-4.

1.8 Dengue Clássico e Dengue Hemorrágico

As características clínicas variam em intensidade de acordo com as características do hospedeiro e do vírus. O período de incubação é em média de 4 a 7 dias. As infecções pelos DENV apresentam um amplo espectro clínico, variando desde infecções assintomáticas a formas graves denominadas febre hemorrágica do dengue e síndrome do choque por dengue (FHD/SCD). A maioria dos pacientes apresenta a forma branda da doença, conhecida como dengue clássico (DC) (WHO, 1997).

A fase aguda da doença pode variar de 3 a 7 dias, mas a fase de convalescença pode ser prolongada por semanas e pode estar associada a fraqueza e/ou depressão, especialmente nos adultos. Ao final do quadro febril, exantema com aspecto maculopapular pode ser observado em 30% dos casos, às vezes com aparência escarlatiniforme nas áreas de confluência acompanhado de prurido generalizado. Descamação nas regiões palmares e plantares podem ocorrer (Gubler, 1998; Souza, 1992).

Figueiredo (1994) estudando 10 crianças cujas mães tiveram dengue na gravidez não encontraram evidências de infecção congênita.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a FHD apresenta-se com diferentes graus de gravidade: I, II, III e IV e é caracterizada por uma diátese hemorrágica, aumentando a permeabilidade vascular e hipovolemia.

Laboratorialmente caracteriza-se por apresentar contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³ e hemoconcentração, refletida por um aumento de 20% do hematócrito.

Os graus I e II são considerados formas mais brandas da FHD, enquanto os graus III e IV representam a evolução da doença para o estágio de choque (WHO, 1997).

A Síndrome do Choque por Dengue (SCD) resulta em uma perda crítica do plasma com sinais de insuficiência circulatória tais como: pele fria e congestionada, inquietação e baixa pressão do pulso (<20 mm Hg). O choque é curto e pode levar o paciente a óbito em um período de 12 a 24 horas, caso não seja iniciado o tratamento apropriado. A convalescença de pacientes com FHD/SCD é rápida e sem maiores complicações (WHO, 1997).

Os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para a distinção de DC e os quatro graus de FHD estão resumidos na Tabela 1.1

Tabela 1.1: Critérios para a distinção do dengue clássico (DC) dos graus de febre hemorrágica do dengue (FHD).

	Extravasamento do plasma ¹	Plaquetas (µl)	Insuficiência circulatória	Teste do torniquete	Sangramento
DC	Ausente	Variável	Ausente	Variável	Às vezes
FHD grau I	Presente	< 100.000	Ausente	Positivo	Ausente
FHD grau II	Presente	< 100.000	Ausente	Positivo	Presente
FHD grau III	Presente	< 100.000	PP ² < 20mmHg	Variável	Às vezes
FHD grau IV	Presente	< 100.000	PA ³ não detectável	Variável	Às vezes

¹ Identificado por um hematócrito 20% acima do normal.

² Pressão do pulso.

³ Pressão arterial.

Apesar do DC e da FHD se apresentarem como as manifestações mais freqüentes das infecções por dengue, outras manifestações tornaram-se mais evidentes nos últimos anos. O envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) e as alterações hepáticas resultantes de infecções pelos DENV têm sido descritos como manifestações não usuais, ocorrendo nas formas clássica e hemorrágica da doença (Chimelli *et al.*, 1990; Lum *et al.*, 1993, 1996; Patey *et al.*, 1993; Row *et al.*, 1996; Miagostovich *et al.*, 1997; Angibaud *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2002). Elevação dos níveis séricos das aminotransferases (AST e ALT) e falência hepática fulminante foram demonstradas (Kuo *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2005).

O percentual de detecção dos DENV em amostras de fígado provenientes de casos humanos no mundo varia de 14 - 90% (quadro 1.1).

Quadro 1.1 Percentual de detecção dos DENV em amostras de fígado em casos humanos no mundo.

<i>Autor</i>	<i>Local</i>	<i>%</i>
Songco <i>et al.</i> (1987); Hayes <i>et al.</i> (1988)	Filipinas	14
Eram <i>et al.</i> (1979)	Indonésia	19
Kouri <i>et al.</i> (1989)	Cuba	35
Samsi <i>et al.</i> (1990)	Jakart	53
Srivastava <i>et al.</i> (1990) e Kabra <i>et al.</i> (1992)	Índia	75
Technical Advisory Committee for the South, East, and Western Pacific Regions (1980)	Tailândia	90

1.9 Patogenia

A inexistência de um modelo animal que reproduza clinicamente a infecção tem dificultado a compreensão da patogenia do dengue, levando a hipóteses que tentam associar diferentes fatores de risco à gravidade da doença. Embora nenhuma destas hipóteses sejam excludentes, a mais aceita é a teoria da infecção seqüencial, também conhecida como “*teoria immune-enhancement*”, que preconiza uma associação entre infecções secundárias e o aparecimento de FHD/SCD (Halstead, 1988; Thein *et al.*, 1997; McBride & Bielefeldt-Ohmann, 2000; Vaughn *et al.*, 2000).

Segundo Halstead (1988), a formação de imunocomplexos entre o sorotipo viral infectante e anticorpos heterólogos da classe IgG existentes em níveis sub-neutralizantes de uma infecção anterior, facilitariam a infecção.

Estes complexos, ao serem reconhecidos e internalizados por fagócitos mononucleares, resultariam na infecção celular e replicação viral. Essas células infectadas liberariam na corrente sanguínea mediadores vasoativos capazes de aumentar a permeabilidade vascular, ativação do sistema complemento e da tromboplastina tissular.

Casos de FHD/SCD resultantes de infecções primárias tem sugerido que variações da virulência entre amostras de DENV poderiam ser responsáveis pela variabilidade na expressão clínica da doença (Rosen, 1977).

Fatores de risco individuais, epidemiológicos e virais também têm sido considerados na patogenia do dengue. A hipótese integral, proposta por Kouri *et al.* (1987), sugere que a interação entre esses fatores determinem as condições para o aparecimento das formas mais graves da doença.

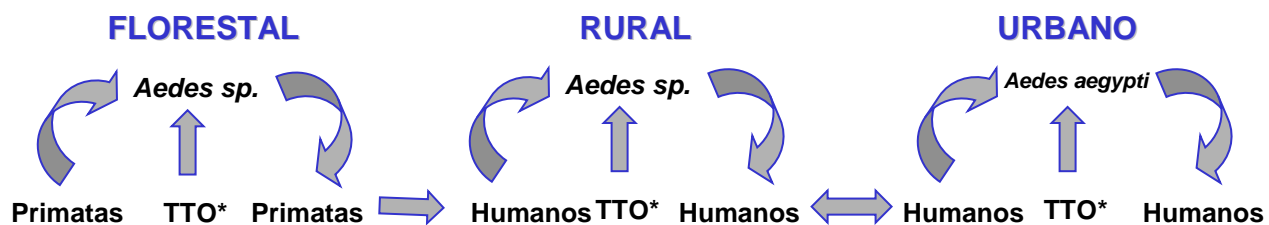
1.10 Epidemiologia

O dengue é a arbovirose humana de maior importância médica no mundo em termos de morbidade e mortalidade, com aproximadamente 3 bilhões de pessoas expostas ao risco de infecção possuindo caráter endêmico em cerca de 100 países de clima tropical e subtropical (Gubler, 1998).

A prevalência global dessa doença cresceu exponencialmente nas últimas décadas. As estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que pode haver de 50-100 milhões de casos de infecções causadas pelos DENV em todo o mundo, resultando em 250.000 a 500.000 casos de Dengue Hemorrágico (DHF) e 24.000 mortes por ano (Gibbons & Vaughn, 2002; WHO, 1997).

Existem três grupos de hospedeiros naturais para os DENV: o homem, primatas inferiores e mosquitos do gênero *Aedes*. O homem é o único hospedeiro conhecido que desenvolve a expressão clínica da infecção. Já os primatas inferiores (Chimpanzés, macacos ou outros primatas não humanos) quando infectados experimentalmente, desenvolvem viremia, mas não apresentam qualquer sintoma da doença (Gubler, 1998).

Os principais vetores do gênero *Aedes* incluem espécies dos sub-gêneros *Stegomyia*, *Finlaya* e *Diceromyia* que estão envolvidos em diferentes ciclos de transmissão rural e florestal enzoótico dos vírus (Gubler, 1998) (Figura 1.6).



* Transmissão Transovariana (TTO)

África (<i>Ae. diceromyia</i> e <i>Ae. stegomyia</i>)	<i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	<i>Ae. aegypti</i>
Ásia (<i>Ae. finlaya</i> e <i>Ae. stegomyia</i>)	<i>Ae. polynesiensis</i> e <i>Ae. mediovittatus</i>	
Américas (<i>Aedes</i> sp.)		

Figura 1.6: Ciclos de transmissão e manutenção dos vírus dengue (adaptado de Gubler, 1998).

O *Aedes aegypti* devido a seus hábitos domésticos, é a espécie mais importante na transmissão dos DENV no homem, estando associado a epidemias explosivas de DC e FHD. É altamente antropofílico e se alimenta repetidamente durante toda sua vida, funcionando como um excelente vetor (Knight & Stone, 1977).

A transmissão dos DENV se dá através da fêmea, durante o repasto sanguíneo. A fêmea pica o homem preferencialmente durante o dia e faz posturas parciais, podendo produzir vários focos (Halstead, 1984).

Os recipientes artificiais abundantemente proporcionados pela moderna sociedade industrial são os mais importantes criadouros de *Ae. aegypti*, sendo essenciais para o desenvolvimento e manutenção de grandes populações deste mosquito.

Identificado no Brasil em 1986 no estado do Rio de Janeiro, o *Aedes albopictus* pela sua capacidade de sobreviver tanto no ambiente silvestre quanto no urbano e periurbano, torna-se uma preocupação embora não tenha até o momento sido comprovado como vetor de dengue no Brasil.

1.10.1 Dengue nas Américas

No continente americano, as primeiras epidemias de dengue foram registradas a partir de 1896, embora os sorotipos envolvidos nestas epidemias só fossem conhecidos em 1953, quando foram isoladas as primeiras amostras de DENV-2 em Trinidad (Anderson *et al.*, 1956). Dez anos depois, foram isoladas as primeiras amostras de DENV-3 em Porto Rico, sendo estes dois sorotipos responsáveis pelas epidemias ocorridas no continente durante a década de 60 (Gubler, 1992).

Em 1977, o DENV-1 foi introduzido na Jamaica causando uma pandemia que se expandiu por todas as Ilhas do Caribe, países das Américas Central e do Sul. No

período entre 1977 e 1980, foram notificados mais de 700.000 casos da doença, praticamente todos estes causados pelo DENV-1 (PAHO, 1989).

No mesmo período, o DENV-3 apresentou pouca atividade na região com o último isolamento ocorrido em 1978 em Porto Rico (Anonymus, 1995).

Em 1981, o DENV-4 foi introduzido no continente americano, em São Bartolomeu, causando surtos no Caribe, México, países da América Central e América do Sul, tornando-se endêmico na região (Pinheiro, 1989).

Neste mesmo ano, uma nova variante do DENV-2 foi introduzida no continente americano, causando em Cuba, a primeira epidemia de FHD/SCD das Américas (Kouri *et al.*, 1986; Pinheiro & Corber, 1997). Nesta epidemia foram notificados cerca de 344.000 casos, com 116.000 internações e 158 óbitos (Kouri *et al.*, 1986).

Nos anos 80 ocorreu uma expansão da área de transmissão, aumento de casos notificados e neste período circularam nas Américas os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-4. No Brasil, Bolívia, Equador, Paraguai e Peru foram notificados epidemias explosivas, depois de várias décadas sem a presença desta doença (Gubler, 1993; PAHO, 1997).

No período de 1989 a 1990, ocorreu na Venezuela a segunda maior epidemia de FHD/SCD das Américas, com cerca de 22 mil casos notificados com a co-circulação dos DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (PAHO, 1997; Pinheiro & Chuit, 1998).

A década de 90 foi caracterizada por epidemias de DC e/ou FHD/SCD, que afetaram cerca de 25 países do continente americano (Pinheiro & Chuit, 1998).

No ano de 1994, o DENV-3 foi re-introduzido na Nicarágua e Panamá e, em 1995, no México (PAHO, 1997). Esta variante de DENV-3 mostrou-se geneticamente distinta daquela que anteriormente circulava nas Américas (genótipo IV) e foi caracterizada como genótipo III (Lanciotti *et al.*, 1994; Anonymus, 1995).

Este genótipo foi associado à ocorrência de epidemias de FHD/SCD no Sri Lanka e Índia e casos de FHD no México e países da América Central (Gubler 1997; Gubler & Meltzer, 1999). Nos anos seguintes, o DENV-3 se espalhou para outros países do continente, chegando à América do Sul inclusive ao Brasil (Pinheiro & Corber, 1997; Rigau-Perez *et al.*, 2002).

1.10.2 Dengue no Brasil

A erradicação do *Ae. aegypti*, alcançada em 1955, após uma intensa campanha iniciada em 1940, determinou a ausência de registros de casos de dengue no Brasil até a década de 80 (Franco, 1961).

A re-infestação do *Ae. aegypti* no país em 1977, a pandemia de DENV-1 e a introdução do DENV-4 no continente americano resultaram na re-introdução dos DENV no Brasil.

Em 1981 em Boa Vista (RR) ocorreu um surto de dengue, onde foram isoladas as primeiras amostras de DENV-1 e DENV-4, e um total de 7.000 casos da doença foram notificados (Osana *et al.*, 1983).

Após um período de 5 anos sem ser notificado no país, o DENV-1 causou uma epidemia com início no mês de abril no município de Nova Iguaçu, (RJ) com 1 milhão de casos estimados (Schatzmayr *et al.*, 1986)

O intenso movimento humano permitiu a rápida dispersão do vírus, avançando neste mesmo ano para os estados de Alagoas e Ceará e no ano seguinte, para os estados de São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco e Bahia (Figueiredo, 1996).

A situação no país foi agravada pela introdução do DENV-2 em Niterói (RJ) no ano de 1990, quando foram notificados os primeiros casos de FHD/SCD (Nogueira *et al.*, 1990; 1991).

A dificuldade de se implantar uma política nacional eficaz de combate ao vetor, resultou em uma rápida dispersão deste sorotipo pelo país que foi evidenciada pela ocorrência de epidemias nos estados de Tocantins e Alagoas (1991) e posteriormente, nos estados da Bahia e Ceará (1994), Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Mato Grosso do Sul (1995) e São Paulo (1996) (Vasconcelos *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1995; Figueiredo, 1996; Cunha *et al.*, 1999).

Em 1998, o DENV-3 foi isolado de um caso importado na cidade de Limeira, estado de São Paulo, (Rocco *et al.*, 2001) sem repercussão epidemiológica.

Em dezembro de 2000, este sorotipo foi isolado no município de Nova Iguaçu (RJ) sendo o responsável pela maior e mais grave epidemia de dengue do país no ano de 2002 (Nogueira *et al.*, 2001).

Com epidemias ocorrendo quase que anualmente desde 1986, mais de 3 milhões de casos foram registrados no Brasil, resultantes de epidemias de DENV-1, DENV-2, e mais recentemente, DENV-3 (Figueiredo, 1996; Da Silva Jr *et al.*, 2002).

Atualmente, 25 das 27 Unidades Federativas já registraram epidemias de dengue sendo que em 24 delas, a presença do DENV-3 foi evidenciada (FUNASA, 2006).

No ano de 2002 o Brasil notificou mais de 700.000 casos de dengue, e desse total 288.245 correspondem aos casos no estado de Rio de Janeiro, que sofreu a mais grave epidemia. Naquele ano, 1831 casos de DH e 91 óbitos foram confirmados. Este total excedeu o número de casos notificados de DH e óbitos em um período de 20 anos desde a introdução do dengue no país (Nogueira *et al.*, 2005). Esse novo sorotipo modificou sobremaneira a epidemiologia do dengue no país, com características de hiperendemicidade.

Um fato novo observado durante a epidemia de 2002 foi a apresentação de formas graves e óbitos em menores de 15 anos, bem como casos fatais em infecções primárias (Nogueira *et al.*, 2005).

O monitoramento contínuo dos vírus isolados tem confirmado apenas um genótipo de cada sorotipo no país, e a mesma situação tem sido observada até o momento (Nogueira *et al.*, 2005).

1.11 Diagnóstico Laboratorial

Os métodos de diagnóstico laboratorial mais amplamente utilizados envolvem o isolamento viral em cultivo de células, detecção do ácido nucléico viral pelo método de RT-PCR, técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos (IgM/IgG) e pela detecção de antígenos virais em tecidos.

1.11.1 Isolamento Viral e Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O isolamento viral é um método definitivo e ainda permanece como o “*Padrão Ouro*” para comparação com outros métodos.

O sistema para o isolamento mais utilizado consiste na inoculação de espécimes em culturas de células de mosquitos *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978). Esta linhagem celular é de fácil manutenção, podendo ser mantida à temperatura ambiente, além de ser mais sensível do que linhagens celulares de vertebrados (Tesh, 1979).

O isolamento viral pode ser observado pela presença de efeito citopático (ECP) ou pela detecção de antígenos pelo teste de imunofluorescência . A tipagem se realiza utilizando anticorpos monoclonais (Gubler *et al.*, 1984).

1.11.2 Testes Imunoenzimáticos e de Inibição de Hemaglutinação (HI)

O diagnóstico sorológico das infecções por DENV baseia-se na pesquisa de anticorpos específicos em duas amostras de sangue coletadas com intervalos de 14 a 21 dias após o início dos sintomas.

As provas pareadas são de grande valor possibilitando observar soroconversões.

A técnica da inibição da hemaglutinação (HI) (Clarke & Casals, 1958), recomendada pela OMS possibilita ainda a caracterização da resposta imune se primária ou secundária.

O teste imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA) (Kuno *et al.*, 1987), tem se mostrado extremamente útil no diagnóstico de casos suspeitos. A presença de anticorpos da classe IgM em uma única amostra de soro indica infecção ativa ou recente, contornando as dificuldades da obtenção de uma segunda coleta de sangue.

O teste imunoenzimático tem sido igualmente utilizado para detecção de anticorpos da classe IgG (IgG-ELISA). Esta técnica é rápida, de fácil execução e pode ser utilizada em larga escala, permitindo a caracterização da resposta imune por dengue (Miagostovich *et al.*, 1999).

Recentemente testes comerciais têm sido disponibilizados para o diagnóstico de dengue (Wu *et al.*, 1997; Lam & Devine, 1998; Lam *et al.*, 2000). Alguns kits possibilitam ainda caracterizar o tipo de infecção, entretanto o custo destes testes ainda permanece elevado (Miagostovich *et al.*, 2001).

1.11.3 Teste de Imunohistoquímica

A detecção de antígenos virais pode ser realizada em amostras de tecidos fixados em formalina em casos onde o paciente evoluiu para óbito (Miagostovich *et al.*, 1997).

1.11.4 RT-PCR (Sistema “semi-nested”)

Diferentes protocolos de amplificação genômica utilizando transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) têm sido utilizados no diagnóstico rápido das infecções por DENV.

Estes protocolos detectam e caracterizam o sorotipo infectante e podem confirmar o diagnóstico em situações onde o material disponível não é adequado para o isolamento viral (Morita *et al.*, 1991; Lanciotti *et al.*, 1992).

O protocolo desenvolvido por Lanciotti *et al.* (1992) permite detectar os quatro sorotipos de DENV simultaneamente em um procedimento “semi-nested” e é recomendado pela OPAS.

1.11.5 PCR em tempo real

Para a realização da técnica de PCR em tempo real, pode-se utilizar o sistema *SYBR Green* ou o sistema *TaqMan™* (Forster, 1948; Heid *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 1991).

O SYBR Green possui função semelhante ao Brometo de etídio, ligando-se a qualquer DNA de dupla fita.

No sistema *TaqMan™*, uma sonda duplamente marcada com corantes fluorescentes distintos, um reporter (ex: FAM) e outro quencher (ex: TAMRA), hibridiza na região amplificada flanqueada pelos iniciadores.

Quando os dois corantes estão próximos, e a sonda ainda está intacta, o fluoróforo (TAMRA [N,N,N', N' - *tetramethyl-6-carboxyrhodamine*]) absorve energia do fluoróforo FAM (5-*carboxyfluorescein*) evitando a emissão de fluorescência. A atividade 5' exonuclease da enzima *taq* polimerase degrada a sonda durante o curso do PCR (Holland *et al.*, 1991). A degradação da sonda conduz a separação dos dois fluoróforos em solução, com um aumento subsequente do nível de fluorescência.

A intensidade de fluorescência é detectada a cada ciclo de amplificação. Esta medida de fluorescência permite a quantificação de ácidos nucleicos através da relação proporcional entre o ciclo inicial a partir do qual a amplificação exponencial é detectada (Ct) e o número inicial de cópias do fragmento alvo.

Dessa forma, pode-se detectar e quantificar o DNA/RNA viral de uma determinada amostra de forma sensível e específica (Laue *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 1991).

O sistema é totalmente automatizado, sem haver a necessidade de detecção dos produtos amplificados em gel. Dessa forma, a contaminação das amostras por DNA previamente amplificado (amplicons) pode ser completamente evitada, já que os tubos de reação não precisam ser abertos.

Essa técnica permite acompanhar a amplificação em tempo real de até 96 amostras simultaneamente.

1.12 Prevenção e Controle

O desenvolvimento de vacinas anti-DENV iniciou-se na década de 40 e diversas abordagens têm sido utilizadas, as quais incluem vacinas atenuadas após passagens seriadas em culturas de células, vacinas recombinantes, quiméricas e de subunidades (Sabin & Schlesinger, 1945; WHO, 2002).

Outras categorias como vacinas onde genes de virulência são deletados, vacinas geneticamente modificadas de vírus atenuado e vacinas de DNA também estão sendo desenvolvidas (Durbin *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2001).

Grupos da Universidade de Mahidol na Tailândia e do Instituto de Pesquisa do Exército Americano Walter Reed (WRAIR) desenvolveram vacinas monovalentes atenuadas a partir de cultura primária de rim de cão (PDK) para cada tipo viral (DENV1-4) (Edelman *et al.*, 1994; Kanesa-Thanan *et al.*, 2003).

