

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

PRISCILLA PASCHOAL BARBOSA

OTIMIZAÇÃO DA RT-PCR *MULTIPLEX* PARA DETECÇÃO DE VÍRUS DENGUE EM
AMOSTRAS DE *Aedes aegypti* INFECTADOS ARTIFICIALMENTE

RECIFE

2016

Priscilla Paschoal Barbosa

Otimização da RT-PCR *Multiplex* para detecção de vírus dengue em amostras de *Aedes aegypti* infectados artificialmente

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Orientadora: Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Coorientadora: Dra. Duschinka Ribeiro Duarte Guedes

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B823o Barbosa, Priscilla Paschoal.
Otimização da RT-PCR Multiplex para detecção de vírus dengue em amostras de *Aedes aegypti* infectados artificialmente / Priscilla Paschoal Barbosa. - Recife: [s.n.], 2016.
72 p.: il., graf.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Constância Flávia Junqueira Ayres;
coorientadora: Duschinka Ribeiro Duarte Guedes.

1. *Aedes* - parasitologia. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 3. Estabilidade de RNA. 4. Vírus da Dengue - prevenção & controle. I. Ayres, Constância Flávia Junqueira. II. Duschinka Ribeiro Duarte. III. Título.

CDU 616.92

Priscilla Paschoal Barbosa

Otimização da RT-PCR Multiplex para detecção de vírus dengue em amostras de *Aedes aegypti* infectados artificialmente

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Eco-biologia de patógenos, vetores e hospedeiros.

Aprovada em: 26/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Orientadora)

Dr. Rafael Dhalia

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Titular Interno)

Dra. Marli Tenório Cordeiro

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães- FIOCRUZ/PE (Titular Externo)

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, especialmente à minha mãe, por todo o amor, paciência e apoio à minha formação acadêmica e à minha educação, além de estar sempre presente, disposta a ajudar e preocupada com o meu bem-estar.

À minha orientadora, Dra. Constância Ayres, pela oportunidade de realização do mestrado e pelo compartilhamento de conhecimento desde a minha iniciação científica.

À minha co-orientadora, Dra. Duschinka Guedes, pela sua ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelos bons conselhos, pela paciência e disponibilidade em me ajudar, também desde a minha iniciação científica.

A todos os amigos do Departamento de Entomologia pela colaboração, convivência e amizade, especialmente às pupas, Larissa, Thiago, Bárbara, Suzane, Tatiane, Emanuel, Suzane Alves, Suzany Menezes, Brena, Fernando, Nathaly e Nadja (nossa amigona suíça) por tornarem mais fáceis até os momentos mais complicados e pelos diversos momentos vividos.

Aos meus amigos Mari Ribeiro, Tatah, Marcella, Juliana, Ariadne, Sarah, Daniel, Julie, Lízia, Luís, Raíssa, Maíra, Nathaly, Karol e Tânia por estarem sempre presentes na minha vida, mesmo alguns estando longe.

A Diego pela sua paciência, apoio, atenção e amor em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição para o crescimento do trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, neste trabalho.

*A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde,
assassinada pela experiência.*

Albert Einstein

BARBOSA, Priscilla Paschoal. Otimização da RT-PCR *Multiplex* para detecção de vírus dengue em amostras de *Aedes aegypti* infectados artificialmente. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

A dengue é a mais importante doença viral transmitida por mosquitos, no que diz respeito à morbidade e mortalidade, que afeta os seres humanos. Este vírus é transmitido pelos vetores *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, este último é o principal vetor nas Américas. O controle da doença se baseia na vigilância laboratorial e vigilância entomológica. A vigilância laboratorial visa aprimorar a capacidade do diagnóstico, detectando precocemente a circulação viral e monitorando os sorotipos circulantes. Dentro deste tipo de vigilância, a RT-PCR é um método bastante usado no diagnóstico da doença em humanos e mosquitos, porém, a má conservação do material pode comprometer a integridade do RNA e trazer resultados falso-negativos. O desenvolvimento de melhores métodos de vigilância do vírus dengue (DENV) em mosquitos é de grande valor para os programas de controle. Desta maneira, o presente projeto visou otimizar a técnica de RT-PCR *Multiplex* para detecção de DENV em amostras de *Ae. aegypti* infectadas artificialmente pelo vírus. *Primers* que amplificam uma região de 80 pb do gene rPL8 de mosquito foram desenhados no site *Primer3* e avaliados na ferramenta online *Multiple Primer Analyzer*, junto com *primers* que amplificam os sorotipos DENV. Não houve competição de *primers* e foi observado bandas distintas no gel de agarose. Foi avaliado o efeito de diferentes formas de preservação do material genético das amostras (RNAlater®, freezer -80°C e nitrogênio líquido) por 7 dias, onde não houve diferenças significativas em relação à integridade do RNA. O efeito de diferentes formas de extração de RNA (Kit da QIAGEN®, TRIzol® e Chomczynski-Sacchi) também foi avaliado e o método Chomczynski-Sacchi obteve o melhor desempenho. A otimização desta técnica permitirá uma maior confiabilidade nos resultados, já que além da detecção dos sorotipos, haverá uma confirmação da qualidade do RNA, aprimorando a capacidade do diagnóstico e auxiliando a prevenção e controle da transmissão da dengue.