Cada grupo formulou uma versão tetravalente que foi testada em voluntários Norte-americanos (Fase 1) (Edelman *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2003) e em adultos e crianças Tailandesas (Fase 2) (Sabchareon *et al.*, 2002; 2004). Em ambos os casos, 80% dos voluntários apresentaram soroconversão para os quatro sorotipos do vírus dengue após a segunda ou terceira inoculação.

A versão Tailandesa apresentou reações inaceitáveis quando testada em crianças (Sabchareon *et al.*, 2004). Atualmente, o WRAIR está testando uma nova formulação em crianças Tailandesas (Edelman, 2005).

Vacinas quiméricas de DENV protegeram camundongos contra encefalites causadas por dengue (Chambers *et al.*, 2003), enquanto que quimeras com deleções na 3' NC mostraram-se altamente atenuadas e imunogênicas em macacos (Whitehead *et al.*, 2003).

A vacina ChimeriVax desenvolvida pela Acambis substituiu os genes que codificam as proteínas prM e E da vacina do vírus da Febre Amarela 17D (YF-VAX) pelas mesmas regiões dos DENV1-4 (Guirakhoo *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004).

As vacinas recombinantes apresentam a vantagem de eliminar o risco de infectividade e de possuir uma maior estabilidade. Entretanto induzem baixos títulos de anticorpos neutralizantes e são difíceis de serem produzidas de forma pura e em grandes quantidades (Mason *et al.*, 1989; 1990; Murray *et al.*, 1993).

Existem ainda as vacinas candidatas baseadas em subunidades antigênicas (Kinney and Huang, 2001; Pugachev *et al.*, 2003).

A introdução da tecnologia do clone infeccioso abriu novas abordagens para as pesquisas de vacinas contra os *Flavivírus*. Atualmente clones infecciosos para Febre Amarela (Rice *et al.*, 1989), Encefalite Japonesa (Sumiyoshi *et al.*, 1992) e DENV-1, DENV-2 e DENV-4 (Rice *et al.*, 1989; Lai *et al.*, 1991; Kapoor *et al.*, 1995; Kinney *et al.*, 1997; Puri *et al.*, 2000) já se encontram disponíveis.

A dificuldade na obtenção de uma vacina contra os DENV se deve a inúmeros fatores, dentre eles a existência de quatro sorotipos virais e a falta de um bom modelo animal que reproduza as formas clínicas da infecção (WHO, 2002).

Enquanto uma vacina eficaz não está disponível para aplicação em larga escala, as medidas de controle ao vetor e o diagnóstico precoce de casos suspeitos consistem nos principais instrumentos para a prevenção do dengue, aliado a melhoria do saneamento básico.

2. OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

1. Implantar a técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) para diagnóstico de infecções por dengue;
2. Realizar a Vigilância Viroológica do dengue no estado do Rio de Janeiro nos anos 2004-2005.

Objetivos específicos:

1. Estabelecer a técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) para o vírus dengue tipo 3;
2. Aplicar a técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) em amostras de fígado provenientes de casos fatais ocorridos durante a epidemia de dengue em 2002 no estado do Rio de Janeiro;
3. Isolar e identificar os sorotipos de dengue circulantes no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2004 – 2005;
4. Caracterizar geneticamente os sorotipos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras para PCR em tempo real

3.1.1 *Amostra de DENV-3 para Curva Padrão*

A amostra de DENV-3 utilizada nos experimentos para a realização da curva padrão, foi isolada no estado do Rio de Janeiro em 2002 pelo Laboratório de Flavivirus, cedida para Bio-Manguinhos onde foi titulada por plaqueamento, com o título de 10^7 PFU/mL.

3.1.2 *Amostras clínicas*

Foram estudadas 30 amostras de fígado provenientes de 28 casos fatais com sinais e sintomas compatíveis com infecções por DENV ocorridos durante a epidemia de 2002 no estado do Rio de Janeiro.

3.2 Amostras para Vigilância Viroológica

Entre janeiro de 2004 a dezembro de 2005 foram estudados 839 casos suspeitos de dengue com até uma semana após o início dos sinais e sintomas. Nesta casuística estão incluídos 17 casos fatais ocorridos em 2004 e 12 casos fatais no ano de 2005.

As amostras foram provenientes de casos atendidos em diferentes Centros de Saúde, Hospitais da Rede Pública e Clínicas Particulares do Estado do Rio de Janeiro.

Os espécimes clínicos foram enviados para o Laboratório de Flavivírus, do Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sob refrigeração num período de 24 horas após a coleta. Todas as amostras foram acompanhadas de ficha de identificação e dados de coleta em relação ao início da doença. Os espécimes clínicos foram mantidos à -70°C até o momento da utilização.

3.3 Tratamento de vísceras

Os fragmentos frescos de vísceras foram macerados com a utilização de um bastão de vidro até se obter a homogeneização total do tecido. Cada suspensão foi preparada utilizando-se cerca de 1cm³ de fragmento para 1.5 mL de meio Leibovitz (L-15) acrescido de 100µL de antibiótico (penicilina sódica e sulfato de estreptomicina). Os macerados foram mantidos a 4°C por 60 minutos e, em seguida, foram transferidos para um tubo tipo *ependorf*[®] de 2.0 mL e centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado por aspiração, transferido para um novo tubo *ependorf*[®] e armazenado à -70°C até o momento da utilização. Este procedimento foi utilizado tanto para isolamento em cultura de células como para a extração do RNA viral.

3.4 Isolamento Viral

Foi inoculado um total de 723 amostras, incluindo soros (n=706) e fragmentos frescos de vísceras (n=17), em tubo de culturas de células de *Ae. albopictus* clone C6/36 (Igarashi, 1978). Após inoculação, as culturas foram incubadas à temperatura de 28°C e observadas diariamente, por um período de 10 a 14 dias.

Metodologia

As células foram cultivadas em tubos de 1,5 x 16cm contendo 2,0 mL de meio L-15 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA). Após formação de monocamada, o meio foi substituído por igual volume de meio L-15 contendo 2% de SFB.

Os soros diluídos 1/10 em meio L-15 foram inoculados em alíquotas de 0,1mL na monocamada celular e para vísceras alíquotas de 0,1mL. Para cada grupo de espécimes inoculados, foram incluídos controles de vírus e controle de células. Após inoculação, os tubos foram incubados à temperatura de 28°C e observados diariamente, por um período de até 14 dias, em microscópio óptico invertido com aumento de até 400 vezes.

Modo de preparo das soluções – Isolamento Viral

Meio de Cultura

Foi utilizado o meio L-15 (Leibovitz) modificado com L-Glutamina e sem triptose fosfato (TPO₄) e antibióticos, adquirido sob forma desidratada (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Reagente	Peso/Vol
Leibovitz 15	14,69g
Água tridestilada q.s.p.	1000,0mL

O meio foi filtrado em membrana Milipore (0,22 μ) e após prova de esterilidade, conservado a 4°C. A este meio foi adicionado SFB (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) nas concentrações de 2% ou 10%, conforme utilizado para manutenção ou crescimento celular, respectivamente.

Solução de Hanks BSS 10X

Reagente (A)	Peso/Vol
Cloreto de Cálcio (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	1,4g
Água tridestilada q.s.p.	200,0mL

Reagente (B)	Peso/Vol
Fosfato de Sódio Dibásico (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	0,47g
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	0,6g
Água Tradestilada q.s.p.	400,0mL

Reagente (C)	Peso/Vol
Dextrose (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	10,0g
Cloreto de sódio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	80,0g
Cloreto de potássio (Vetec Ltda, Rio de Janeiro, BR)	4,0g
Sulfato de magnésio com 7 H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	2,0g
Água tridestilada q.s.p.	400,0mL

As soluções foram preparadas separadamente, reunindo-se inicialmente as soluções A e B e, em seguida a solução C, mantendo-se em agitação constante. Para cada litro de solução foram adicionados 20mL de solução aquosa de vermelho de fenol a 1% a 2,0mL de clorofórmio como preservativo. Após o preparo, a solução estoque foi

diluída 10 vezes em água tridestilada, autoclavada a 115°C durante 20 minutos. O pH da solução foi ajustado a 7,2 com solução de bicarbonato de sódio 1,4%.

Antibióticos

Reagente	Peso/Vol
Penicilina Sódica Cristalina (Gibco BRL, USA)	1.000.000 unidades
Sulfato de estreptomicina (Gibco BRL, USA)	1,0g
Solução de Hanks BSS1X (autoclavado) q.s.p.	100,0mL

A solução foi filtrada em membrana Millipore (0,22 μ) a após prova de esterilidade, conservada a -20°C.

3.5 Técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI)

As culturas positivas pela técnica de isolamento viral (que apresentaram efeito citopático - ECP) foram posteriormente testadas com fluído hiperimmune de camundongo para dengue, pela técnica de imunofluorescência Indireta (IFI) para detecção dos DENV e tipagem viral, empregando-se anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos dos DENV (Henchal *et al.*, 1982; Gubler *et al.*, 1984), sendo as reações negativas consideradas como isolamento negativo.

Metodologia

Após agitação, os tubos de células inoculados foram mantidos a 4°C por no mínimo 2 horas para sedimentação das células. Aproximadamente 1mL do fluído de cada cultura foi retirado e as células ressuspensas no meio restante.

Para a detecção viral, cerca de 0,025mL de suspensão celular de cada cultura foi depositada sobre um dos 10 círculos existentes nas lâminas de 26 x 76mm (Biolab Merieux, New Zealand). Após secagem à temperatura ambiente, as células foram fixadas com acetona P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) a -20°C durante 20 minutos. Controles de células infectadas e não infectadas foram incluídos em cada grupo de lâminas processadas.

Após secagem à temperatura ambiente, foi adicionado em cada orifício da lâmina 0,025mL de fluído ascítico hiperimmune de camundongo inoculado com DENV-2/Nova

Guiné B, Research Reference Reagent, Bethesda, USA, do inglês “mouse immune ascitic fluid” (MIAF), diluído 1:50 em PBS pH 7,5. As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e deixadas à temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, foram adicionados 0,025mL de anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (Antibodies Incorporated, Davis, USA.), diluído 1:20 em preto de naftaleno a 0,1% e incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Após duas lavagens em PBS pH 7,2 por 10 minutos, as lâminas foram rinsadas com água destilada, colocadas à temperatura ambiente para secagem e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 60mm) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

Para tipagem viral, foi preparada uma lâmina para cada amostra, depositando cerca de 0,025mL de suspensão celular em seis orifícios da lâmina. As lâminas foram colocadas à temperatura ambiente para secagem e após 18 horas fixadas com acetona a -20°C durante 20 minutos.

Em cada orifício, foram adicionados 0,025mL de anticorpos monoclonais específicos para os DENV-1 (15F3), DENV-2 (3H5), DENV-3 (5D4) e DENV-4 (1H10) (Henchal *et al.*, 1982), diluídos 1:5 (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e 1:20 (DENV-2) em PBS pH 7,5. Em cada lâmina, foram incluídos um controle positivo (Policlonal (DENV 1+2+3+4+F.A) diluído 1:50 em PBS pH 7,5) e um controle negativo (PBS pH 7,5).

Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos e colocadas à temperatura ambiente para secagem. A seguir, foram adicionados 0,025mL de IgG de cabra anti-camundongo conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) diluída 1:20 em preto de naftaleno 0,1% em PBS pH 7,5. Após incubação em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 por 10 minutos, rinsadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e montadas com glicerina tamponada e lamínulas (24 x 50mm).

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss, Alemanha), com aumento de 400 vezes, equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão HBO 50W e jogo de filtro convencional (FT 510 / LP 520).

Modo de preparo das soluções – Imunofluorescência Indireta (IFI)

Tampão Salina Fosfato (Phosphate Buffer Saline – PBS)

Reagente	Vol/Peso
Cloreto de Sódio (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	8,0g
Cloreto de Potássio (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	0,2g
Fosfato de Sódio Dibásico 12 H ₂ O (Vetec, RJ, BR)	2,898g
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, RJ, BR)	0,2g
Água Tridestilada q.s.p.	1000,0mL

Após autoclavação a 121°C durante 20 minutos (1 atm), a solução foi conservada à temperatura ambiente.

PBS pH 7,5/0,01M (10X)

Reagente	Vol/Peso
Cloreto de Sódio (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	85,0g
Fosfato de Potássio Monobásico (Vetec, RJ, BR)	1,8g
Fosfato de Sódio Difásico anidro (Vetec, RJ, BR)	12,36g
Água Tridestilada q.s.p.	1000,0mL

Após o preparo, a solução foi mantida a –20°C. Para o uso, esta solução foi diluída 10 vezes em água tridestilada autoclavada a 121°C durante 20 minutos.

Preto de Naftaleno 1% em Tampão Salina Fosfato

Reagente	Vol/Peso
Preto de Naftaleno (BDH Chemicals Ltda, England)	1,0g
Tampão Salina Fosfato pH 7,5 q.s.p.	100,0mL

Após distribuição em frascos de 10mL, as soluções foram autoclavadas a 115°C durante 15 minutos e estocadas à temperatura ambiente. Para uso, esta solução foi diluída 10 vezes no mesmo tampão.

Solução de Glicerol

Reagente	Volume
Glicerol (Vetec, Rio de Janeiro, BR)	9 volumes
Tampão Salina Fosfato pH 7,5	1 volume

Após o preparo, a solução foi conservada à temperatura ambiente.

3.6 Extração do RNA viral pelo método da Sílica

O RNA viral foi extraído do soro pelo método da sílica, de acordo com o protocolo descrito por Boom *et al.* (1990) para a realização da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

Metodologia

Em um tubo tipo *ependorf*[®] de 1,5mL contendo 0,86mL de tampão de lise (L-6) e 0,04mL de sílica foram adicionados 0,1mL da amostra. Após 10 minutos à temperatura ambiente, com agitações vigorosas a cada 2 minutos, o fluído foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 segundos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (L-2), duas vezes com etanol -20°C (Merck, Darmstadt, Germany) a 70% e uma vez com acetona P.A. -20°C (Merck, Darmstadt, Germany). Após serem mantidos em bloco aquecido a 56°C por 10 minutos, foi adicionado 0,06mL de água milli-Q livre de RNase e 40 unidades/ μ L de RNAsin (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) em cada tubo e incubados por 10 minutos a 56°C. A seguir, o fluído foi misturado vigorosamente e centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante resultante foi retirado por aspiração e transferido para um novo tubo de 1,5mL para ser utilizado no método de RT-PCR.

Modo de preparo das soluções – Extração de RNA (método sílica)

Tampão L-6 (Tampão de lise)

Reagente	Peso/Vol
Isotiocianato de Guanidina (GuSCN) (Gibco BRL, Gaitherburg, USA)	120g
Solução de Tris HCl 0,1M pH 6,4	100mL
Solução de EDTA 0,2M pH 8,0	22mL
Triton X-100 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	2,6g

Após dissolver o isotiocianato de guanidina em Tris HCl 0,1M pH 6,4, adicionar o EDTA 0,2M pH 8,0 e o Triton X-100. Após este procedimento, homogeneizar a solução por aquecimento a 60°C.

Tampão L-2 (Tampão de lavagem)

Reagente	Peso/Vol
Isotiocianato de Guanidina (GuSCN)(Gibco BRL, Gaithersburg, USA)	120g
Solução de Tris HCl 0,1M pH 6,4	100mL

Dissolver o isotiocianato de guanidina em Tris HCl 0,1M pH 6,4 por aquecimento a 60°C.

Os tampões L-6 e L-2 devem ser preparados em capela devido à produção de gás tóxico (HCN).

Solução de Tris HCl 0,1M pH 6,4

Reagente	Peso/Vol
Tris HCl 1M (Marca Gibco BRL, Gaithersburg, USA)	15,76g
Água milli-Q estéril q.s.p.	1000mL

Sílica

Reagente	Peso/Vol
Sílica (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	60g
Água deionizada	1000mL

Ácido clorídrico (HCl) (Merck, Darmstadt, GE)	0,60mL
---	--------

Em proveta de 500mL, adicionar a sílica em 500mL de água deionizada. Deixar repousar à temperatura ambiente por 24 horas. Remover 430mL do sobrenadante e ressuspender o sedimento em 500mL de água deionizada. Deixar 5 horas à temperatura ambiente. Remover 440mL do sobrenadante e adicionar HCl concentrado, com conta-gotas, até atingir pH 2,0. Aliquotar, autoclavar a 115°C (1 ATM) por 15 minutos e estocar protegido da luz.

Etanol 70%

Reagente	Volume
Etanol PA (Merck, Darmstadt, GE)	70mL
Água milli-Q estéril	30mL

Solução de EDTA 0,2M pH 8,0

Reagente	Peso/Vol
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)	22g
Água milli-Q estéril q.s.p.	500mL

Em um béquer de 1000mL colocar 22g de EDTA e, adicionar 100mL de água milli-Q estéril. Homogeneizar a solução no agitador utilizando uma barra magnética. Esta solução só começa a dissolver quando o pH chegar próximo a 8,0. Ajustar o pH para 8,0 utilizando NaOH concentrado. Colocar a solução em uma proveta estéril. Completar com 500mL água milli-Q estéril q.s.p.

Solução de Hidróxido de Sódio 10N

Reagente	Peso/Vol
Hidróxido de sódio 1M (NaOH) (Sigma, St. Louis, USA)	40g
Água milli-Q estéril q.s.p.	100mL

3.7 Extração do RNA viral pelo kit Qiagen

Os RNAs das amostras de soro isolados e dos fragmentos frescos de vísceras, foram extraídos através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, para a realização das técnicas de sequenciamento e RT-PCR em tempo real (Sistema TaqMan™), respectivamente.

3.8 Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

Um total de 815 amostras foram submetidas a este procedimento. Foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti *et al.* (1992) para detecção e tipagem dos DENV a partir de amostras de soro. Este protocolo detecta os quatro sorotipos simultaneamente em um procedimento *semi-nested*, gerando produtos amplificados (amplicons) com tamanhos específicos (em pares de base) para cada sorotipo dos DENV.

Em uma primeira etapa, foram utilizados iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV, complementares as seqüências dos genes que codificam as proteínas C e prM. No procedimento *semi-nested*, foram utilizados iniciadores específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para os DENV-1 a 4, respectivamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos DENV.

Nome	Iniciador Seqüência (5´ - 3´)	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (pb)
D1 (+)	TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACCG	134 - 161	511
D2 (-)	TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC	616 - 644	511
TS1 (-)	CGT CTC AGT GAT CCG GGG G	568 - 586	453 (D1 e TS1)
TS2 (-)	CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG	232 - 252	119 (D1 e TS2)
TS3 (-)	TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C	400 - 421	288 (D1 e TS3)
TS4 (-)	CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A	506 - 527	394 (D1 e TS4)

Metodologia

1ª Etapa: Transcrição Reversa seguido da PCR

Em tubo tipo *ependorf*[®] de 0,2mL, 5 μ L do RNA extraído foram aquecidos a 75 $^{\circ}$ C por 5 minutos e posteriormente mantidos em banho de gelo. A seguir, foram adicionados 45 μ L da mistura RT-PCR (Quadro 3.1) e os tubos foram colocados imediatamente no bloco aquecido do termociclador. Após a transcrição reversa (42 $^{\circ}$ C por 60 minutos), as amostras foram submetidas a 30 ciclos subseqüentes de desnaturação (94 $^{\circ}$ C por 35 segundos), anelamento (55 $^{\circ}$ C por 1 minuto), extensão (72 $^{\circ}$ C por 2 minutos) e um tempo de extensão final (72 $^{\circ}$ C por 5 minutos).

2ª Etapa: "Semi-nested" PCR para tipagem dos DENV

Para a realização desta etapa, os produtos da 1ª etapa obtidos foram diluídos 1:100 em água deionizada (PROMEGA, Madison, USA) (5 μ L do produto da 1ª etapa + 495 μ L de água). Em novos tubos tipo *ependorf*[®] de 0,2mL, foram adicionados 45 μ L da mistura para o "*semi-nested*" PCR e 5 μ L da amostra diluída (Quadro 3.1). As amostras foram submetidas a 18 ciclos de desnaturação (94 $^{\circ}$ C por 30 segundos), anelamento (55 $^{\circ}$ C por 1 minuto), extensão (72 $^{\circ}$ C por 2 minutos) e um tempo de extensão final (72 $^{\circ}$ C por 5 minutos).

Para a análise dos amplicons, foi realizada eletroforese à 100V por 45 minutos onde 10 μ L do produto amplificado acrescido de 1 μ L de azul de bromofenol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) foram aplicados em um gel de agarose (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 1,0X, acrescido de brometo de etídio 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA).

<i>Reagentes</i>	<i>Mistura para RT-PCR (volume p/ 1 reação)</i>	<i>Mistura para semi-nested (volume p/ 1 reação)</i>
Água livre de nucleases (Promega)	33,3µL	33,6µL
10X PCR Buffer sem Mg ⁺⁺ (Gibco)	5,5µL	5,5µL
10 mM desoxinucleotídeos (dNTPs) (Gibco)	4,0µL	4,0µL
0,1 M Dithiothreitol (DTT) (Gibco)	0,25µL	-
10µM iniciador D1 (Gibco)	0,13µL	0,13µL
10µM iniciador D2 (Gibco)	0,13µL	-
10µM iniciador TS1-4 (Gibco)	-	0,25µL
40U/µL RNAsin (Gibco)	0,25µL	-
5U/µL Taq DNA Polimerase (Gibco)	0,25µL	0,25µL
2,5U/µL ezima AMV-RT (Gibco)	0,063µL	-
50 mM Cloreto de Magnésio (Gibco)	1,2µL	1,2µL

Modo de preparo das soluções – RT-PCR

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

<i>Reagente</i>	<i>Peso/Vol</i>
Trizma Base (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)	121,1g
Ácido Bórico (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)	55,6g
EDTA sal dissodico dihidratado (Na ₂ EDTA·2H ₂ O)	3,7g
Água destilada q.s.p.	1000mL

* Este tampão foi utilizado 1,0X concentrado com pH 8.6 conservado a temperatura ambiente.

10mM desoxinucleotídios (dNTPs)

<i>Reagente</i>	<i>Peso/Vol</i>
dNTP estoque (Ultrapure dNTP set)(Pharmacia Biotech)	25µL
Água livre de nucleases	900µL

Foram adicionados 25 μ L de cada dNTP estoque a 900 μ L de H₂O. Posteriormente foi homogeneizado e estocado a -20°C.

100 mM Dithiotreitol (DTT)

<i>Reagente</i>	<i>Peso/Vol</i>
C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	0,77g
Água livre de nucleases	50mL

0,1M de DTT foi preparado dissolvendo 0,77g de DTT em 45mL de água livre de nucleases. Logo após, homogeneizou-se utilizando agitador magnético e ajustado ao volume para 50mL com água. Posteriormente foi separado em alíquotas de 10mL e estocado a -20°C.

Gel de agarose 1% em TBE 0,5X

<i>Reagente</i>	<i>Peso/Vol</i>
Agarose (Sigma, St. Louis, USA)	1g
Solução de TBE (0,5X)	100mL

Em um erlemeyer, foi dissolvido a agarose em TBE 0,5X, aquecendo a solução no microondas (temperatura máxima) por dois minutos. Após resfriamento da solução, adicionar 3 μ L de brometo de etídio 1%. Posteriormente, o gel foi aplicado no suporte para o gel. Após endurecimento do gel, o mesmo foi acondicionado na cuba de eletroforese para posterior aplicação das amostras.

Diluição do padrão de peso molecular

Para utilização, o peso molecular (100pb DNA ladder) (Gibco BRL, Gaithersburg, USA) foi diluído 1/10 com água livre de nucleases.

3.9 Sequenciamento parcial dos DENV-3

Um total de duas amostras foram submetidas a este procedimento. Foi utilizado sequenciador automático da Applied Biosystem 3100. Iniciadores sintéticos foram desenhados para amplificar fragmentos sobrepostos de aproximadamente 500 pares de base (pb) ao longo da seqüência dos genes que codificam as proteínas prM, M e E (posição 437 a 2413) baseados em uma seqüência completa de DENV-3.

A seqüência da cepa 80-2 (número de acesso GenBank AF317645) foi obtida do Centro Nacional para Informação Biotecnológica - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e os iniciadores foram desenhados manualmente. Para assegurar o sequenciamento dos fragmentos, iniciadores internos também foram desenhados. As seqüências dos iniciadores utilizados para a reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa (RT-PCR) e sequenciamento dos genes que codificam as proteínas prM, M e E estão apresentadas nas Tabelas 3.2 e 3.3.

A Figura 3.1 apresenta a estratégia utilizada para o sequenciamento dos genes que codificam as regiões prM, M e E do DENV-3.

Tabela 3.2: Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos produtos da RT-PCR das regiões prM, M e E do DENV-3.

Nome	Iniciador Seqüência (5´- 3´)	TM (°C)	Posição no genoma (de acordo com AF317645)
D3-1	GTTGTTAGTCTACGTGGACCGA	60	2-23
D3-2	GTTGATTCCAGAGGCTGTCTTA		511-532
D3-3	GCCTCTGGAATCAACATGTGCA	60	518-539
D3-4	CTTAGCCATGGTAGTCACACA		1022-1042
D3-5	GTGACTACCATGGCTAAGAACA	60	1025-1046
D3-6	GAACCATTGTCTATGTACCATCCA		1544-1567
D3-7	CGGACAGGTTTGGATTTCA	54	1490-1508
D3-8	CAGTTGATTTTCAGGGCTT		2082-2100
D3-9	CAACTGGTACAGGAAGGGAA	57	2095-2114
D3-10	CTAATTCCGCACACTCCA		2569-2587

Tabela 3.3: Iniciadores utilizados para sequenciamento interno dos produtos da reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa das regiões que codificam as proteínas de prM, M e E do DENV-3.

Nome	Iniciador Seqüência (5´- 3´)	TM (°C)	Posição no genoma (de acordo com AF317645)
D3-43i*R	CGC GTT TCA GCA TAT TGA TAG A	57	128-149
D3-44i	CTT AAC TTC ACG AGA TGG AGA	55	442-462
D3-45i	CAT GAC AAT GAG ATG TGT GGG A	59	928-949
D3-46i	CAT CAA CCA CTG AAG CCA TCT T	57	1431-1452
D3-47i	GAA GGA GGA GCC TGT CAA CAA T	61	2008-2029

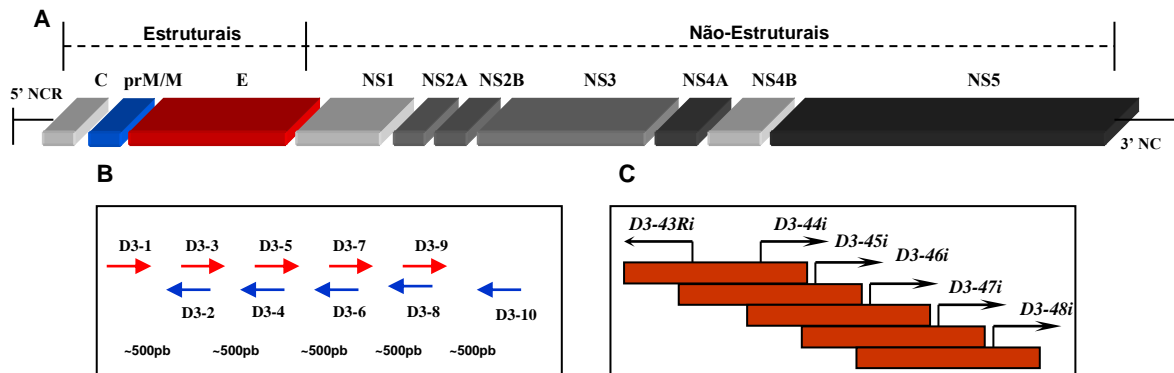


Figura 3.1: Estratégia utilizada para amplificação dos fragmentos sobrepostos de aproximadamente 500 pb da região prM, M e E pela RT-PCR e reação de sequenciamento. A) Representação esquemática do genoma dos DENV. B) Setas vermelhas representam as regiões sequenciadas no sentido 3'→5' (sentido +) e setas azuis representam as regiões seqüenciadas no 3'→5' (sentido -). C) Primers internos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos amplificados.

3.9.1 Amplificação por RT-PCR para Sequenciamento

A mistura para a realização do RT-PCR para sequenciamento consistiu de 12,5µL de PCR Master Mix 2X (Promega Co, Madison, WI), 1,5 µL de ditiotreitol a 100mM, cada iniciador a uma concentração final de 10 µM e 1µL de AMV-RT (5U) (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Cinco microlitros do RNA extraído foram reversamente transcritos a 42°C por 60 min, diretamente seguidos de 40 ciclos de amplificação a 94°C por 30 seg, 54-61°C (dependendo do par de iniciadores utilizados) por 1 min e 72°C por 2 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação foi realizada utilizando termociclador modelo 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) ou modelo PTC-200-60 (MJ Research, Inc., Watertown, MA). Após o término da reação, os produtos amplificados foram analisados

por eletroforese em gel de agarose (Sigma Chemical Co, St Louis) a 1% em TBE 1X, por 45 minutos a 100V.

Quando o produto amplificado consistiu em um único amplicon, foi realizada a purificação do produto amplificado utilizando o kit comercial “*PCR Purification*” (Qiagen, Inc., Valencia, CA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

Purificação do produto de RT-PCR por extração de gel de agarose

Quando observado a presença de múltiplos amplicons, todo o produto do RT-PCR para sequenciamento foi aplicado em um gel de agarose (Sigma Chemical Co, St Louis) a 0,7% a fim de isolar o amplicon desejado para posterior realização do procedimento de purificação. Analisar o gel em transiluminador na presença de luz UV, forrando o mesmo com plástico transparente e, com o auxílio de um bisturi ou lâmina estéril, o amplicon desejado foi cortado. Com uma pinça, o fragmento do gel contendo o amplicon desejado foi transferido para um tubo tipo *ependorf*[®] de 1,5mL e realizado a purificação do produto amplificado utilizando kit comercial “*Gel Extraction*” (Qiagen, inc., Valencia, CA) conforme protocolo descrito pelo manual do fabricante.

Quantificação do DNA

A concentração de DNA utilizada na reação de sequenciamento é crucial para o sucesso da reação, desta forma é imprescindível que o DNA seja quantificado antes de se iniciar o “*cycle sequence*”.

Para a quantificação do DNA purificado (resultante da purificação do produto de RT-PCR), foi realizado eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 1X por 40 minutos a 100V, aplicando 4 μ L do peso molecular “*low mass DNA*” (Invitrogen, Carlsbad, CA) no primeiro orifício e 4 μ L do DNA a ser quantificado nos demais orifícios do Gel.

A concentração foi estimada de acordo com os parâmetros de comparação entre o DNA a ser quantificado e o “*low mass DNA*”, conforme bula apresentada pelo fabricante.

3.9.2 SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

A CONCENTRAÇÃO DE DNA A SER UTILIZADA NA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO OU “*CICLE SEQUENCE*” FOI DE ACORDO COM O TAMANHO DO AMPLICON A SER SEQÜENCIADO CONFORME O QUADRO 3.2.

Quadro 3.2: Concentração de DNA a ser utilizada de acordo com o tamanho do amplicon a ser seqüenciado.

Amplicon (pb)	Concentração (ng)
100 – 200	1 a 3
200 – 500	3 – 10
500 – 1000	5 – 20
1000 – 2000	10 – 40
> 2000	40 – 100

OS FRAGMENTOS DE CDNA AMPLIFICADOS POR PCR FORAM DIRETAMENTE SEQUENCIADOS, EM AMBOS SENTIDOS, UTILIZANDO O *KIT* BIGDYE TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION (APPLIED BIOSYSTEMS, FOSTER CITY, CA) VERSÃO 3.1. A TABELA 3.4 APRESENTA OS REAGENTES E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS NA REAÇÃO DE “*CYCLE SEQUENCE*”.

Tabela 3.4: Preparo do Mix para a reação de “*cycle sequence*”.

Reagente	Reação 1X	Reação ½ X	Reação ¼ X
Terminator Ready Reaction Mix (Versão 3.1)	8,0µL	4,0µL	2,0µL
2,5X Sequencing Buffer	-	-	2,0µL
Produto de PCR	1 – 100ng	1 – 100ng	1 – 50ng
Primer	3.2 pmol	3.2 pmol	1.6 pmol
Água deionizada	Completar p/ 20µL	Completar p/ 10µL	Completar p/ 10µL
Volume final	20.0µL	10.0µL	10.0µL

As condições de termociclagem consistiram de 25 ciclos a 96°C por 30 seg, 50°C por 1 min e 60°C por 4 min, de acordo com instruções descritas pelo fabricante. Após purificação utilizando colunas *Centri-Sep*[®] (Princeton Separations, Inc, Adelphia, NJ), o DNA foi seco a 37°C, por 18 horas. O sedimento foi ressuspenso em 10 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA) e aplicado em placa de 96 orifícios para que seja utilizado no sequenciador Applied Biosystems Prism 3100 *Avant Genetic Analyzer* (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.9.3 Análise das Sequências e Filogenia:

A análise dos produtos da reação de “*cycle sequence*” submetidos ao sequenciamento foi realizada utilizando o Programa *Chromas*[®] versão 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>). A identidade dos nucleotídeos e dos aminoácidos foi determinada pelo uso do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) e do DNAsis versão 2.6 (Hitachi Software Co, San Francisco, CA). O alinhamento das seqüências obtidas a partir do eletroferograma foi realizado utilizando o software CLUSTAL W a partir do site: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.

Para a realização do alinhamento múltiplo, as seqüências foram preparadas em documento *Word*, indicando o sinal de maior (>) seguido da origem da cepa, número da amostra e o ano de isolamento (Ex: >BR79941/05). Seqüências representativas de DENV 1, 2, e 4 foram utilizadas como grupo externo.

A árvore filogenética foi construída com o Programa MEGA 2. O cálculo da *distância p*, a média do conteúdo de G/C e o cálculo da taxa de transcrição e transversão foram analisados para a aplicação do método mais adequado a análise filogenética (Ex: método de “*Tamura Nei, Kimura (1980), Tajima Nei, Jukes Cantor*”).

(1969). Após estabelecido o método a ser utilizado para análise filogenética, foi estipulado “*bootstrap*” de 1000 pseudoréplicas.

Modo de preparo das soluções – Sequenciamento

Iniciadores para reação de RT-PCR para sequenciamento

Primeiramente, o estoque dos iniciadores para a reação de RT-PCR de sequenciamento foi preparado a 1000 pM/μL ou 1000μM. Para o uso na reação, o estoque foi diluído à 10pM/μL ou 10μM (10μL do estoque + 990μL de água livre de nucleases).

Iniciadores para reação de “cycle sequence” com Big Dye versão 3.1

Os iniciadores utilizados nesta etapa foram diluídos 1/10 (10pM/μL ou 10μM) (10μL do estoque + 90μL de água livre de nucleases).

3.10 PCR em tempo real (Sistema TaqMan™)

Os iniciadores e a sonda marcada com os corantes 3’FAM e 5’TAMRA (tabela 3.5), foram os descritos por Houg *et al.* (2001). A figura 3.2 representa a estratégia de amplificação do experimento. Uma região altamente conservada do genoma dos DENV (3’NC) foi escolhida para permitir uma amplificação eficiente de alta especificidade. O protocolo de amplificação do genoma viral dos DENV-3 foi desenvolvido neste trabalho. A concentração e o volume dos reagentes apresentados a seguir foram otimizados para padronização da metodologia.

Tabela 3.5: Iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) aplicado nos DENV-3.

Iniciadores	Sequência (5’ to 3’)	Região (Posição no genoma)	Tam Amplicon (pb)
DENV-3 sense	AGC ACT GAG GGA AGC TGT ACC TCC	3’NC (10533-10557)	
DENV-3 anti-sense	CAT TCC ATT TTC TGG CGT TCT	3’NC (10664-10680)	147
DENV-3 sonda	CTG TCT CCT CAG CAT CAT TCC AGG CA	3’NC (10637-10662)	

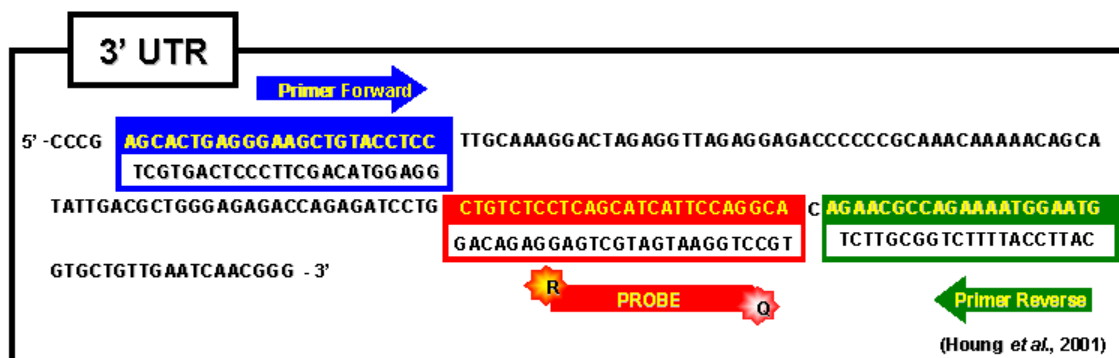


Figura 3.2: Estratégia de amplificação e iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™).

Metodologia

Para o preparo da curva padrão, foi realizado diluições seriadas (10^7 - 10^0) a partir do RNA viral ($5\mu\text{L}$ do RNA viral, cuja quantidade é conhecida (PFU/mL), diluído em $45\mu\text{L}$ do Tampão diluição - diluição 1:10.

Na obtenção da amostra padrão, fez-se necessário aplicar cálculos para verificar a quantidade real utilizada na reação final. Por exemplo: se a quantidade da amostra padrão for 10^7 PFU/mL e usa-se um volume $140\mu\text{L}$ no processo de extração, logo, estaremos utilizando $1,4 \times 10^6$ PFU/ $140\mu\text{L}$ que será eluído em $60\mu\text{L}$. Se utilizarmos $8,5\mu\text{L}$ deste produto para a reação final, estaremos utilizando $1,9 \times 10^5$ PFU/reação.

A reação de PCR em tempo real foi realizada em um único passo, constituída de $12,5\mu\text{L}$ de TaqMan™ 2x Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), $0,63\mu\text{L}$ de 40X Multiscribe e RNase inhibitor Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), os dois iniciadores e a sonda marcada com os corantes 3'FAM e 5'TAMRA a uma concentração final de 333nM $2\mu\text{L}$ cada, $2,37\mu\text{L}$ de H_2O nuclease-free (Promega Co, Madison, WI) e $8,5\mu\text{L}$ do RNA extraído, resultando em um volume final de $30\mu\text{L}$ /reação (Tabela 3.6). O RNA extraído foi reversamente transcrito a 45°C por 30 min, seguido da ativação da enzima Amplitaq a 95°C por 10 min e diretamente seguido de 45 ciclos de amplificação a 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min, com uma extensão final a 60°C por 1 min (Quadro 3.3). A plataforma ABI PRISM 7000 foi utilizada para a reação de RT-PCR em tempo real, coleta de dados e análise dos resultados.

Tabela 3.6: Preparo do Mix para reação de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™).

Reagentes	Concentração (estoque)	$\mu\text{l}/\text{tubo}$
TaqMan® Máster Mix	2X	12,5
Primer F	$5\mu\text{M}$	2
Primer R	$5\mu\text{M}$	2
Sonda	$5\mu\text{M}$	2
Multiscribe/RNAsin	40X	0,63
ddH ₂ O	---	2,37

Quadro 3.3: Condições de termociclagem utilizadas para a reação de PCR em tempo Real.

Reação de RT	45°C	30 min	1 ciclo
Ativação da Enzima (Amplitaq)	95°C	10 min	1 ciclo

<i>Desnaturação</i>	95° C	15 seg	45 ciclos
Anelamento / Extensão	60° C	1 min	
Extensão final	60° C	1 min	1 ciclo
Temperatura final	25° C	9 min	-

Interpretação do teste

Após o término de cada experimento, a análise dos dados respeitou os critérios apresentados nas figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6.

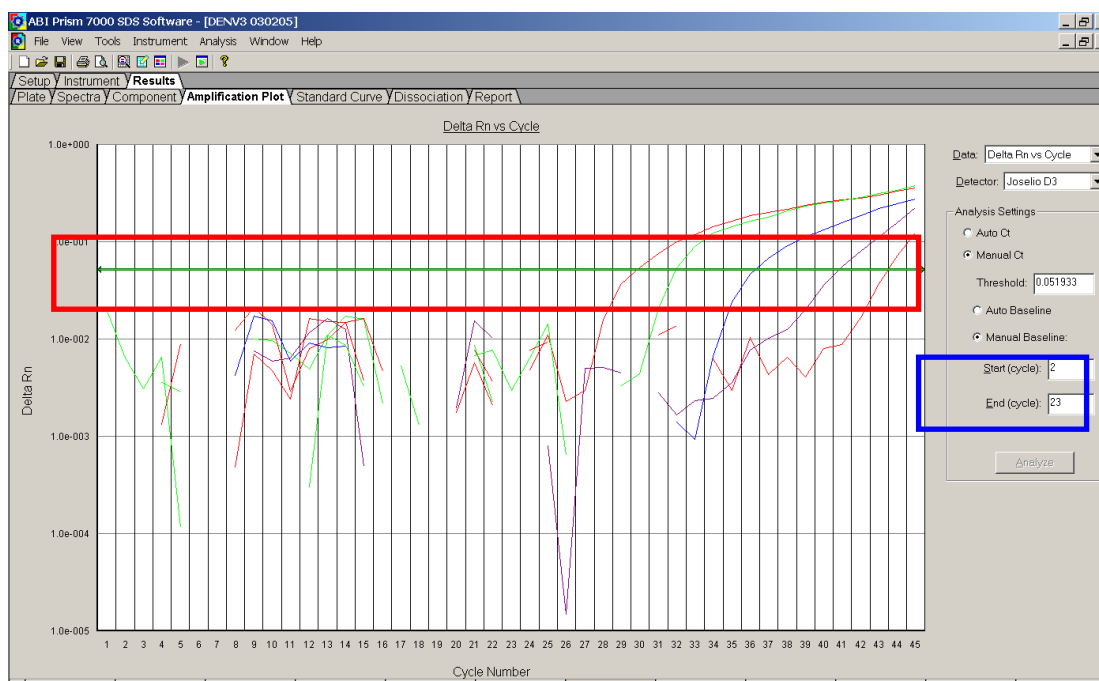


Figura 3.3: Campo “Amplification plot”. O “threshold” (quadro vermelho) foi posicionado acima dos controles negativos e no meio da fase exponencial de amplificação das amostras; ainda neste campo, foi definido o ciclo de análise do experimento em “Start (cycle)” e “End (cycle)”. (Ex: Start (cycle): 4 e End (cicle): 30) (quadro azul).

Nos campos “spectra” (Figura 3.4) e “Component” (Figura 3.5), foram realizadas análises quanto ao filtro de detecção e o aumento do nível de fluorescência detectada, respectivamente. A eficiência da reação e o coeficiente de correlação da curva padrão foram observados no campo “Standard Curve” (Figura 3.6).

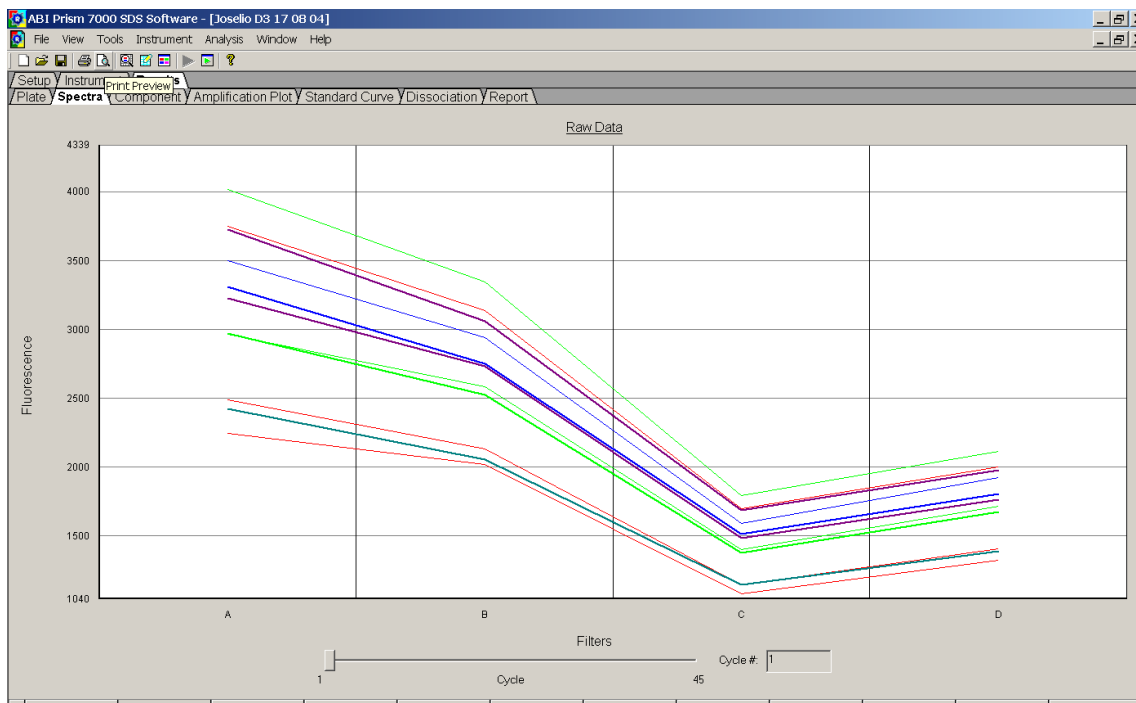


Figura 3.4: Campo "spectra", onde foi visualizado o filtro de detecção da fluorescência referente ao comprimento de onda dos fluoróforos utilizados.