Palavras chave: Aedes; Reação em Cadeia da Polimerase; Estabilidade de RNA; Vírus da Dengue.

BARBOSA, Priscilla Paschoal. Optimization of Multiplex RT-PCR for Dengue virus detection in artificially infected *Aedes aegypti* samples. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Dengue is the most important disease that is transmitted by mosquitoes, concerning morbidity and mortality, which affects humans. Dengue virus (DENV) is transmitted by the vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, which is considered the main vector in the Americas. The disease control is based on laboratory and entomological surveillance. The laboratory surveillance aims to improve the ability of diagnosis, detect early viral circulation and monitor the circulating serotypes. The RT-PCR is a method often used in the disease diagnosis in humans and mosquitoes, however, the improper storage of the material could compromise the RNA integrity and bring false-negative results. Therefore, the development of better methods of monitoring dengue virus (DENV) in mosquito populations is of great value for the control programs. This study aimed to optimize the Multiplex RT-PCR technique for DENV detection in artificially infected *Ae. aegypti* by the virus. Primers that amplify a region of mosquito rpL8 gene, were designed on “NCBI Blast” website and evaluated in the online tool “Multiple Primer Analyzer” with the primers that amplify DENV serotypes. There was no competition among the primers and it was possible to observe the different bands in the agarose gel. The effect of different forms of genetic material storage (RNAlater[®], -80 ° C freezer and liquid nitrogen) for 7 days was evaluated, and there were no significant differences between these methods regarding the integrity of the RNA samples. The effect of different forms of RNA extraction (Kit QIAGEN[®], Trizol[®] and Chomczynski-Sacchi) was also evaluated, and Chomczynski-Sacchi method had the best performance. The optimization of this technique will allow for more reliable results, because in addition to detection of viral serotypes there will be a confirmation of the quality of the RNA, improving the ability of diagnosis and aiding the prevention and control of dengue transmission.

Palavras chave: Aedes; Polymerase Chain Reaction; RNA Stability; Dengue Virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa demonstrativo da distribuição da dengue no mundo no ano de 2013.	19
Figura 2- Regiões da América e sua incidência de dengue nos anos 1980 a 2013.	20
Figura 3- Representação dos estágios de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	22
Figura 4- Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> no momento do repasto sanguíneo.	23
Figura 5- Estrutura representativa do vírus dengue.	23
Figura 6- Representação esquemática do genoma de DENV.	24
Figura 7- Regiões de desenvolvimento do DENV dentro do mosquito.	25
Figura 8- Perfil do efeito citopático em células C6/36 infectadas por DENV-2 visualizadas em microscópio óptico (aumento de 40X).	37
Figura 9- Esquema da alimentação artificial via oral com vírus dengue em <i>Aedes aegypti</i> .	38
Figura 10- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando a amplificação das bandas de cada sorotipo de vírus dengue (DENV) junto coma banda do rpL8.	46
Figura 11- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando o teste de degradação dos mRNAs do vírus e do mosquito (<i>pool</i> de mosquitos infectados com DENV-2) quando submetidos a diferentes tempos de exposição a temperatura ambiente	47
Figura 12- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas do rpL8 e do DENV-2 de algumas das amostras de mosquitos infectados com DENV-2, extraídas pelo método Chomczynski-Sacchi.	51
Figura 13- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas de uma amostra de controle positivo DENV-2 (com concentração 545 ng/ µl) nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , respectivamente.	52
Figura 14- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas do rpl8 de uma amostra de <i>pool</i> de 5 mosquitos (com concentração 449,2 ng/ µl) nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , respectivamente.	53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Comparação das médias das concentrações de RNA (ng/μl) das amostras armazenadas por Nitrogênio líquido, em RNA later e em freezer -80°C e seus respectivos desvios padrões. 54
- Gráfico 2** – Comparação das médias das concentrações de RNA (ng/μl) das amostras extraídas por Trizol, Rneasy e Chomczynski-Sacchi e seus respectivos desvios padrões. 55