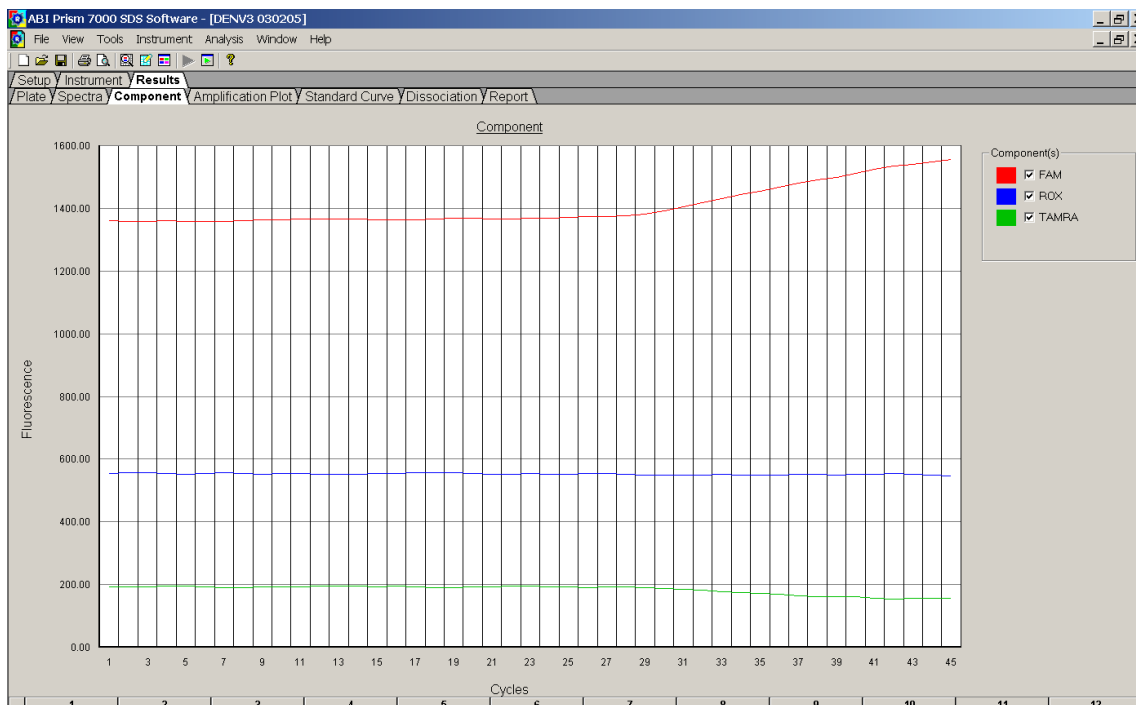


Figura 3.5: Campo "Component", onde foram realizadas análises quanto ao aumento do nível de fluorescência detectada.

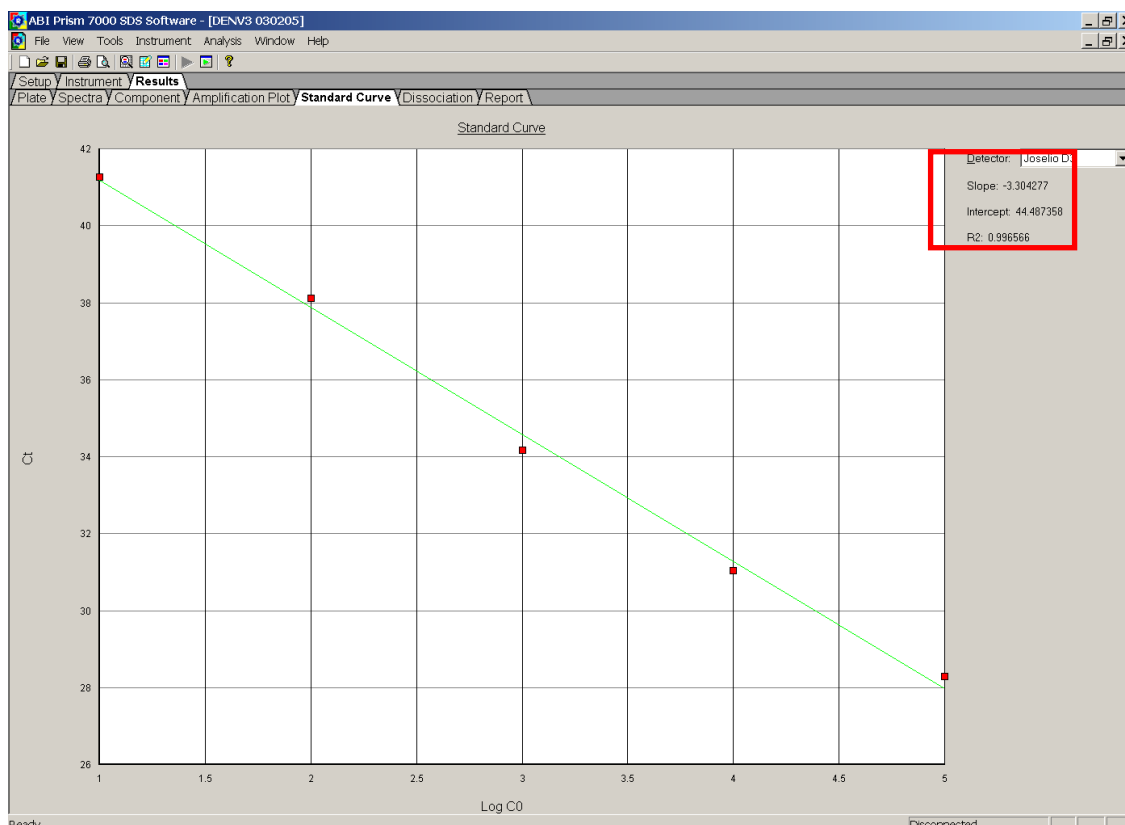


Figura 3.6: Campo “Standard Curve”. A curva padrão obteve um “slope” referente ao coeficiente de regressão com o valor próximo a $-3,3$ (“slope” $-3,3$ indica 100% de eficiência da reação) e o coeficiente de correlação ou de determinação (R^2) próximo a 1.0.

Modo de preparo das soluções – PCR em tempo real (Sistema TaqMan™)

Iniciadores e sondas utilizadas para reação de PCR em tempo real

Observar a concentração da sonda e dos iniciadores (liofilizados) na bula fornecida pelo fabricante (ex. 10000 pMol). Acrescentar 100 μL de água livre de nucleases (o estoque ficará portanto a 100 pMol/ μL = 100 μM).

A solução estoque que está a 100 pMol/ μL ou 100 μM foi diluída para 5 pMol/ μL ou 5 μM (10 μl do estoque + 190 μL de água livre de nucleases).

Preparo do Tampão diluição para Curva Padrão

O tampão para diluição do RNA viral padrão é constituído de 20 μL de 10X RT PCR Buffer, 178 μL de água livre de nucleases (Promega Co, Madison, WI) e 2 μL de RNase Inhibitor (RNAsin) (Promega Co, Madison, WI), obtendo um volume final de 200 μL .

3.11 Imunohistoquímica

Este método foi realizado no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC) e os resultados obtidos foram incluídos neste estudo como método complementar na análise dos nossos resultados, considerando que os espécimes clínicos foram obtidos dos mesmos pacientes estudados (Nogueira *et al.*, 2005).

A imunohistoquímica foi realizada a partir de amostras de fígado fixado em formalina tamponada utilizando o método da avidina-biotina-peroxidase por kits comerciais (Kit LSAB, DAKO, USA) como descrito por Miagostovich *et al.* (1997). Os anticorpos monoclonais para DENV-3 utilizados no método foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Gubler (Center for Disease Control and Prevention, Colorado, USA).

3.12 Análise e Banco de dados

O programa “Microsoft® Access 2000” foi utilizado para banco de dados. As análises estatísticas foram realizadas no programa “Microsoft Excel 2000”.

4. RESULTADOS

4.1 Implantação da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) para o vírus dengue tipo 3

Para implantação da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™), a concentração e o volume dos reagentes foram otimizados: 1) concentração dos iniciadores e sonda; 2) volume do *Master Mix Reagent Kit* (Applied Biosystems) e; 3) concentração e volume do RNA viral extraído.

Para o ajuste da concentração de iniciadores e sonda, os mesmos foram diluídos de 500nM até 100nM. Os volumes de *Master Mix* (25 μ L) e RNA (5 μ L) foram mantidos, ficando estabelecido como ideal, a concentração de 333 nM para ambos.

Após estabelecer a concentração ideal de iniciadores e sonda, a etapa seguinte consistiu na otimização da concentração do RNA viral. Para isso, o produto extraído foi eluído em 30 μ L e 60 μ L de AVE (kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit – Qiagen). Nessa etapa, o volume de *Master Mix* foi mantido em 25 μ L. Considerando que não foi verificada diferença na amplificação (Figura 4.1), permaneceu o volume recomendado pelo fabricante 60 μ L.

Em seguida, foi testado o volume de *Master Mix* utilizando 12,5 μ L e 25 μ L, com o volume e concentrações já otimizados (Figura 4.2). Tendo em vista o alto custo do experimento, o volume do *Master Mix* foi fixado em 12,5 μ L considerando que não houve diferença na amplificação.

Para a curva padrão, foram realizadas diluições seriadas da amostra de Referência (10^5 a 10^1 PFU/mL) antes da extração do RNA viral. Em paralelo, procedeu-se a extração do RNA da amostra de Referência após o que o RNA foi submetido às mesmas diluições. O perfil de amplificação das amostras (Figura 4.3) e a análise dos Cts (Tabela 4.1) não revelaram diferenças significativas neste procedimento.

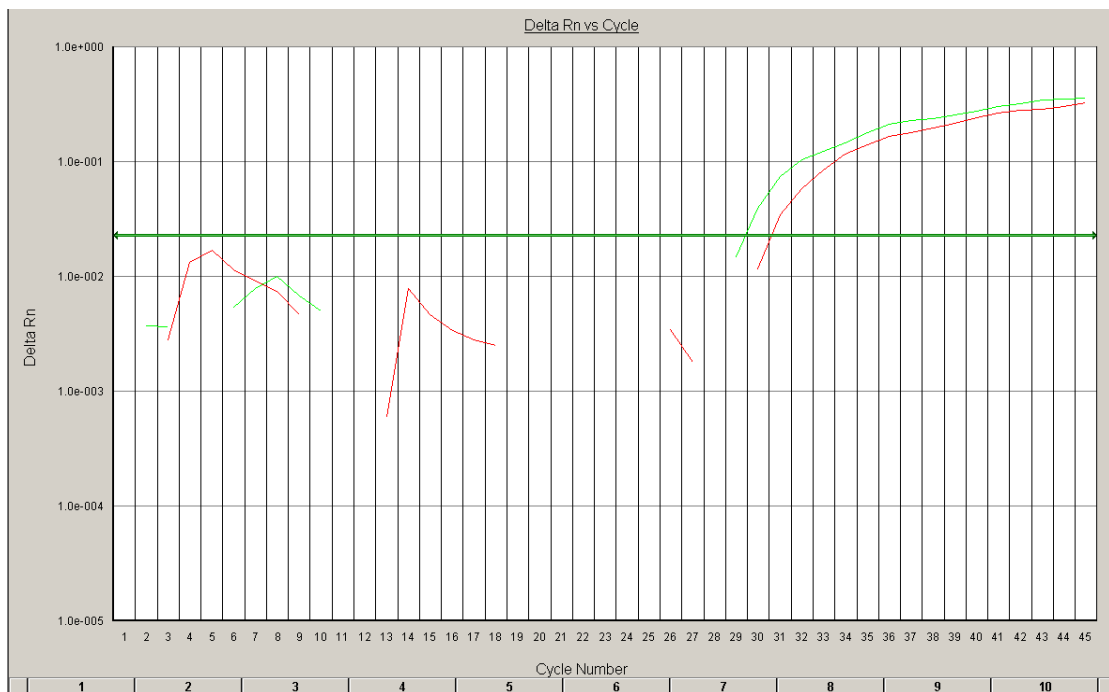


Figura 4.1: Teste de concentração de RNA. Perfil de amplificação do RNA do DENV-3 extraído quando eluído em 30µL (em verde) e 60µL (em vermelho) de AVE.

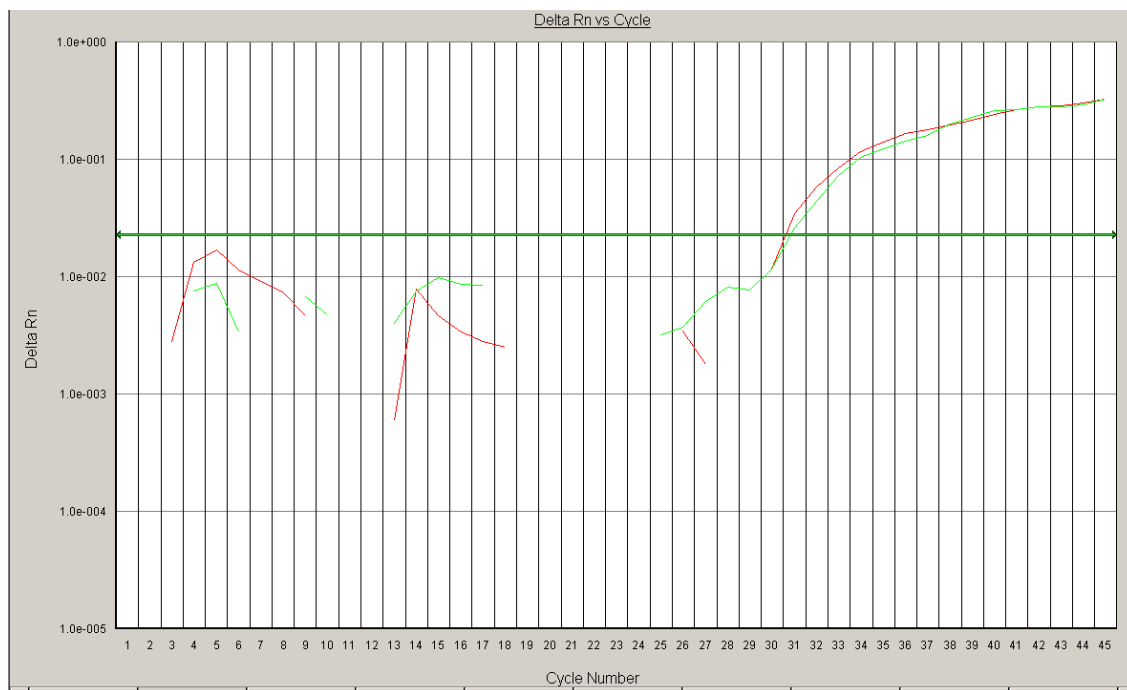


Figura 4.2: Teste do volume de 12,5µL (verde) e 25µL (vermelho) de *Master Mix*.

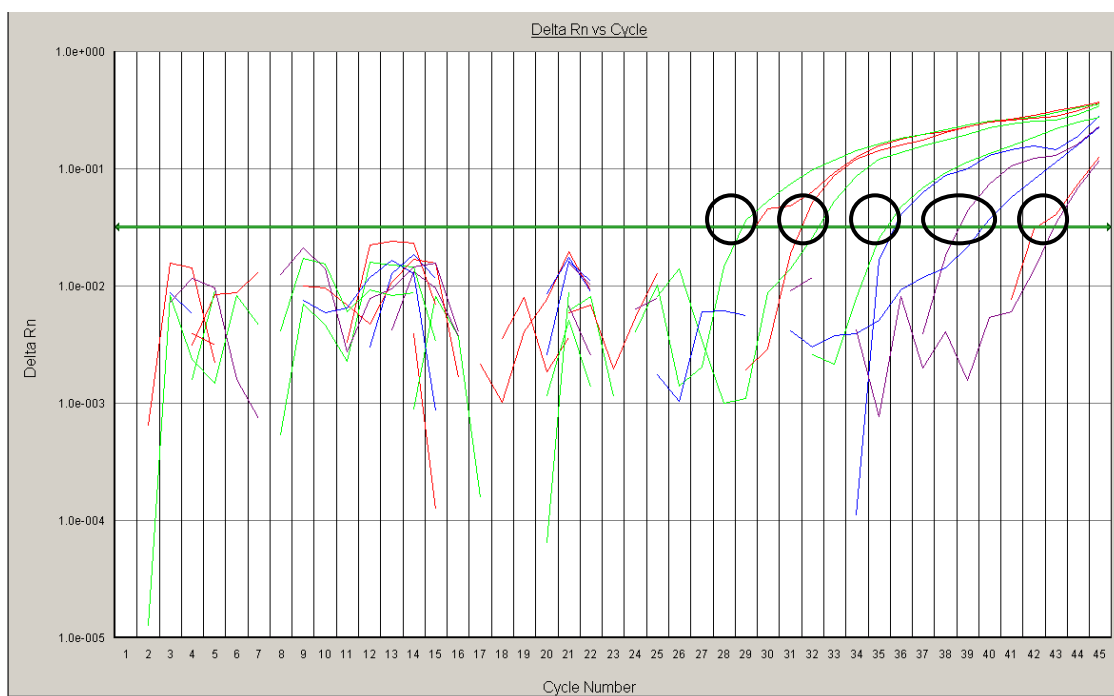


Figura 4.3: Perfil de amplificação das amostras. Da esquerda para direita, os círculos indicam as concentrações 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 referentes às diluições realizadas antes e depois da extração do RNA viral, respectivamente.

Tabela 4.1: Comparação das curvas padrão diluindo o vírus (DENV-3) e o RNA antes e após a extração, respectivamente.

PFU / mL	PFU / Reação	Ct (antes)	Ct (após)
10^7	$1,9 \times 10^5$	29.35	28.80
10^6	$1,9 \times 10^4$	32.22	31.39
10^5	$1,9 \times 10^3$	35.64	35.29
10^4	$1,9 \times 10^2$	38.54	39.65
10^3	$1,9 \times 10^1$	42.09	42.87

4.1.1 Teste de sensibilidade

Para verificar a sensibilidade do teste, variou-se o volume de RNA viral de $5\mu\text{L}$ a $10\mu\text{L}$, obtendo-se um limiar de detecção de $1,9 \times 10^1$ PFU/reação quando utilizado um volume de $8,5\mu\text{L}$ de RNA viral (Figuras 4.4 e 4.5), que foi aplicado a todas as provas.

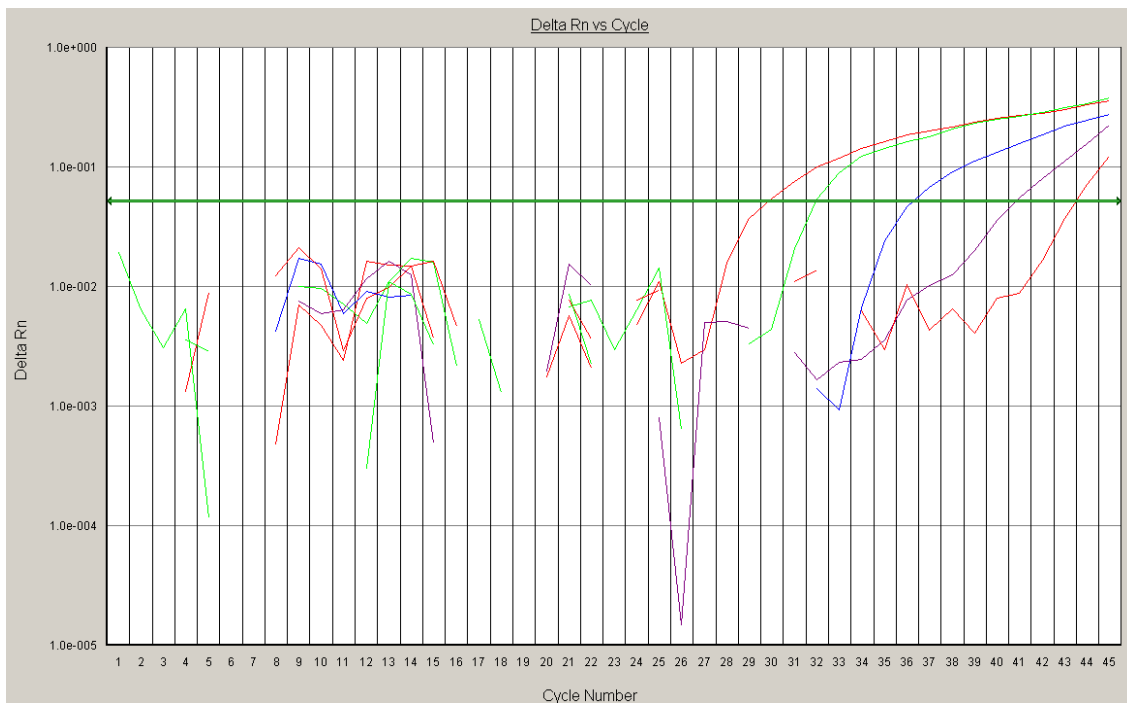


Figura 4.4: Teste de sensibilidade representado pela intensidade de fluorescência relativa (ΔRn) contra o número de ciclos quando utilizado o volume de 8,5uL. Da esquerda para direita, as curvas indicam as concentrações 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 .

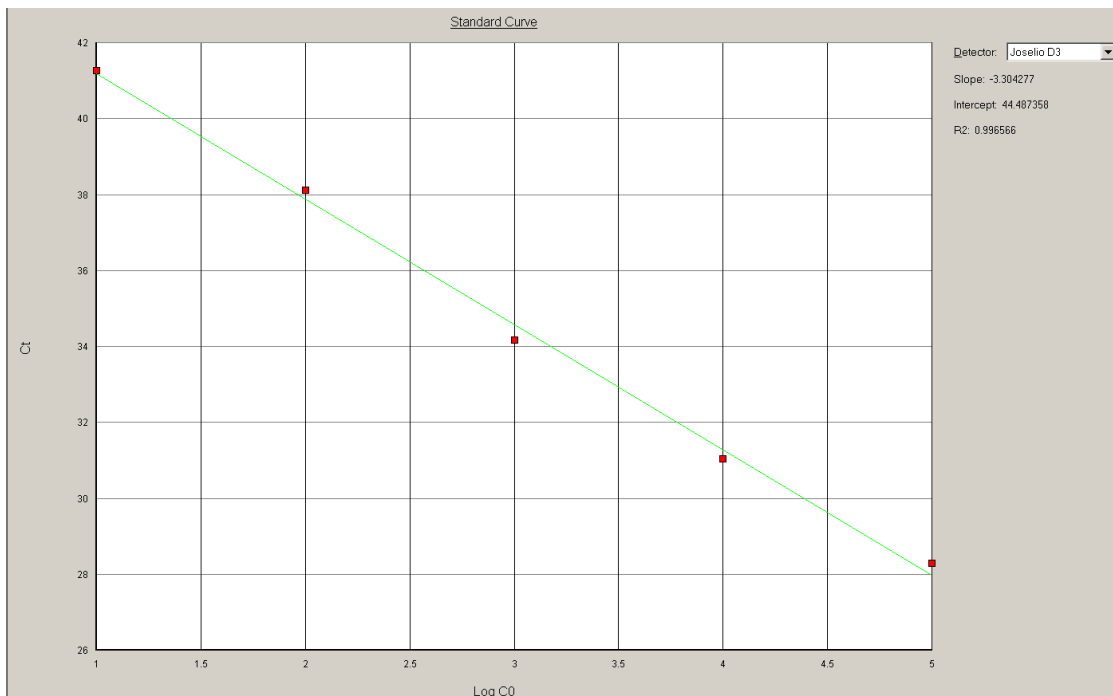


Figura 4.5. Curva padrão demonstrando a amplificação na concentração $1,9 \times 10^1$ do RNA viral, com o coeficiente de correlação entre 0,97 e 1,0; e o "slope" abaixo de $-3,5$.

4.1.2 Teste de especificidade

Para o teste de especificidade, utilizou-se os vírus DENV-1, DENV-2, vírus da febre amarela vacinal (17DD), vírus mayaro, vírus oropouche, vírus da encefalite eqüina

venezuelana e vírus da encefalite equina leste. O PCR em tempo real demonstrou 100% de especificidade para os DENV-3 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Teste de especificidade aplicado à técnica de PCR em tempo real para detecção do DENV-3.

Vírus	Negativo/Total (%)
DENV-1/RJ/2002	3/3.
DENV-1/ES/2002	3/3.
DENV-2/RJ/2002	3/3.
DENV-2/ES/2002	3/3.
Febre Amarela (17DD)	1/1.
Vírus Mayaro (MAY)	1/1.
Vírus Oropouche (ORO)	1/1.
Vírus da encefalite equina Venezuelana (VEE)	1/1.
Vírus da encefalomielite equina do Leste	1/1.
Total (%)	17/17 (100%)

4.1.3 Reprodutibilidade dos Experimentos

Para verificar a reprodutibilidade da técnica de PCR em tempo real, um total de 11 experimentos foram analisados. A análise da variação dos Cts através do teste Qui-quadrado em três diluições sucessivas, revelou valores totalmente homogêneos, ou seja, sem diferenças significativas ($p=0,998$), demonstrando a alta reprodutibilidade da técnica (Figura 4.6).

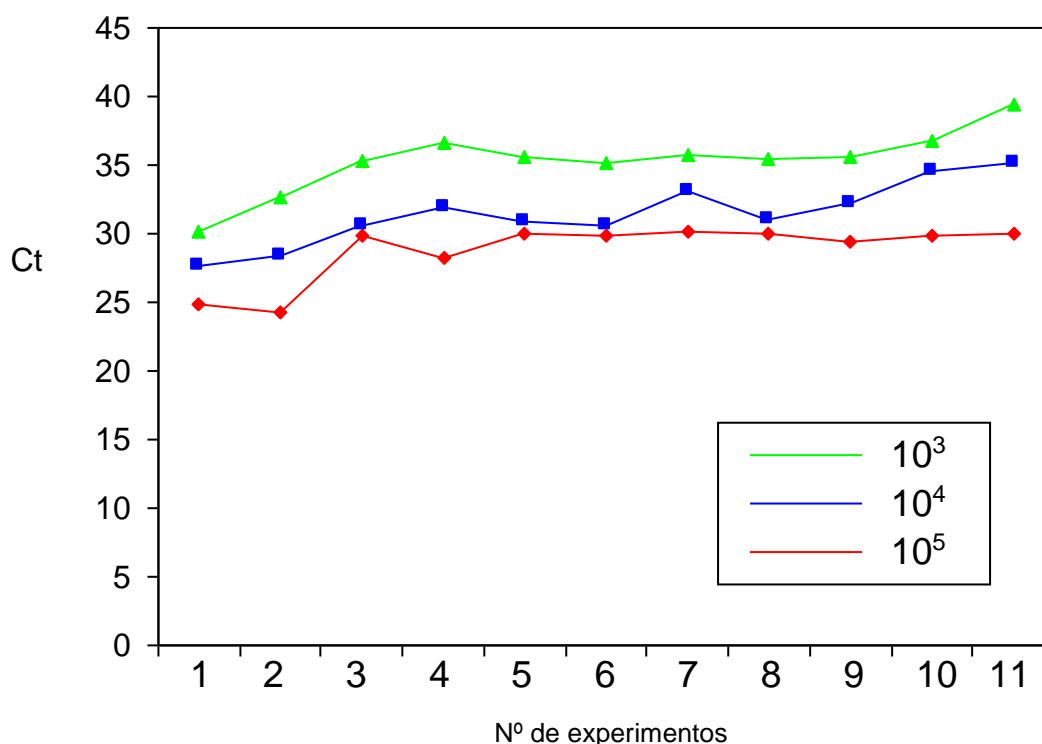


Figura 4.6: Reprodutibilidade dos experimentos de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™). A análise dos valores de Ct através do teste Qui-quadrado não revelou diferenças significativas ($p=0,998$), demonstrando a alta reprodutibilidade da técnica. A legenda indica as concentrações utilizadas.

4.2 Aplicação da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) em amostras de fígado provenientes de casos fatais ocorridos durante a epidemia de dengue em 2002 no estado do Rio de Janeiro.

Dos 28 casos estudados, o PCR em tempo real confirmou a infecção por DENV-3 em 64,2% (18/28) dos casos como exposto na tabela 4.3. Para comparação com outras metodologias, os resultados previamente obtidos por Nogueira *et al.* (2005) foram incluídos e estão apresentados de forma mais detalhada no Quadro 10.1. O PCR convencional confirmou 29,6% (8/27), isolamento viral 7,6% (2/26), e a imunohistoquímica 63,6% (14/22) (Figura 4.7). Nos dois casos onde se obteve espécimes em duplicata, um deles apresentou resultado positivo pelo PCR em tempo real. Na confirmação dos casos, o PCR em tempo real contribuiu isoladamente em 6 casos, a imunohistoquímica em 3 e o PCR convencional em 1 caso. Nenhum caso foi confirmado somente por isolamento (Figura 4.8).

Tabela 4.3: Detecção de DENV-3 em 28 casos fatais por diferentes metodologias.

Espécime Clínico	Positivo/Total (%)			
	RT-PCR (TaqMan®)	IHQ**	RT-PCR	Isolamento a*
Fígado	18/28 (64,2)	14/22 (63,6)	8/27 (29,6)	2/26 (7,6)

a Imunofluorescência Indireta (IFI) em Culturas de células clone C6/36.

* Apud Nogueira *et al.*, 2005

** Imunohistoquímica

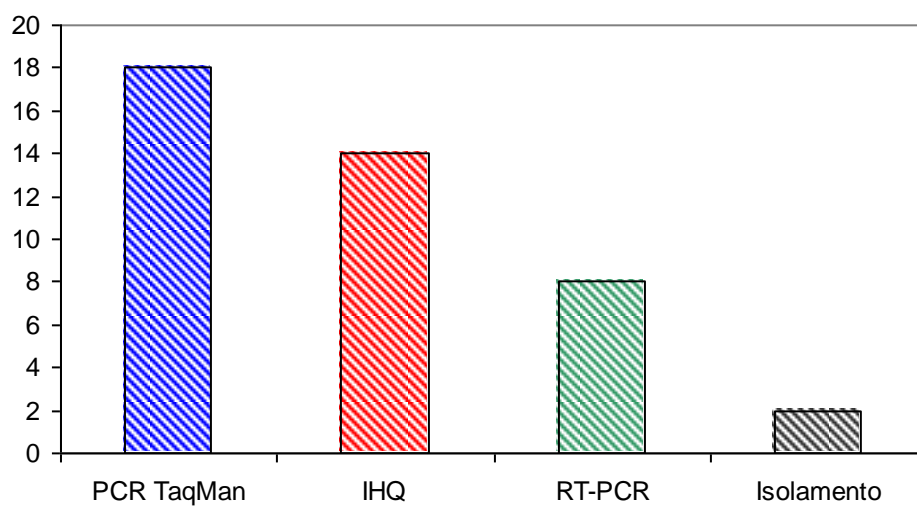


Figura 4.7: Casos confirmados de DENV-3 por diferentes metodologias (n=28).

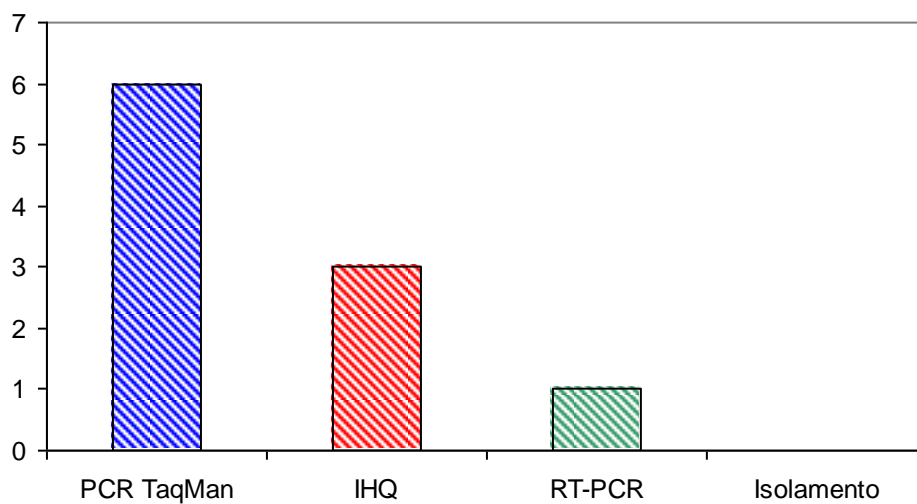


Figura 4.8: Contribuição de cada metodologia se considerada única na casuística para confirmação dos casos.

4.3 Vigilância Viroológica do dengue no estado do Rio de Janeiro no período 2004-2005

Entre janeiro de 2004 a dezembro de 2005 foram estudados 839 casos suspeitos de dengue. Nesta casuística estão incluídos 17 casos fatais ocorridos em 2004 e 12

casos fatais no ano de 2005. Desse total, 723 casos foram inoculados em cultura de células, e 815 submetidos à RT-PCR. A infecção foi confirmada através do isolamento viral e/ou RT-PCR em 4% (34/839) dos pacientes. Nenhum caso fatal por DENV-3 foi confirmado no ano de 2004, entretanto, em 2005, o DENV-3 foi identificado em dois óbitos ocorridos no município do Rio de Janeiro pelo PCR convencional.

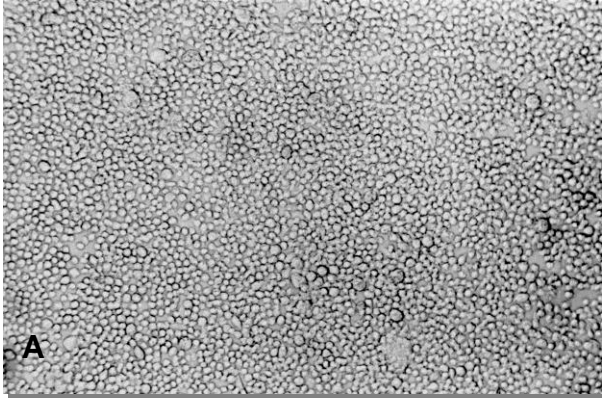
4.3.1 Isolamento e identificação dos sorotipos de dengue circulantes no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2004-2005

O isolamento viral (figura 4.9) foi obtido em 0,4% (3/723) dos casos. Através da técnica de PCR (figura 4.10) foi possível identificar o sorotipo infectante em 4% (31/815) dos casos (Tabela 4.4).

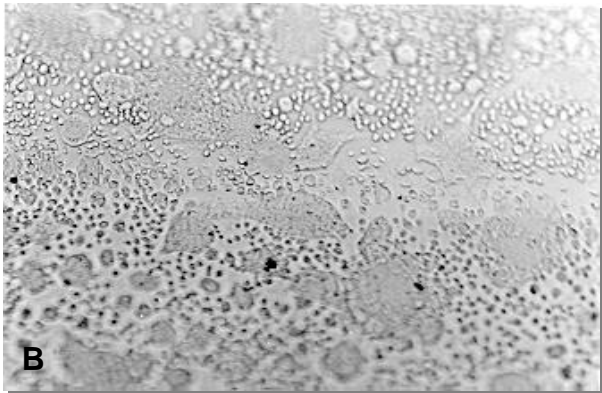
Observando-se a distribuição mensal dos casos estudados no ano de 2004 verifica-se uma baixa circulação de vírus com apenas dois casos no mês de março. No ano de 2005, entretanto, dois surtos foram reconhecidos: um deles localizado no município de Campos dos Goytacazes (Região Norte Fluminense) entre os meses de março a junho e outro, no município do Rio de Janeiro no mês de dezembro (Figuras 4.11 e 4.12) com a confirmação de dois casos fatais.

Tabela 4.4: Distribuição mensal dos casos estudados por isolamento viral e RT-PCR durante o período 2004 - 2005, no estado do Rio de Janeiro.

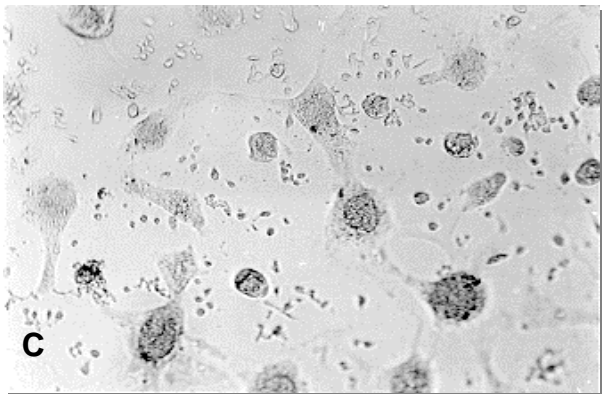
Mês	Isolamento		RT-PCR	
	Ano			
	<i>Positivo/Total testados (Sorotipo)</i>			
	2004	2005	2004	2005
Janeiro	0/33	0/44	0/33	0/49
Fevereiro	0/36	0/37	0/23	0/41
Março	1/46 (1 DENV-3)	1/21 (1 DENV-3)	1/37 (1 DENV-3)	1/21 (1 DENV-3)
Abril	0/15	0/37	0/15	2/56 (2 DENV-3)
Maio	0/12	0/35	0/11	0/37
Junho	0/18	0/56	0/23	7/57 (7 DENV-3)
Julho	0/14	0/32	0/19	2/33 (2 DENV-3)
Agosto	0/19	0/48	0/18	4/48 (4 DENV-3)
Setembro	0/23	0/12	0/25	1/15 (1 DENV-3)
Outubro	0/16	0/28	0/22	1/36 (1 DENV-3)
Novembro	0/38	1/45 (1 DENV-3)	0/38	4/59 (4 DENV-3)
Dezembro	0/43	0/15	0/49	8/50 (8 DENV-3)
Total	1/313 (1 DENV-3)	2/410 (2 DENV-3)	1/313 (1 DENV-3)	30/502 (30 DENV-3)



A) Cultura de células não infectada. (40X)



B) Formação de sincícios (100X): 4 dias após a inoculação.



C) ECP com vacuolização celular (100X): 8 dias após a inoculação.

Figura 4.9: Cultura de células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 inoculada com soro agudo ou amostras de tecido fresco de paciente com suspeita de infecção pelos vírus dengue para isolamento viral.

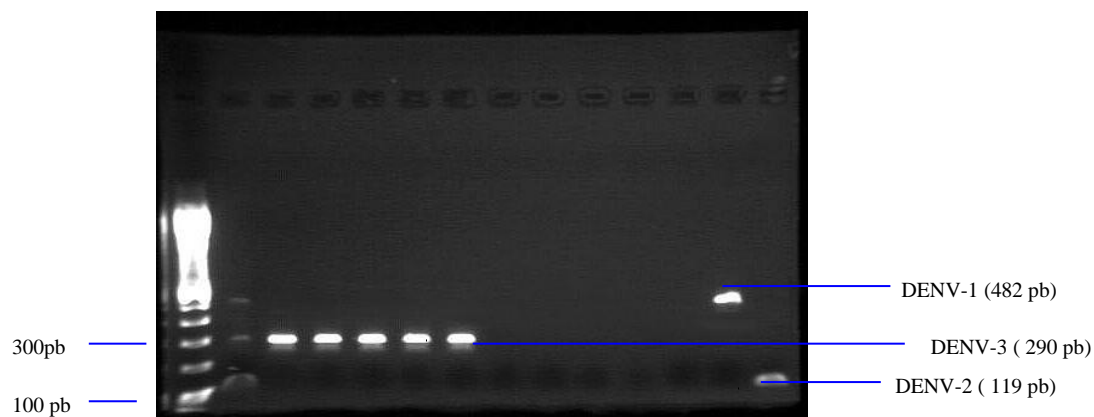


Figura 4.10: Eletroforese em gel de agarose a 1%. Visualização dos produtos amplificados pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para tipagem dos DENV. Linha 1: Marcador de PM de 100pb (Gibco); linha 2: Mistura dos produtos amplificados dos DENV-1, DENV-2 e DENV-3; linha 3, 4, 5, 6 e 7: amostras positivas para DENV-3 (registros 80104, 80273, 80274, 80275, 80280); linha 8,9,10 e 11: amostras negativas (registros 79703, 79704, 79705, 79706, respectivamente); linha 12: controle negativo; linha 13: controle positivo para DENV-1 (registro 76889); linha 14: controle positivo para DENV-2 (registro 76965).

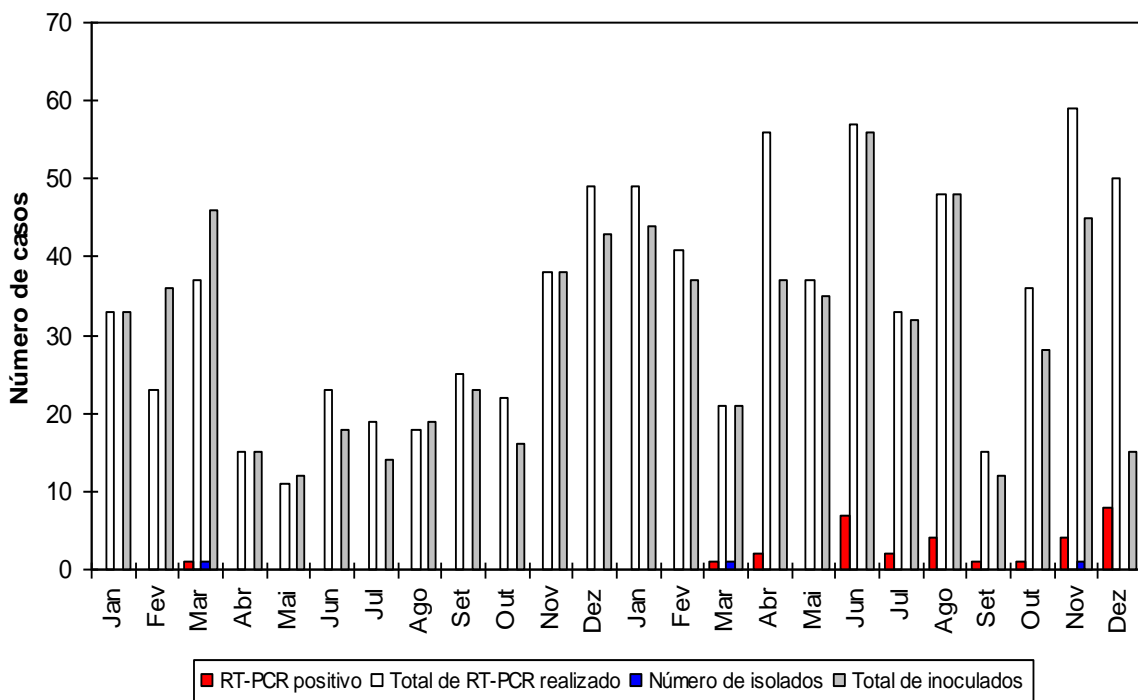


Figura 4.11: Distribuição mensal dos casos estudados suspeitos de DENV ocorridos no Estado do Rio de Janeiro nos anos 2004-2005.