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1-** *Primers* usados na técnica de RT-PCR para identificação dos diferentes sorotipos de DENV e suas respectivas sequências e tamanho do amplicon. 42
- Quadro 2-** *Primers* testados na técnica de RT-PCR para amplificação de um gene constitutivo do mosquito (controle endógeno) e suas respectivas sequências. 45
- Quadro 3-** *Primers* desenhados para serem utilizados na técnica de RT-PCR para amplificação do gene rpl8 (controle endógeno) e suas respectivas sequências. 45
- Quadro 4-** Variação da concentração de RNA (ng/μl) das amostras obtidas nas três alimentações artificiais e armazenadas pelas três formas. 48
- Quadro 5-** Variação da concentração de RNA (ng/μl) das amostras obtidas nas três alimentações artificiais e extraídas pelas três formas. 49
- Quadro 6-** Porcentagem das amostras obtidas nas três alimentações artificiais, extraídas pelas três diferentes formas de extração com razão 260/280 nm entre 1,75 e 2 (grau de pureza) antes e após o tratamento com DNase. 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A. - *Aedes*

Ag - antigen

C – capsídeo

°C - graus Celsius

CPqAM - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

DC- Dengue clássica

DENV - Dengue virus

DENV1 - Dengue virus 1

DENV2 - Dengue virus 2

DENV3 - Dengue virus 3

DENV4 - Dengue virus 4

DNA- ácido desoxirribonucléico

E - Envelope

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FITC – fluorescein isothiocyanate

IFI- Imunofluorescência indireta

IgG - immunoglobulin G

Kb - quilobase

L1 - Larva de primeiro estágio

L2 - Larva de segundo estágio

L3 - Larva de terceiro estágio

L4 - Larva de quarto estágio

mAb- monoclonal antibody

MIR- Minimum Infection Rate

ml - mililitros

nm- nanômetros

NS- non-structural protein

ORF- Open Reading Frame

pb- pares de bases

PBS- Phosphate Buffered Saline

PM – marcador de peso molecular

prM – Pré- membrana

M- Membrana

RNA- ácido ribonucléico

RPL-8- ribosomal protein L8

rpm- rotações por minuto

RT-PCR - Reverse transcription Polymerase Chain Reaction

SMCP- Sistema de Monitoramento e Controle Populacional

sp.- espécie

TBE- Tris-Borato-EDTA

UTR- Untranslated Region

WHO- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL	18
2.1 Dengue como problema de saúde pública	18
2.2 O mosquito <i>Aedes aegypti</i> (LINNAEUS, 1762)	21
2.3 O vírus dengue (DENV) e o ciclo de transmissão	23
2.4 Vigilância Epidemiológica	26
2.4.1 Vigilância Entomológica	26
2.4.2 Vigilância Laboratorial	27
<u>2.4.2.1 RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)</u>	28
<u>2.4.2.2 Novos métodos de diagnóstico de DENV</u>	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 PERGUNTA CONDUTORA	33
5 HIPÓTESE	34
6 OBJETIVOS	35
6.1 Objetivo Geral	35
6.2 Objetivos Específicos	35
7 MATERIAIS E MÉTODOS	36
7.1 Desenho de <i>primers</i> e RT-PCR <i>Multiplex in silico</i>	36
7.2 Comparação da estabilidade do RNAm do gene do controle endógeno e dos diferentes sorotipos DENV	36
7.3 Preparação dos vírus	36
7.4 Alimentação artificial dos mosquitos com o vírus Dengue sorotipo 2 (DENV-2)	37
7.5 Armazenamento dos mosquitos alimentados artificialmente com DENV-2	38
7.6 Preparação dos inóculos dos mosquitos alimentados artificialmente com DENV-2	39
7.7 Extração de RNA	39
7.7.1 Extração de RNA por TRIzol® (Invitrogen)	39
7.7.2 Extração de RNA pelo <i>RNeasy Mini Kit</i> da QIAGEN®	40
7.7.3 Extração de RNA pelo método de extração Chomczynski-Sacchi.	41
7.8 Tratamento dos RNAs com DNase e quantificação das amostras	41
7.9 RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)	41