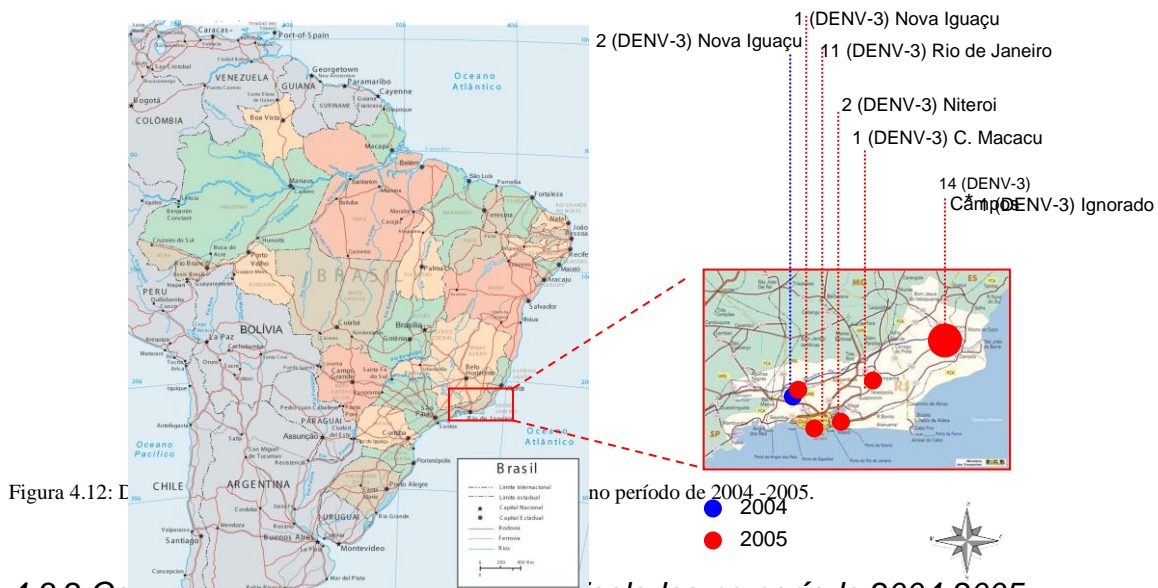


Figura 4.12: D

4.3.2 Caracterização genética dos vírus isolados no período 2004-2005

Para a caracterização genética dos DENV-3, amostras representativas dos anos 2004 e 2005 foram submetidas ao sequenciamento parcial das regiões dos genes que codificam as proteínas prM, M e E (Tabela 4.5). Os resultados das reações de sequenciamento podem ser visualizados na figura 4.13.

Tabela 4.5: Amostras submetidas ao sequenciamento nas regiões dos genes que codificam as proteínas prM, M e E dos DENV-3.

Identificação da Cepa	Sorotipo	Origem da Cepa	Ano Isolamento	Isolamento do Vírus em:	Regiões sequenciadas
BR78670/04	DENV-3	RJ, Brasil.	2004	Soro	prM/M/E
BR79941/05	DENV-3	RJ, Brasil.	2005	Soro	prM/M/E

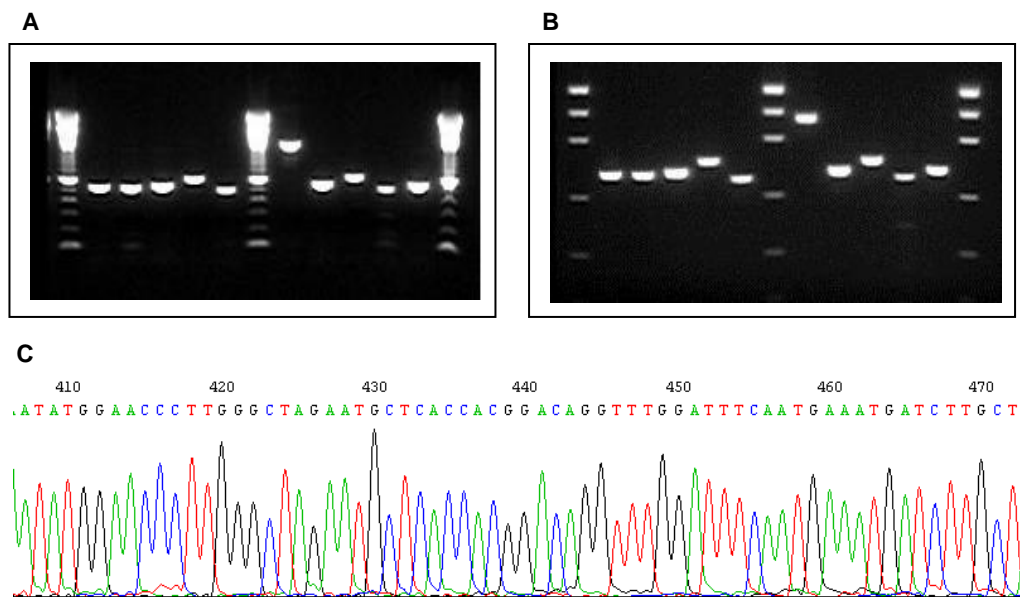


Figura 4.13: A) Visualização dos produtos de RT-PCR através de eletroforese em gel de agarose a 1%. B) Eletroforese em gel de agarose a 1% utilizada para quantificação dos produtos pós-purificados para a reação de sequenciamento e C) Eletroferograma dos produtos submetidos ao sequenciamento. A) Linhas 1,7e13: Marcador de PM de 100pb (Gibco); Linha 2,3,4,5,6,9,10,11,12: Amostras submetidas ao sequenciamento de ~500pb (Registros: BR/RJ78670/04 e BR/RJ79941/05); Linha 8: Amostra submetida ao sequenciamento de ~1000pb. B) Linhas 1,7e13: Marcador para quantificação (*low mass*); Linhas 2,3,4,5,6,8, 9,10,11,12: Amostras purificadas que, em uma etapa posterior, foram submetidas a reação de sequenciamento (Registros BR/RJ78670/04 e BR/RJ79941/05). C) Padrão eletroforético das amostras seqüenciadas.

A análise filogenética das seqüências obtidas confirmou a circulação do genótipo III ou genótipo Subcontinente Indiano (Figura 4.14).

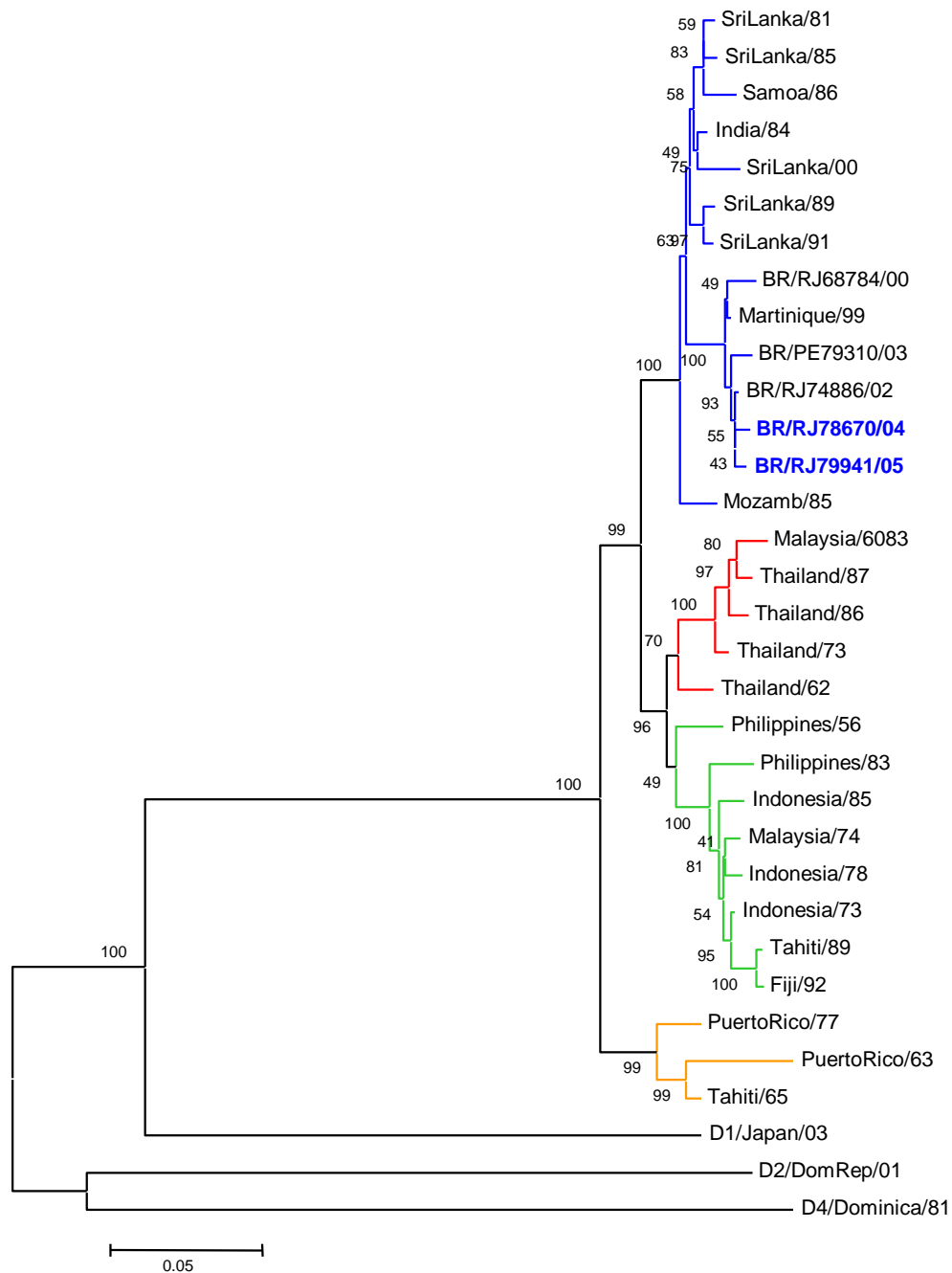


Figura 4.14: Análise filogenética das amostras seqüenciadas (regiões prM, M e E) (posição 437 a 2413) representantes dos DENV-3 circulantes nos anos 2004-2005 no estado do Rio de Janeiro. As seqüências dos diferentes genótipos estão representadas por cores: Subcontinente Indiano (azul), Tailândia (vermelho), Sudeste Asiático e Sul do Pacífico (verde) e Americano (amarelo). As seqüências das cepas de DENV-1 (Japan/03), DENV-2 (DomRep/01), e DENV-4 (Dominica/81) foram utilizadas como grupos externos. Os vírus foram designados a partir do país de origem, seguida do ano de isolamento. Os valores de *bootstrap* estão indicados nos *branchpoints*.

5. DISCUSSÃO

Diversas vantagens têm sido atribuídas à técnica de PCR em tempo real quando comparada ao PCR convencional (RT-PCR), como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e rapidez (Callahan *et al.*, 2001).

Uma das características do método consiste em permitir o monitoramento da amplificação em tempo real. A técnica de PCR em tempo real, por possuir um sistema automatizado de detecção do ácido nucléico e considerando que os tubos de reação não são abertos durante a prova, reduz a possibilidade de contaminação com produtos amplificados. Dessa forma, resultados falso-positivos não são esperados.

O método atualmente ainda representa um custo elevado. Por outro lado, pelas vantagens acima descritas, essa metodologia deverá ser incorporada ao diagnóstico de dengue em curto prazo.

Durante o processo de otimização da reação, obteve-se uma considerável redução dos reagentes sem prejuízo da performance do teste, o que certamente repercutirá na diminuição dos custos desta prova.

Os iniciadores e sonda utilizados na técnica de PCR em tempo real foram desenhados por Houg *et al.* (2001) para a região 3'NC do DENV-3 (Figura 3.2). Essa mesma região tem sido utilizada por vários autores como alvo para detecção dos DENV, como os trabalhos realizados por Callahan *et al.* (2001), Drosten *et al.* (2002), Parida *et al.* (2005) e Chutinimitkul *et al.* (2005).

Neste trabalho o teste de sensibilidade do PCR em tempo real conferiu um limiar de detecção de $1,9 \times 10^1$ PFU/reação. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos realizados por Poersch *et al.* (2005) que obtiveram um limiar de detecção de 0,62 PFU/reação e Callahan *et al.* (2001) 56 PFU/mL. Da mesma forma, Chen *et al.* (2001) verificaram um limiar de detecção de 1,4 PFU/reação e Houg *et al.* (2001) 20 PFU/mL.

Objetivando o aumento da sensibilidade do método PCR em tempo real, um procedimento a ser incorporado poderia ser a centrifugação da amostra a ser testada resultando na concentração de partículas virais como já se utiliza para outros vírus como o HIV-1 (*Amplicor HIV-1 Monitor* - Roche™). Este procedimento possibilitou um aumento na sensibilidade de detecção de 400 para 50 cópias de RNA viral/mL de plasma (Leite, 2005).

Casos fatais que preencham a definição de casos suspeitos de dengue com resultados previamente negativos poderiam ser submetidos a este procedimento. Há que considerar, entretanto, mais uma etapa no processamento da prova.

Johnson *et al.* (2005) desenvolveram um protocolo de PCR em tempo real capaz de detectar os quatro sorotipos de dengue simultaneamente. Este protocolo consiste na mistura de quatro grupos de iniciadores e sondas em uma única reação. A prova revelou uma sensibilidade de 0,002 PFU/reação para DENV-2, DENV-3 e DENV-4 e 0,5 PFU/reação para DENV-1.

Métodos de tipagem dos DENV que envolvem reações multiplex, como o apresentado acima diminui os custos da prova. Porém, torna-se importante uma avaliação quanto à sensibilidade do método frente a amostras clínicas.

Outros trabalhos que utilizam número de cópias de RNA/mL como padrão, diferente do método apresentado neste estudo (PFU), como os realizados por Drosten *et al.* (2002), obtiveram um limiar de detecção de 8,6 cópias/reação e Laue *et al.* (1999), 500 cópias/mL (Tabela 7.1).

Richardson *et al.* (2006) estudando a interação vírus-célula em *Aedes aegypti*, utilizando o sistema SYBR Green para DENV-2, demonstrou uma sensibilidade de 20

cópias/reacção. Embora a sensibilidade do sistema SYBR Green seja comprovada, a especificidade deve ser avaliada, considerando a inespecificidade da molécula SYBR.

Chutinimitkul *et al.* (2005) descreveram um protocolo de PCR em tempo real baseado no sistema SYBR Green que utiliza um único par de primer. Este protocolo detecta os quatro sorotipos de DENV simultaneamente através da análise da curva de dissociação, demonstrando diferentes temperaturas de dissociação para cada sorotipo.

Atualmente existem diversos protocolos para o PCR em tempo real para dengue e os resultados expressos em diferentes unidades – número de cópias/reacção, número de cópias/mL, PFU/reacção, PFU/mL. A expressão em uma forma padronizada facilitaria a comparação entre os resultados.

Recentemente, a OMS estabeleceu um painel de plasmas para que fossem realizados diferentes testes quantitativos para o HCV. Com esta padronização, independente da metodologia utilizada, o resultado passou a ser expresso em Unidades Internacionais por mL (UI/mL) (apud Leite, 2005; Saldanha *et al.*, 1999).

O método de PCR em tempo real aqui implantado obteve 100% de especificidade, não apresentando reacção cruzada com outros membros da Família *Flaviviridae*, assim como para outros arbovírus. Estudos realizados por Parida *et al.* (2005) que utilizam a mesma região alvo do genoma (3'NC), obtiveram os mesmos resultados.

Dos 28 casos estudados, o PCR em tempo real confirmou a infecção por DENV-3 em 64,2% (18/28) dos casos. Este resultado foi significativo quando comparado com os índices de detecção observados nas técnicas de RT-PCR que confirmou a infecção em 29,6% (8/27) ($p=0,02$) e o isolamento do vírus com 7,6% (2/26) ($p=0,0000$).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com Poersch *et al.* (2005), demonstrando uma maior sensibilidade da técnica de PCR em tempo real 34% (17/50) comparado à técnica de PCR convencional 8% (4/50) na confirmação dos casos de dengue.

Cabe assinalar a importância do PCR em tempo real nesta casuística como ferramenta na confirmação de seis novos casos de DENV-3, que foram negativos por outras metodologias como RT-PCR, imunohistoquímica e isolamento (Figura 4.8 e Quadro 10.1) contribuindo com um aumento na confirmação diagnóstica em 21% (6/28) dos casos.

Nesta casuística dois casos apresentaram resultados positivos pela técnica de PCR convencional com resultados negativos por PCR em tempo real. Este resultado foi inesperado. Um desses casos por oportuno foi confirmado também pela prova de imunohistoquímica, o que sugere que a replicação dos vírus no tecido hepático não ocorre de maneira uniforme, como já descrito para outros flavivírus (Filippis *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por Lindegren *et al.* (2005) na Suécia, utilizou as metodologias de RT-PCR Multiplex e RT-PCR TaqMan™ para pesquisa do ácido nucléico viral em soros de pacientes suecos que estiveram presentes em áreas endêmicas de dengue. Esse estudo confirmou a infecção por DENV em 68% (RT-PCR Multiplex) e 73% (RT-PCR TaqMan™) dos casos onde o soro foi coletado até o quarto dia após o início dos sintomas. Esses dados estão de acordo com os nossos

resultados, confirmando a maior sensibilidade do método de RT-PCR em tempo real em comparação ao RT-PCR convencional.

Ito *et al.* (2004) desenvolveram protocolos de RT-PCR em tempo real para pesquisa dos 4 sorotipos de DENV. Um total de 35 amostras de soro foram submetidas às técnicas de RT-PCR TaqMan™ e RT-PCR convencional. A infecção por DENV foi confirmada em 100% pelo método de RT-PCR TaqMan™ e 87% pelo RT-PCR convencional, confirmando a maior sensibilidade do método de RT-PCR em tempo real.

Nossos resultados reforçam a importância da incorporação do PCR em tempo real como mais um método a ser aplicado pelos Laboratórios de Referência da Rede Nacional de Diagnóstico de Dengue.

Os resultados obtidos pelo PCR em tempo real e pela técnica de imunohistoquímica nesta casuística 63,6% (14/22) demonstram o tropismo dos vírus dengue pelo hepatócito. Dessa forma a coleta de tecido hepático *pos-mortem* torna-se de grande importância para confirmação de casos fatais de dengue (Nogueira *et al.*, 2005).

A utilização da técnica de RT-PCR em tempo real para fins de quantificação do RNA dos DENV em amostras de fígado apresenta limitações considerando-se como previamente mencionado, a não uniformidade da replicação viral no tecido hepático, aceitando-se porém o diagnóstico qualitativo como adequado.

Apesar da bile ter sido descrita como tendo efeito virucida inclusive para os DENV, alguns autores admitem que a presença do DENV no fígado seja tão freqüente como no soro (Rosen & Khin, 1989; Itha *et al.* 2005 e Larreal *et al.*, 2005).

Este tecido foi reconhecido como um órgão alvo para a patogênese da infecção do DENV e a ativa replicação em hepatócitos (Couverlard *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Basílio-de-Oliveira *et al.*, 2005), inclusive relacionado a casos de hepatite aguda por DENV (Mourão *et al.*, 2004, Souza *et al.*, 2005).

O método de RT-PCR em tempo real por sua alta sensibilidade encontra aplicação em estudos sobre a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, em particular na interação vírus-células. Um estudo realizado por Liew & Chow (2006) pesquisando diferentes genes envolvidos na apoptose, receptores celulares, genes envolvidos na regulação da transcrição, tradução, enzimas, transporte de proteínas, demonstrou alta concordância entre os dados obtidos pelos métodos de RT-PCR em tempo real e DNA *microarrays* na pesquisa de genes humanos expressos por células endoteliais durante a infecção por DENV-2.

Atualmente não se conhece em profundidade a patogenia dos vírus dengue e um dos fatores discutidos é o nível de viremia. Um estudo realizado por Vaughn *et al.* (2000) na Tailândia demonstrou uma maior viremia em formas graves da doença. Os autores utilizaram a inoculação intratorácica de mosquitos em associação a cultura de células e ao PCR convencional. Atualmente, o PCR em tempo real oferece maior praticidade na realização de estudos desta natureza com resultados mais rápidos e precisos.

Acreditamos que a aplicação de novas técnicas de diagnóstico molecular como o PCR em tempo real (Sistema TaqMan™), que possui alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, possa contribuir de forma singular apoiando os Programas de

Vigilância Epidemiológica, na confirmação de casos fatais e na rápida confirmação de casos suspeitos.

No contexto da Vigilância Viroológica, o estado do Rio de Janeiro tem sido de grande importância epidemiológica para introdução e dispersão dos DENV no Brasil. Nos últimos 20 anos, o Estado foi marcado por extensas epidemias resultantes da introdução dos DENV-1 em 1986, DENV-2 em 1990 e DENV-3 em 2000 sendo a Região Metropolitana a mais afetada (Schatzmayr *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1990; 1993; Miagostovich *et al.*, 1993; Nogueira *et al.*, 2000; 2001).

O risco da introdução do DENV-4, tendo em vista que o mesmo está presente em países limítrofes, combinado com índices de infestação do vetor *Ae. aegypti* (> 1%) que permitam a transmissão da doença, e a falta de uma vacina para aplicação em larga escala, torna a Vigilância Viroológica um dos principais instrumentos para prevenção de surtos e epidemias, possuindo o laboratório um papel fundamental no monitoramento destas infecções.

Para determinação dos sorotipos e genótipos circulantes de DENV no estado do Rio de Janeiro no período de 2004-2005, dos 839 casos estudados, 34 (4%) foram confirmados como infecção por DENV-3.

Como exposto na Tabela 4.4, verifica-se que o ano de 2004 foi caracterizado por uma circulação muito baixa do DENV-3, com dois casos confirmados no município de Nova Iguaçu no mês de março (Figura 4.12), um por isolamento e outro por RT-PCR. O estado do Rio de Janeiro notificou neste ano 2.694 casos de dengue com 4 casos de FHD, caracterizando este ano como um período interepidêmico (Secretaria de Estado de Saúde, 2006). Nenhum caso fatal foi notificado neste ano e dos 17 casos suspeitos recebidos, todos tiveram resultados negativos.

No ano de 2005 a situação epidemiológica foi modificada, com dois surtos localizados em locais distintos: um no município de Campos dos Goytacazes (Região Norte Fluminense) com 14 casos de DENV-3 dos quais sete ocorreram no mês de junho e outro no município do Rio de Janeiro com 11 casos, dos quais 8 ocorridos no mês de dezembro, com a confirmação de dois casos fatais (Tabela 4.4). O estado do Rio de Janeiro notificou neste ano 2.580 casos de dengue com 13 casos de FHD e 2 óbitos confirmados (Secretaria de Estado de Saúde, 2006).

Considerando-se que a ocorrência de surtos e epidemias de DENV normalmente ocorrem no verão, a identificação do surto ocorrido no mês de junho no município de

Campos dos Goytacazes merece uma avaliação mais detalhada das condições eco-epidemiológicas no município.

A baixa positividade do isolamento viral 0,4% (3/723) pode ser entendida pelo período de baixa circulação do vírus, sensibilidade da técnica, sorotipo viral, condições de manuseio das amostras em alguns casos e resultados dos isolamentos ainda não concluídos.

Maiores percentuais de isolamento de vírus como 15,9% (De Simone, 2003), 18,5% (Rigau-Pérez & Bailey, 2000), 20,8% (Vasconcelos *et al.*, 1993), 22,8% (Féres, 2004) são observados em períodos epidêmicos. O elevado percentual de isolamento de DENV-1 (41,2%) descrito por Miagostovich *et al.* (1993) traduz as condições epidemiológicas no estado do Rio de Janeiro em 1986-1987, sendo considerado uma epidemia de solo virgem.

Cabe salientar a importância do isolamento em cultura de células, pois este método permite a realização de estudos de epidemiologia molecular como será apresentado adiante.

A utilização da RT-PCR convencional como metodologia de detecção do RNA viral demonstrou importante contribuição no diagnóstico nesta casuística, uma vez que os percentuais obtidos, 4% (31/815) dos casos, foram superiores quando comparados ao isolamento em cultura de células, sendo válidas as ressalvas referentes ao período. Outros trabalhos onde são observados índices de 29,3% (Feres, 2004), 32,4% (Miagostovich *et al.* 1993), 34,2% (Sudiro *et al.*, 1997) e 29,6% (De Paula *et al.*, 2002) referem-se a períodos epidêmicos.

Com efeito, a sensibilidade desta técnica em relação ao isolamento viral tem variado de 5-30% na detecção viral (Chan *et al.*, 1994; Meiyu *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 1999; Raengsakulrach *et al.*, 2002; Féres, 2004).

Considerando que o DENV-3 foi isolado em 3 casos no período e o RT-PCR possibilitou a confirmação de 31 casos, fica a maior sensibilidade por este último método comprovada, encontrando aplicação principalmente em períodos inter-epidêmicos com repercussão nas medidas de controle do vetor, como aconteceu nos últimos meses de 2005.

No presente estudo, o RT-PCR foi positivo em 29 casos no período 2004-2005, que por isolamento foram negativos, contribuindo com um aumento significativo na etiologia dos casos.

Esse resultado reforça a sensibilidade dos métodos moleculares na detecção do genoma viral em amostras coletadas durante o período de viremia,

Com relação à caracterização molecular de duas amostras de DENV-3 circulantes no estado do Rio de Janeiro (RJ) neste período, o sequenciamento das regiões prM, M e E e posterior análise filogenética, demonstraram que as mesmas (BR/RJ78670/04 e BR/RJ79941/05) pertencem ao genótipo III, indicando que não houve a introdução de novos genótipos.

Um estudo anterior que caracterizou o primeiro DENV-3 isolado no RJ (BR68784/00), através do sequenciamento destas mesmas regiões do genoma, demonstrou que o DENV-3 circulante no estado pertencia ao genótipo III, representado por amostras que circulam no Sri Lanka, Índia e no Continente Americano (Briseño *et al.*, 1996, Lanciotti *et al.*, 1994; Messer *et al.*, 2003; Miagostovich *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2001; Peyrefitte *et al.*, 2003; Usuku *et al.*, 2001; Uzcategui *et al.*, 2003).

Entretanto, observou-se um grau de variabilidade maior entre o primeiro DENV-3 isolado em 2000 (Nogueira *et al.*, 2001) e as duas amostras aqui estudadas, o que pode ser explicado pela constante circulação desse vírus no período de cinco anos (Figura 4.14).

Deve ser destacado que o genótipo III tem sido associado com epidemias de FHD/SCD na Índia, Sri Lanka, México e em países da América Central (Lanciotti *et al.*, 1994; Miagostovich *et al.*, 2002).

Este mesmo genótipo foi responsável pela mais grave epidemia de dengue no Brasil, ocorrida no verão de 2002 no estado do Rio de Janeiro.

Nesse sentido, torna-se importante a caracterização molecular dos DENV em períodos interepidêmicos, de forma a determinar a origem das cepas e o impacto destas sobre a população.

Assinala-se que, apesar das características epidemiológicas do período, em dois casos fatais foram confirmados esse genótipo.

O monitoramento de casos febris nos próximos meses possibilitará uma melhor compreensão da atividade desses vírus no estado do Rio de Janeiro.

6. CONCLUSÕES

1. O limiar de detecção da técnica de PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) foi de $1,9 \times 10^1$ PFU por reação;
2. O PCR em tempo real (Sistema TaqMan™) demonstrou 100% de especificidade quando realizado com outros arbovirus (DENV-1, DENV-2, Febre amarela, Mayaro, Oropouche, Vírus da encefalite equina Venezuelana – VEE, e Vírus da encefalomielite equina do Leste - WEE);
3. A positividade dos espécimes de fígado pelo PCR em tempo real alcançou 64,2% (18/28), sendo significativamente superior ao PCR convencional 29,6 % (8/27) ($p=0,02$) e ao isolamento viral 7,6% (2/26) ($p=0,000$);
4. O PCR em tempo real contribuiu com seis casos os quais foram considerados como negativos por outras metodologias;
5. O vírus dengue tipo 3 foi o único sorotipo circulante no estado do Rio de Janeiro durante o período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005;
6. A Vigilância Viroológica no período 2004 - 2005 envolveu 839 casos suspeitos de dengue sendo confirmados 4% (34/839) considerando-se o isolamento viral e/ou RT-PCR;
7. O isolamento viral foi obtido em 0,4% (3/723) dos casos estudados;
8. A técnica de RT-PCR confirmou 3,8% (31/815) dos casos estudados;
9. A caracterização genética dos DENV-3 circulantes durante o período estudado revelou que os mesmos pertencem ao genótipo III;

10. No ano de 2004 apenas dois casos de DENV-3 foram confirmados, um deles por isolamento e o outro RT-PCR, ambos no município de Nova Iguaçu;
11. No ano de 2005 dois surtos foram reconhecidos, um deles localizado no município de Campos dos Goytacazes (Região Norte Fluminense) entre os meses de março a junho, e outro no município do Rio de Janeiro;
12. Dois casos fatais de DENV-3 foram confirmados em dezembro de 2005.

7. PERSPECTIVAS

No estabelecimento de protocolos para o diagnóstico dos vírus dengue relacionada à técnica de PCR em tempo real, diferentes regiões do genoma e a aplicação em diferentes espécimes precisam ainda ser avaliadas.

Estas abordagens são importantes considerando-se a patogenia e patologia da infecção. Por exemplo, o nível de viremia do DENV-3 contribuiu para o agravamento dos casos ocorridos na epidemia de 2002?

Considerando que ainda não se conhece em profundidade a importância de cada tecido na replicação dos vírus dengue, a aplicação do PCR em tempo real em tecidos obtidos durante a epidemia de 2002 poderá contribuir para o estudo da patogenia dessas infecções.

Protocolos utilizando esta ou outras regiões do genoma seriam eficientes para confirmação de casos de dengue utilizando tecidos já fixados?

Na tabela 7.1, apresentamos alguns protocolos utilizados para o diagnóstico dos DENV.

Tabela 7.1: Protocolos de detecção dos DENV por PCR em tempo real.

Referência	DENV	Sistema	Região (posição)	Sensibilidade
<i>Poersch et al. (2005)</i>	Denv-1	TaqMan	E (907-972)	0,62 PFU/reação
	Denv-2	TaqMan	E (864-943)	
	Denv-3	SYBR Green	E (922-999)	
<i>Drosten et al. (2002)</i>	Grupo dengue	TaqMan	3' NC (10615-10694)	8,6 cópias/reação
<i>Callahan et al. (2001)</i>	Grupo dengue	TaqMan	3'NC (10589-10699)	56 PFU/mL
	Denv-1		NS5 (8586-8692)	
	Denv-2		C (237-305)	
	Denv-3		C (118-241)	
	Denv-4		C (187-293)	
<i>Chen et al. (2001)</i>	Denv-2	TaqMan	E	1.4 PFU/reação
<i>Houng et al. (2001)*</i>	Denv-1,2,3,4	TaqMan	3' NC	20 PFU/mL
<i>Laue et al. (1999)</i>	Denv-1,2,3,4	TaqMan	NS5 (9959-10119)	500 cópias/mL

*Referência onde iniciadores e sonda foram utilizados neste estudo.

A biologia molecular aliada a ferramentas da bioinformática permite atualmente desenvolver diferentes estratégias de amplificação do genoma de qualquer flavivírus, de forma rápida analisando frente aos bancos de dados disponíveis no *GeneBank*.

Consideramos ainda, que os resultados deste trabalho abrem perspectivas para a implantação do PCR em tempo real e de outros protocolos moleculares para detecção e identificação dos *Flavivírus* como DENV-1, DENV-2, DENV-4, Rocio, St. Louis, Vírus do Nilo Ocidental, entre outros.

Nesse sentido, estudos de colaboração entre Laboratórios do exterior já em curso e com as Instituições no país, serão importantes para o conhecimento e desenvolvimento dessas pesquisas.

Os estudos referentes à Vigilância Viroológica neste trabalho reforça a necessidade do contínuo monitoramento dos DENV no estado do Rio de Janeiro nos próximos anos.

8. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo utiliza a casuística do Centro de Referência de Dengue e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/FIOCRUZ. Protocolo CEP: 274/05.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Molecular Biology of the Cell**. 3rd edition. Garland Publishing; 1994; 551-598.

Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Synthesis and secretion of recombinant tick borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. **J Virol** 1995; 69:5816-20.

Anderson CR, Downs WG, Hill AE. Isolation of dengue virus from a human being in Trinidad. **Science** 1956; 3;124(3214):224-5.

Angibaud G, Luaute J, Laille M, Gaultier C. Brain involvement in Dengue fever. **J Clin Neurosci**. 2001;8(1):63-5.

Anonymus. Dengue 3 in Central America. Dengue Surveillance. Summary. San Juan, Puerto Rico. **Division of Vector-Borne Infectious Diseases (CDC)** 1995; 70: 4 p.

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

Bancroft TL. On the etiology of dengue fever. **Aust. Med. Gaz.** 1907; 25:17-18.

Basilio-de-Oliveira CA, Aguiar GR, Baldanza MS, Barth OM, Eyer-Silva WA, Paes MV. Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2005 Aug;9(4):341-7.

Beeck AOD, Molenkamp R, Caron M, Younes AB, Bredenbeek P, Dubuisson J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope. **J Virol** 2003; 77(2):813-20.

Bhamarapavati N, Tuchinda P, Boonyapaknavik V. Pathology of Thailand haemorrhagic fever: a study of 100 autopsies cases. **Ann Trop Med Parasitol**. 1967;61(4):500-10.

Boom R, Sol C J A, Salimans M M M, Jansen C L, Wertheim-Van Dillen P M E, Van Der Noordaam J. Rapid and single method for purification of nucleic acid. **J. Clin. Microbiol.** 1990; 28: 495-503.

Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Bunnag C, Bhamarapravati N, Nimmanitya S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. **Am J Trop Med Hyg.** 1979;28(5):881-4.

Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijckman N, Rice CM, Spaan WJM. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. **J Virol.** 2003; 84: 1261-68.

Brinton MA. Replication of flavivirus. In: Schlesinger S & Schlesinger M. **The Togaviridae and Flaviviridae.** Plenum Press 1986; p. 327-65.

Briseño B, Gómez H, Argott E, Montesano R, Vázquez AL, Madrigal R, *et al* . Potencial Risk for dengue haemorrhagic fever: the isolation of dengue serotype 3 in Mexico. **Emerging Infect.** 1996; 2: 63-5.

Burke DS, Monath TP. Flaviviruses *In* D.M. Knipe, and P. M. Howley (eds), **Fields Virology**, 4th ed, vol 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2001; pp 1043-126.

Burke DS, Monath TP 2002. Flavivirus: The viruses and their replication. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, **Virology.** Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia.

Callahan JD, Wu SJL, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, Porter KR, Murphy GR, Suharyono W, King CC, Hayes CG, Temenak JJ. Development and Evaluation of Serotype- and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(11):4119-4124.

Chambers, T J, Hahn C S, Galler R, Rice C. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol** 1990; 44:649-88.

Chambers TJ, Nestorowicz A, Rice CM. Mutagenesis of the YF virus NS2B/3 cleavage site: determination of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication. **J Virol** 1995; 69(3): 1600-05.

Chambers TJ, Liang Y, Droll DA, Schlesinger JJ, Davidson AD, Wright PJ, Jiang X. Yellow fever virus/dengue-2 virus and yellow fever virus/dengue-4 virus chimeras: biological characterization, immunogenicity, and protection against dengue encephalitis in the mouse model. **J Virol.** 2003 Mar;77(6):3655-68.

Chan SY, Kautner IM, Lam SK. The influence of antibody levels in dengue diagnosis by polymerase chain reaction. **J Virol Methods.** 1994;49(3):315-22.

Chang GJ, Davis BS, Hunt AR, Holmes DA, Kuno G. Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. **Ann N Y Acad Sci.** 2001 Dec;951:272-85. Review.

Chen RF, Yeh WT, Yang MY, Yang KD. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2001; 30:1-7.

Chimelli L, Hahn MD, Netto MB, Ramos RG, dias M, Gray F. Dengue: neuropathological findings in 5 fatal cases from Brazil. **Clin. Neuropathol.** 1990 9: 157-162.

Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A, Poovorawan Y. Dengue typing assay based on real-time PCR using SYBR Green I. **J Virol Methods.** 2005 Oct;129(1):8-15.

Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination - inhibition with arthropode - borne viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1958; 7: 561-73.

Corver J, Lenches E, Smith K, Robinson RA, Sando T, Strauss EG, Strauss JH. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. **J Virol** 2003; 77(3): 2265-70.

Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, Deubel V. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. **Hum. Pathol.**; 1999; 30 (9): 1106-10.

Cunha RV, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Barbosa AMA, Paiva FG, Miranda RMO, Ramos CCF, Coelho JCO, Santos FB, Nogueira RMR. Dengue epidemic in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 1997. **Trans. R. S. Trop. Med. Hyg.** 1999; 93: 247-9.

Da Silva Jr JB, Siqueira Jr JB, Coelho GE, Giovanini E, Vilarinhos PTR, Pimenta Jr FG. Dengue in Brazil: Current situation and prevention and control activities. **Epidemiol Bull** 2002; 23: 3-6.

De Paula SO, Pires Neto RJ, Correa 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** 2002; 96: 266-269.

De Simone TS. Dengue no Estado do Rio de Janeiro, 2000 – 2001: Co-circulação dos vírus dengue sorotipos 1, 2, 3. **Dissertação de Mestrado** 2003. Laboratório de Flavivírus. Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro. 105 pp.

Drosten C, Gottig S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, Gunther 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;40(7):2323-30.

Durbin AP, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, Thumar B, Men R, Lai CJ, Elkins WR, Chanock RM, Murphy BR, Whitehead SS. Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region. **Am J Trop Med Hyg.** 2001;65(5):405-13.

Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Vaughn DW, Eckels KH, Dubois DR, Summers PL, Hoke CH. A live attenuated dengue-1 vaccine candidate (45AZ5) passaged in

primary dog kidney cell culture is attenuated and immunogenic for humans. **J Infect Dis.** 1994;170(6):1448-55.

Edelman R, Wasserman SS, Bodison SA, Putnak RJ, Eckels KH, Tang D, Kanesa-Thanan N, Vaughn DW, Innis BL, Sun W. Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69(6 Suppl):48-60. Erratum in: **Am J Trop Med Hyg.** 2004;70(3):336.

Edelman R. Dengue and dengue vaccines. **J Infect Dis.** 2005 Mar 1;191(5):650-3.

Eram S, Setyabudi Y, Sadono TI, Sutrisno DS, Gubler DJ, Sulianti Saroso J. Epidemic dengue hemorrhagic fever in rural Indonesia. II. Clinical studies. **Am J Trop Med Hyg.** 1979 Jul;28(4):711-6.

Féres VCR. Vigilância Laboratorial da infecção pelos vírus dengue em Goiânia, 2002-2003: caracterização molecular das amostras virais positivas. **Dissertação de Mestrado** 2004. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública: Goiás.

Figueiredo L T M. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. *Virus Rev. & Res.* 1996; 1: 9-16. Figueiredo LT, Carluchi RH, Duarte G. Estudo prospectivo com lactentes cujas mães tiveram dengue durante a gravidez. **Rev Inst Méd Trop São Paulo** 1994; 36:417-21.

Figueiredo LTM, Fonseca, BAL. Dengue. In: R Veronesi, R Focacia, (orgs). **Tratado de Infectologia**; 1996; 201-14.

Figueiredo LTM. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Rev. & Res.** 1996; 1: 9-16.

Figuroa R, Ramos C. Dengue virus (serotype 3) circulation in endemic countries and its reappearance in America. **Arch Med Res.** 2000;31(4):429-30.

Filippis AM, Nogueira RM, Schatzmayr HG, Tavares DS, Jabor AV, Diniz SC, Oliveira JC, Moreira E, Miagostovich MP, Costa EV, Galler R. Outbreak of jaundice and hemorrhagic fever in the Southeast of Brazil in 2001: detection and molecular characterization of yellow fever virus. **J Med Virol.** 2002;68(4):620-7.

Forster, V. T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. **Ann. Phys.** 1948; 2:55–75.

Franco O. A erradicação do *Aedes aegypti* do Brasil. **Rev. Brasil. de Malariologia e doenças tropicais** 1961; 13 (1, 2): 43-8.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Situação atual do dengue no Brasil.** [online]. Brasil [capturado 23 jan. 2006]; Disponível em: <http://www.funasa.gov.br> .

Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. **BMJ** 2002; 324:1563-6.

Graham H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. **J Trop Med** 1903; 6: 209.

Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Use of mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1984; 33: 158-65.

Gubler DJ. Surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. **Bull. PAHO**; 1989; 23 (4): 397-404.

Gubler DJ. Dengue/Dengue hemorrhagic fever in the Americas: prospects for the year 2000. In: Halstead SB, Gomez-Dantes H. **Dengue: a worldwide problem, a common strategy**.; Proceedings of the international conference on dengue and Aedes aegypti community-based control. Merida, México. 1992 11-16: 19-27.

Gubler DJ. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas. In : World Health Organization, regional office for South-east Asia, New Deli. **Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever**; Regional Publication, 1993; SEARO n° 22: 9-22.

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

Gubler DJ. Dengue and Dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: Gubler DJ and Kuno G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever**; 1997; CAB international: New York USA. Chapter 1: 1-21.

Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Rev** 1998; 11 (3): 480-96.

Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. **Adv. Virus Res.** 1999; 53: 35-70.

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

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

Guirakhoo F, Pugachev K, Arroyo J, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, Georgakopoulos K, Catalan J, Ocran S, Draper K, Monath TP. Viremia and immunogenicity in nonhuman primates of a tetravalent yellow fever-dengue chimeric vaccine: genetic reconstructions, dose adjustment, and antibody responses against wild-type dengue virus isolates. **Virology**. 2002 Jun 20;298(1):146-59.

Guzman Tirado MG. Dengue I. Antecedentes históricos; agentes etiológicos; cuadro clínico. **Ver Cubana Méd Trop.** 1980; 32(2):123-30.

Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Conserved elements in the 3'untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. **J Mol Biol** 1987; 198:33-41.

Halstead SB. Epidemiological aspects of dengue and chikungunya infections. **Proceedings of the Conference on the pathogenesis of arboviral infections**; 1971; 1:33-67.

Halstead SB. Dengue haemorrhagic fever – A public health problem and a field for research. **Bull WHO**; 1980; 58 (1): 1-21.

Halstead SB. Selective primary health care: Strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue. **Rev. Infect. Dis** 1984; 6 (2) : 251-64.

Halstead SB. Pathogenesis of Dengue: Challenges to molecular Biology. **Science**; 1988; 239 (4839): 476-81.

Hammon WMcd, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fever of the Philippines and Thailand. **Science** 1960; 31: 1102-3.

Hayes CG, Manaloto CR, Gonzales A, Ranoa CP. Dengue infections in the Philippines: clinical and virological findings in 517 hospitalized patients. **Am J Trop Med Hyg.** 1988 Jul;39(1):110-6.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. **Genome Res** 1996;6(10):986-94.

Heinz FX, Allison SL. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Curr. Opinion in Microbiol** 2001; 4: 450-55.

Henchal E A, Gentry M K, McCown J M, Brandt W E. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **Am J Trop Med Hyg** 1982; 31 (4): 830-6.

Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1991; 88:7276–7280.

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

Houng HSH, Chung-Ming Chen R, Vaughn DW, Kanesa-thasan N. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. **J Virol Methods.** 2001; 95(1-2):19-32.

Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J. Gen. Virol.** 1978; 40: 531-44.

Itha S, Kashyap R, Krishnani N, Saraswat VA, Choudhuri G, Aggarwal R. Profile of liver involvement in dengue virus infection. **Natl Med J India**. 2005;18(3):127-30.

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, Chambers TV, Crabtree MB, Guirakhoo F, Monath TP, Miller BR. Analysis of the replication kinetics of the ChimeriVax-DEN 1, 2, 3, 4 tetravalent virus mixture in *Aedes aegypti* by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**. 2004;70(1):89-97.

Kabra SK, Verma IC, Arora NK, Jain Y, Kalra V. Dengue haemorrhagic fever in children in Delhi. **Bull World Health Organ**. 1992;70(1):105-8.

Kanesa-Thanan N, Edelman R, Tacket CO, Wasserman SS, Vaughn DW, Coster TS, Kim-Ahn GJ, Dubois DR, Putnak JR, King A, Summers PL, Innis BL, Eckels KH, Hoke CH Jr. Phase 1 studies of Walter Reed Army Institute of Research candidate attenuated dengue vaccines: selection of safe and immunogenic monovalent vaccines. **Am J Trop Med Hyg**. 2003 Dec;69(6 Suppl):17-23.

Kapoor M, Zhang L, Ramachandra M, Kusukawa J, Ebner KE, Padmanabhan R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. **J Biol Chem**. 1995 11;270(32):19100-6.