7.10 Ensaio para determinação do limiar de detecção do gene do controle endógeno e do DENV-2	42
7.11 Análise estatística	43
8 RESULTADOS	44
8.1 Escolha de primers e RT-PCR Multiplex in silico	44
8.2 Comparação da estabilidade do mRNA do gene rpl8 e dos diferentes sorotipos DENV	46
8.3 Alimentação artificial dos mosquitos com DENV-2	47
8.4 Comparação das três formas de preservação das amostras	48
8.5 Comparação das três formas de extração de RNA	48
8.6 Ensaio para determinação do limiar de detecção do gene do controle endógeno (rpl8) e do DENV-2	51
8.7 Análise estatística	53
9 DISCUSSÃO	56
10 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A dengue é a mais importante doença viral transmitida por mosquitos, no que diz respeito à morbidade e mortalidade (BRASIL, 2014; GUZMAN et al., 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012), cujo agente etiológico, o vírus Dengue (DENV), é transmitido por mosquitos. A doença constitui um problema de saúde, econômico e social para as populações que vivem em áreas endêmicas. Estima-se que aproximadamente 390 milhões de infecções por dengue ocorrem anualmente no mundo (BHATT et al., 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 500.000 pessoas adquirem a forma grave da doença e mais de 20.000 destas morram devido às suas complicações (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

A dispersão geográfica da dengue é influenciada por alguns fatores, como urbanização descontrolada, falta de infraestrutura adequada, mudanças evolutivas nos vírus e falta de um controle eficaz dos vetores (GUBLER, 2011). O principal vetor da doença nas Américas, o mosquito *Aedes aegypti* (*A. aegypti*), é cosmopolita, habita ambientes tropicais e subtropicais e está presente onde há maior concentração humana, pois é altamente domiciliado e se alimenta do sangue de vertebrados, preferencialmente humanos (GUBLER, 1997). Uma vez que o vírus é introduzido no mosquito, através da alimentação, encontra as barreiras das células epiteliais que revestem o intestino do mosquito e o vírus pode escapar para a hemocele e, por último, infectar as glândulas salivares. Após a infecção das glândulas salivares, do vetor competente, finalmente, o vírus é secretado na saliva, e pode causar infecção no hospedeiro suscetível no momento do repasto sanguíneo (ROSEN, 1987).

Estudos são realizados para o desenvolvimento de uma vacina ou terapia antiviral eficaz contra os quatro sorotipos (CAPEDING et al., 2014; DA COSTA et al., 2014; THOMAS; ROTHMAN, 2015), e já se encontra disponível uma vacina desenvolvida pelo grupo francês Sanofi Pasteur, a qual já foi liberada e aprovada no México (GUY et al., 2015). Porém, o controle da doença ainda depende da vigilância laboratorial e vigilância entomológica. Estes tipos de vigilância têm como principal objetivo a redução do número de casos da doença.

A vigilância laboratorial visa aprimorar a capacidade do diagnóstico, através da detecção precoce da circulação viral e monitoramento dos sorotipos circulantes. A vigilância entomológica tem o objetivo de monitorar os índices de infestação do vetor a fim de direcionar as ações de controle para reduzir o contato do vetor com o hospedeiro. A vigilância ativa de mosquitos infectados pode também revelar-se útil na definição do espaço e risco

temporal de adquirir infecção por DENV (BANGS; PUDIANTARI; GIONAR, 2007). Essas ações podem ser relevantes para determinar a magnitude e severidade das epidemias (TEIXEIRA et al., 2005).

Na vigilância laboratorial e na vigilância entomológica, os avanços em biologia molecular oferecem ferramentas para auxiliar a prevenção e controle da transmissão da dengue (URDANETA et al., 2005). Dentre essas ferramentas, destaca-se a *Nested* RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) para dengue que, desenvolvida por Lanciotti et al. (1992), tem sido bastante útil no diagnóstico da doença (DE PAULA; FONSECA, 2004). Guedes et al. (2010) utilizaram este método na vigilância de dengue em populações de mosquitos na cidade do Recife e destacaram a importância deste tipo de vigilância, principalmente em períodos interepidêmicos, onde pode ocorrer a circulação dos diferentes sorotipos na população vetora por outras vias, como a transmissão transovariana. Por outro lado, esta técnica apresenta algumas desvantagens, entre elas a possibilidade de resultados falso negativos, devido à problemática da degradação do RNA das amostras, como consequência do seu mau acondicionamento e preservação, e também resultados falso positivos devido à facilidade de contaminação cruzada (BARBOSA et al., 2016; KAO et al., 2005).