Kimura R & Hotta S. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus into mice. (In Japanese) **Nippon Igaku**. 1944; N°3379, 629-33.

King AD, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint KS, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, Innis BL. B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1999;30(4):718-28.

Kinney RM, Butrapet S, Chang GJ, Tsuchiya KR, Roehrig JT, Bhamarapavati N, Gubler DJ. Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus: strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53. **Virology**. 1997 14;230(2):300-8.

Kinney RM, Huang CY. Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis. **Intervirology**. 2001;44(2-3):176-97. Review.

Knight KL, Stone A. A catalog of the mosquitoes of the world (**Díptera: Culicidae**); The Thomas Say Foundation 1977 vol. VI; 611 p.

Kouri G, Guzman MG, Bravo J. Hemorrhagic dengue in Cuba: history of an epidemic. **Bull. PAHO**. 1986; 20 (1): 24-30.

Kouri G, Guzmán MG, Bravo J. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? II. An integral analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**. 1987; 81: 821-3.

Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bull World Health Organ.** 1989;67(4):375-80.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV E, Corver J, Lenches, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation and fusion. **Cell** 2002, 108: 717-25.

Kuno G, Gomez I, Gubler D J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme - linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1987; 36 (1): 153-9.

Kuo CH, Tai DI, Chang-Chien CS, Lan CK, Chiou SS & Vorndam V. Liver biochemical tests and dengue fever. **Am. J. Trop.Med. Hyg.** 1992; 47 (3): 265-70.

Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, Ennis FA. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. **J Clin Invest.** 1991;88(5):1473-80.

Lai CJ, Zhao BT, Hori H, Bray M. Infectious RNA transcribed from stably cloned full-length cDNA of dengue type 4 virus. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1991 15;88(12):5139-43.

Lam SK, Devine PL. Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diag. Virol.** 1998; 10:75-81.

Lam SK, Ew CL, Mitchell JL, Cuzzubbo AJ, Devine PL. Evaluation of a capture screening enzyme linked immunosorbent assay for combined determination of immunoglobulin M and G antibodies produced during dengue infection. **Clin. Diag.Lab.Immunol.** 2000; 7 (5): 850-52.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 1992; 30(3):545-51.

Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **J Gen Virol** 1994; 75:65-75.

Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **J. Gen. Virol.** 1997; 78: 2279-86.

Larreal Y, Valero N, Estevez J, Reyes I, Maldonado M, Espina LM, Arias J, Melean E, Anez G, Atencio R. Hepatic alterations in patients with dengue. **Invest Clin.** 2005;46(2):169-78.

Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of Dengue Virus RNA in Patients after Primary or Secondary Dengue Infection by Using the TaqMan Automated Amplification System. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(8):2543-2547.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. **Principles of biochemistry** 1997. 2nd edition. Savier: 551-598.

Leite JPG. Diagnóstico Viroológico: do Isolamento Viral ao Diagnóstico Molecular. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 2v; p 1642.

Liew KJ, Chow VT. Microarray and real-time RT-PCR analyses of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. **J Virol Methods.** 2006;131(1):47-57.

Lin YL, liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, Liu HS. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. **J. Med. Virol.;** 2000; 60 (4): 425-31.

Lindegren G, Vene S, Lundkvist A, Falk KI. Optimized diagnosis of acute dengue fever in Swedish travelers by a combination of reverse transcription-PCR and immunoglobulin M detection. **J Clin Microbiol.** 2005;43(6):2850-5.

Lindenbach BD, Rice CM. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **J Virol** 1997; 71:9608-17.

Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J Virol** 1999; 73: 4611-4621.

Lum LC, Lam SK, George R, Devi S. Fulminant hepatitis in dengue infection. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health** 1993; 24: 467-71.

Lum LC, Lam SK, Choy YS, George R, Harun F.: a true Dengue encephalitis entity? **Am. J. Trop. Med. Hyg;** 1996; 54: 256-59.

McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H, Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and infection** 2000; 2:1041-50.

Mackenzie JM, Westaway EG. Assembly and maturation of the flavivirus Kunjin virus appear to occur in the rough endoplasmic reticulum and along the secretory pathway, respectively. **J Virol** 2001; 75(22):10787-99.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat Med.** 2004;10(12 Suppl):S98-109. Review.

Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. **Virology.** 1989;169(2):354-64.

Mason PW, Zugel MU, Semproni AR, Fournier MJ, Mason TL. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. **J Gen Virol.** 1990;71 (Pt 9):2107-14.

Meiyu F, Huosheng C, Cuihua C, Xiaodong T, Lianhua J, Yifei P, Weijun C, Huiyu G. Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. **Microbiol Immunol.** 1997;41(3):209-13.

Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerg Infect Dis** 2003; 9 (7): 800-8.

Miagostovich MP, Nogueira RM, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 1993 Mar-Apr;35(2):149-54.

Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RMR, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Marchevsky RS, Mesquita RP, Schatzmayr HG. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clinical Neuropath.** 1997; 16 (4): 204-8.

Miagostovich MP, Vorndam V, Araújo ESM, Santos FB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Evaluation of IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **J. Clin. Virol.** 1999; 14: 183-89.

Miagostovich MP, Santos FB, Gutiérrez CM, Riley LW, Harris E. Rapid subtyping of dengue virus serotypes 1 and 4 by restriction site-specific PCR. **J. Clin. Microbiol.** 2000; 38 (3): 1286-89.

Miagostovich MP, De Simone TS, Araújo ESM, Miranda LH, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Evaluation of IgM anti-dengue response in sequential infection. **Virus Rev. & Res.** 2001; 6 (2): 13-19.

Miagostovich MP, Santos FB, De Simone TS, Costa EV, Filippis AMB, Schatzmayr HG, Nogueira RMR. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 2002; 35: 1-4.

Monath TP, Wands JR, Hill LJ, Brown NV, Marciniar RA, Wong MA, Gentry MK, Burke DS, Grant JA & Trent DW. Geographic classification of dengue 2 virus strains by antigen signature analysis. **Virology** 1986; 154:313-24.

Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. In **Fields Virology** 1996; Vol.1 – 3rd edition. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Lippincott – Raven Publisher. Philadelphia: 961-1034.

Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** 1991; 29: 2107-10.

Mourão MP, Lacerda MV, Bastos Mde S, Albuquerque BC, Alecrim WD. Dengue hemorrhagic fever and acute hepatitis: a case report. **Braz J Infect Dis.** 2004 Dec;8(6):461-4.

Murray JM, Aaskov JG, Wright PJ. Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. **J Gen Virol.** 1993;74 (Pt 2):175-82.

Murphy FA. Togavirus: Morphology and Morphogenesis. In: **The Togaviruses** 1980. Edited by Schlesinger RW. New York. Academic Press Inc:241-316.

Muylaert IR, Galler R, Rice CM. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J Virol** 1997; 71(1):291-98.

Nguyen TL, Nguyen TH & Tieu NT. The impact of dengue haemorrhagic fever on liver function. **Res. Virol.** 1997; 148: 273-7.

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

Nogueira RMR, Zagne SMO, Martins ISM, Lampe E, Miagostovich, MP, Schatzmayr, HG. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) caused by serotype 2 in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1991; 86 (2):269.

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

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Moraes GC, Cardoso FMA, Ferreira J, Cerqueira V, Pereira M. Dengue type 2 outbreak in the South of the State of Bahia, Brazil: laboratorial and epidemiological studies. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo; 1995; 37: 507-10.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Cunha RV, Zagne SMO, Gomes FP, Nicol AF, Coelho JCO, Schatzmayr HG. Dengue fatal cases in primary infections in Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1999; 93:418 (a).

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Santos FB, Filippis AMB, Souza RW, Zagne SMO, Nicolai C, Baran M, Teixeira Filho G. Dengue in the State of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1999; 94(3): 297-304 (b).

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad. Saúde Pública** 2000 jan-mar, 16(1): 205-11.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMB, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2001; 96 (7):925-6.

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

Nogueira RM, Schatzmayr HG, Filippis AMB, dos Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, Guimarães FR, Araújo ESM, De Simone TS, Baran M, Teixeira Jr G, Miagostovich MP*. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerg Infect Dis.** 2005;11(9):1376-81.

Osanai CH, Travassos Da Rosa APA, Tang AT, Amaral RS, Passos ADC, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota Prévia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**; 1983; 25 (4): 53-4.

Pan American Health Organization (PAHO). Dengue in the Americas: 1980-87. **Epidemiol. Bull.**; 1989; 10 (1):1-8.

Pan American Health Organization (PAHO). Re-emergence of dengue in the Americas. **Epidemiol. Bull.**; 1997; 18 (2):1-7.

Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **J Clin Microbiol.** 2005;43(6):2895-903.

Patey O, Ollivaud L, Breuil J, Lafaix C. Unusual neurologic manifestations occurring during dengue fever infection. **Am. J. rop. Med. Hyg.** 1993; 48: 793-802.

Peyrefitte CN, Couissinier-Paris P, Mercier-Perenne V, Bessaud M, Martial J, Kenane N, Durand J-P A, Tolou HJ. Genetic characterization of newly reintroduced dengue virus type 3 in Martinique (French West Indies). **J Clin Microbiol** 2003; 41(11):5195-98.

Pinheiro FP. Dengue in the Americas, 1980-87. **Epidemiol. Bull.** Pan Am. Health Organ.; 1989, 10(1): 1-8.

Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever and its emergence in the Américas. **World Health Stat** 1997; 50: 161-69.

Pinheiro FP, Chuit R. Emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Inf. Medicine**; 1998: 244-51.

Poersch CO, Pavoni DP, Queiroz MH, Borba L, Goldenberg S, Santos CND, Krieger MA. Dengue vírus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **J Clin Virol.** 2005; 32:272-77.

Post, PR. **Biologia molecular do vírus da febre amarela.** Rio de Janeiro; 1996. Doutorado [Tese apresentada ao Instituto de Microbiologia] – UFRJ.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Trent DW, Monath TP. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. **Int J Parasitol.** 2003 May;33(5-6):567-82. Review.

Puri B, Polo S, Hayes CG, Falgout B. Construction of a full length infectious clone for dengue-1 virus Western Pacific,74 strain. **Virus Genes**. 2000;20(1):57-63.

Putnak R, Feighny R, Burrous J, Cochran M, Hackett C, Smith G, Hoke C. Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. **Am J Trop Med Hyg**. 1991;45(2):159-67.

Raengsakulrach B, Nisalak A, Maneekarn N, Yenchitsomanus PT, Limsomwong C, Jairungsri A, Thirawuth V, Green S, Kalayanaroj S, Suntayakorn S, Sittisombut N, Malasit P, Vaughn D. Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. **J Virol Methods**. 2002;105(2):219-32.

Reed W. Propagation of yellow fever, observations based on researches. **Med. Record** 1901; 60:201.

Rezende JM. Notas históricas e filosóficas sobre a palavra dengue. **Rev Patol Trop** 1997; 26: 375-380.

Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science** 1985; 229:728-733.

Rice CM, Grakoui A, Galler R, Chambers TJ. Transcription of infectious yellow fever RNA from full-length cDNA templates produced by in vitro ligation. **New Biol**. 1989;1(3):285-96.

Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In **Fields Virology**, 3rd edition. Edited by BN Fields, DM Knipe & PM Howley. Lippincott-Raven Publisher. Philadelphia: 1996; 931-59.

Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Viol** 1990; 174:479-493.

Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. **Adv Virus Res**. 2003;59:315-41. Review.

Richardson J, Molina-Cruz A, Salazar MI, Black W 4th. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual aedes aegypti. **Am J Trop Med Hyg**. 2006;74(1):132-41.

Rigau-Perez JG. Bailey K. Ashford, more in his remembrance. **P R Health Sci J**. 2000;19(1):51-5.

Rigau-Perez JG, Ayala-López A, García-Rivera EJ, Hudson SM, Vomdam V, Reiter P, *et al*. The reappearance of dengue-3 and subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 2002; 67 (4): 355-62.

Rocco IM, Kavakama BB, Santos CLS. First isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. *Ver. Inst. Med. Trop.* São Paulo; 2001; 43 (1): 55-7.

Rosen L. The emeror's new clothes revisited or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1977; 26 (3): 337-43.

Rosen L, Khin MM, UT. Recovery of virus from the liver of children with fatal dengue: reflections on the pathogenesis of the disease and its possible analogy with that of yellow fever. *Res. Virol* 1989; 140 (4): 351-60.

Rosen L, Drouet MT, Deubel V. detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but no in the brain in fatal human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1999; 61 (5): 720-4.

Row D, Weistein P & Murray-Smith S. Dengue fever with encephalopathy in Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 1996; 54 (3): 253-5.

Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chokejindachai W, Jagsudee A, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. Safety and immunogenicity of tetravalent live-attenuated dengue vaccines in Thai adult volunteers: role of serotype concentration, ratio, and multiple doses. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(3):264-72.

Sabchareon A, Lang J, Chanthavanich P, Yoksan S, Forrat R, Attanath P, Sirivichayakul C, Pengsaa K, Pojjaroen-Anant C, Chambonneau L, Saluzzo JF, Bhamarapravati N. Safety and immunogenicity of a three dose regimen of two tetravalent live-attenuated dengue vaccines in five- to twelve-year-old Thai children. *Pediatr Infect Dis J.* 2004 Feb;23(2):99-109.

Sabin AB, Schelinger RW. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*; 1945; 101: 640-42.

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

Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. *WHO*, 1999. Collaborative Study Group. *Vox Sang* 76: 149-58.

Samsi TK, Wulur H, Sugianto D, Bartz CR, Tan R, Sie A. Some clinical and epidemiological observations on virologically confirmed dengue hemorrhagic fever. *Paediatr Indones.* 1990 Nov-Dec;30(11-12):293-303.

Schatzmayer HG, Nogueira RMR, Travassos da Rosa APA. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1986 Abr/Jun; 81 (2): 245-6.

Secretaria de Estado de Saúde (SES). **Boletim de Dengue 2004/2005 por Região e Município do Estado do Rio de Janeiro**. [on line]. Brasil [capturado 23 jan. 2006]; Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/> .

Shapiro D, Brandt WE, Russel PK. Change involving a viral membrane glycoprotein morphogenesis of group B arboviruses. **Virology** 1972; 50: 906-11.

Siler JF, Hall M, Hitchens AP. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philipp J Sci** 1926; 29: 1-302.

Simmons JS, ST John JH, Reynoldas FHK. Experimental studies of dengue. **Phill. J. Science** 1931; 44: 1.

Songco RS, Hayes CG, Leus CD, Manaloto CO. Dengue fever/dengue haemorrhagic fever in Filipino children: clinical experience during the 1983-1984 epidemic. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 1987 Sep;18(3):284-90.

Souza LJ, Martins AL, Paravidini PC, Nogueira RM, Gicovate Neto C, Bastos DA, Siqueira EW, Carneiro C. Hemorrhagic encephalopathy in dengue shock syndrome: a case report. **Braz J Infect Dis**. 2005 Jun;9(3):257-61.

Souza RV. **Caracterização clínico-laboratorial epidemiológica do dengue por sorotipo 1 e 2**. Casuística do Hospital Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, período de maio/1999 a abril/1991. Tese de mestrado, Faculdade de Medicina, UFRJ, 1992;100p.

Souza RV, Cunha RV, Miagostovich MP, Timbó MJ, Montenegro F, Pessoa EFTP, Nogueira RMR & Schatzmayr HG. An outbreak of dengue virus infection in the Ceará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1995, 90:345-6.

Srivastava VK, Suri S, Bhasin A, Srivastava L, Bharadwaj M. An epidemic of dengue haemorrhagic fever and dengue shock syndrome in Delhi: a clinical study. **Ann Trop Paediatr**. 1990;10(4):329-34.

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of Tick-Borne encephalitis virus by furin. **J Virol**; 1997; 71(11):8475-81.

Stocks CE, Lobigs M. Posttranslational signal peptidase cleavage at the flavivirus C-prM junction in vitro. **J Virol**. 1995;69(12):8123-6.

Sudiro TM, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, Rothman AL, Raengsakulrach B, Janus J, Kurane I, Ennis FA. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. **Am J Trop Med Hyg**. 1997 Apr;56(4):424-9.

Sumiyoshi H, Hoke CH, Trent DW. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from in vitro-ligated cDNA templates. **J Virol**. 1992;66(9):5425-31.

Sun W, Edelman R, Kanesa-Thanan N, Eckels KH, Putnak JR, King AD, Hough HS,

Tang D, Scherer JM, Hoke CH Jr, Innis BL. Vaccination of human volunteers with monovalent and tetravalent live-attenuated dengue vaccine candidates. **Am J Trop Med Hyg**. 2003;69(6 Suppl):24-31.

Technical Advisory Committee on Dengue Haemorrhagic Fever for the South, East and Western Pacific Regions. **Guide for Diagnosis, Treatment and Control of Dengue Haemorrhagic Fever**. 1980; Manila.

Tesh RB. A method for the isolation and identification of dengue viruses using mosquito cell cultures. **Am. J Trop. Med. Hyg** 1979; 28 (6): 1053–59.

Thein S, Aung M N, Shwe T N, Aye M, Zaw A, Aye K M, Aaskov J. Risk factors in dengue shock syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg** 1997; 56 (5): 566-72.

Trent DW, Grant JÁ, Rosen L, Monath TP. Genetic variation among dengue 2 viruses of different geographic origin. **Virology** 1983; 128: 271-84.

Usuku S, Castillo L, Sugimoto C, Noguchi Y, Yogo Y, Kobayashi N. Phylogenetic analysis of dengue-3 viruses prevalent in Guatemala during 1996-1998. **Arch Virol** 2001;146:1381-1390.

Uzcategui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, Cabello de Quintana M, Jiménez M, Siera G, Cuello de Uzcategui R, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA. Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. **J Gen Virol** 2003;84, 1569-1575.

Vasconcelos PFC, Travassos Da Rosa ES, Freitas RB. Epidemia de febre clássica de dengue causada pelo sorotipo 2 em Araguaia, Tocantins, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 1993; 35 (2): 141 –8.

Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. **Journal of Infectious Diseases** 2000;181:2-9.

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

Wengler G, Wengler G. Cell associated West Nile flavivirus is covered with E + prM protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. **J Virol** 1989; 63:2521-26.

Westaway EG, Brinton MA, Gaidamovich SY, Horzinek MC, Igarashi A, Kaariainen L, Lvov DK, Porterfield JE, Russell PK, Trent DW. Flaviviridae. **Intervirology** 1985; 24: 183-92.

Whitehead SS, Falgout B, Hanley KA, Blaney Jr JE Jr, Markoff L, Murphy BR. A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. **J Virol.** 2003;77(2):1653-7.

World Health Organization (WHO). **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**; Geneva; 1997; 2nd edition.

World Health Organization (WHO). Break-borne fever. **Nature** 2002; 416: 672-74.

Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, Rossi C, Henchal EA, Porter KR, Watts DM, Hayes CG. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue diagnosis. **Diag. Lab. Immunol.** 1997; 4 (4): 452-57.

Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, Blauvelt A, Murphy GS, Robb ML, Innes BL, Birx DL, Hayes CG, Frankel SS. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nat Med.** 2000;6(7):816-20.

Yamshchikov VF, Compans RW. Formation of flavivirus envelope: role of the viral NS2B-NS3 protease. **J Virol** 1995; 69(4):1995-2003.

Yoksan S, Bhamarapravati N. **Localization of dengue antigen in tissue from fatal cases of DHF.** Proceedings of the International conference on Dengue Haemorrhagic Fever 1983; 406-410.

10. ANEXOS

Quadro 10.1: Resultado da aplicação de diferentes metodologias para detecção de DENV-3 em 30 amostras de fígado provenientes de 28 casos fatais.

Reg 1	Mês	Caso	Dia D1	Isol	PCR	IHQ	Taq Man	Observações
74886	1	1	3	den-3	den-3	positivo	positivo	Óbito - Fígado
75186	1	2	3	neg	neg	positivo	neg	Óbito - Fígado
75202	1	3	*	neg	neg	neg	neg	Óbito - Fígado
75303	1	4	*	neg	neg	positivo	positivo	Óbito- Fígado + soro
75411	2	5	4	neg	neg	positivo	neg	Óbito - Fígado
75616	2	6	7	neg	neg	positivo	positivo	Óbito - Fígado
75639	2	7	7	neg	den-3	positivo	positivo	Óbito - Fígado
75899	2	8	6	neg	neg	neg	positivo	Óbito - Fígado
76090	3	9	*	neg	neg	positivo	positivo	Óbito - Fígado
76140	3	10	*	NR	den-3	positivo	positivo	Óbito - Fígado
76146	3	11	*	den-3	den-3	NR	positivo	Óbito - Fígado
76186	3	12	*	neg	den-3	positivo	positivo	Óbito- Fígado
76278	3	13	*	neg	den-3	neg	neg	Óbito - Biópsia Hepática em sangue
76305	3	14	16	neg	neg	neg	neg	Óbito - Fígado
76309	3	14	16	neg	neg	neg	positivo	Óbito - Fígado no Soro fisiológico
76405	3	15	2	neg	neg	positivo	positivo	Óbito - Fígado no sangue
76528	3	16	6	neg	neg	neg	neg	Óbito - Fígado
76583	3	17		NR	neg	positivo	positivo	Óbito - Fígado
76646	3	18	*	neg	den-3	positivo	neg	Óbito - Fígado
76714	4	19	*	neg	neg	positivo	neg	Óbito - Tecido hepático c/ álcool e lavado c/ salina
76733	4	20	*	neg	neg	NR	positivo	Óbito - Fígado
76817	4	21	*	neg	den-3	neg	positivo	Óbito - Fígado
76823	4	22	4	neg	neg	neg	neg	Óbito - Fígado
76941	5	23	*	neg	neg	NR	positivo	Óbito - Fígado
77076	8	24	*	neg	NR	NR	positivo	Óbito - Fígado
77083	8	25	*	neg	neg	NR	neg	Óbito - Tubo de vidro c/ punção de fígado
77084	8	25	*	neg	neg	NR	neg	Óbito - Tubo de plástico c/ punção de fígado
77198	11	26	0	neg	neg	NR	positivo	Óbito- Biópsia Fígado
77263	11	27	2	neg	neg	positivo	positivo	Óbito - Fígado / Chegou em temp. ambiente
77328	12	28	*	neg	neg	neg	neg	Óbito - Fígado