Outras técnicas adaptadas do modelo de Lanciotti *et al.* (1992) foram desenvolvidas e aplicadas com o objetivo de minimizar a possibilidade de contaminação, além de uma redução no tempo do diagnóstico. Dentre elas podemos destacar a técnica de Harris *et al.* (1998), que permite que a reação de transcriptase reversa e identificação dos sorotipos virais sejam realizadas em um único tubo. Estas técnicas não só são usadas na vigilância laboratorial, como também são bastante úteis na vigilância entomológica. Além dos testes moleculares, existem os métodos sorológicos, como o teste Platelia NS1 (Bio-Rad), que é um teste de ELISA que permite a detecção de antígeno NS1 de DENV.

O Teste Platelia é um método bastante sensível, simples, rápido e pode ser aplicado em amostras de mosquitos com sinais de degradação do material genético. A detecção do antígeno NS1 é um método promissor para a vigilância de DENV em mosquitos vetores (BARBOSA et al., 2016) e apresenta melhor desempenho que a RT-PCR *Multiplex* (VOGE et al., 2013), devido ao fato da proteína não estrutural NS1 ser mais estável que o RNA, ou seja, tem seu ritmo de degradação mais lento, mas como desvantagem, não detecta o sorotipo viral.

Apesar da existência de vários métodos de diagnóstico de dengue, o sistema de vigilância e controle da doença, principalmente nos países endêmicos, é falho, muitas vezes devido ao desenvolvimento tecnológico limitado ou pela infraestrutura inadequada dos

laboratórios (GUZMAN; KOURI, 2004). Há a necessidade de novas tecnologias de diagnóstico de DENV e o aperfeiçoamento dos métodos já existentes para que estes sejam mais simples, sensíveis, específicos e apresentem uma relação custo-benefício melhor para o diagnóstico precoce da dengue (OLIVEIRA et al., 2011a). Também é necessário um método que além da detecção de sorotipos, avalie a qualidade do material genético das amostras para tornar a técnica mais confiável, minimizando a ocorrência de possíveis resultados falso-negativos e falso-positivos.

Devido à necessidade de novos métodos de diagnóstico que detectem o sorotipo DENV e ao problema dos resultados falso negativos da RT-PCR *Multiplex*, este estudo teve como objetivo otimizar e validar a técnica de RT-PCR *Multiplex* para detecção de DENV através da adição de um controle endógeno para avaliar a qualidade do RNA, tornando-a mais confiável, sensível e eficaz. Além disso, também foi comparado três formas de armazenamento de amostras e três formas de extração de RNA.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 Dengue como problema de saúde pública

A dengue, doença causada por arbovírus, é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial, devido à sua morbidade e mortalidade (GUZMAN et al., 2010). A doença afeta principalmente populações que vivem em áreas endêmicas e estima-se que aproximadamente 390 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente no mundo (BHATT et al., 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (2015) afirma que cerca de 500.000 pessoas com a forma grave da doença são hospitalizadas a cada ano e 2,5 % destas venham a óbito.

A doença é encontrada principalmente em países tropicais e subtropicais, devido à existência de condições adequadas para o desenvolvimento dos vetores da doença (GUZMAN; ISTURIZ, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). As populações, os sistemas de saúde e a economia da maioria dos países onde a doença é encontrada são bastante afetados (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2012).

A dengue é considerada endêmica em vários países, conforme mostrado na figura 1, principalmente na Ásia, África, e nas Américas, onde foram registrados mais casos de dengue e onde há condições ideais para a sobrevivência do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da dengue (GUZMAN; GARCIA; KOURI, 2006).

Figura 1- Mapa demonstrativo da distribuição da dengue no mundo no ano de 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2014, tradução nossa)

Nota: As linhas de contorno das isotérmicas de janeiro (*January isotherm*) e julho (*July isotherm*) indicam as zonas de risco de dengue, definida pelos limites geográficos dos hemisférios norte e sul para a sobrevivência do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da dengue, e as regiões em laranja, representam os países ou regiões onde foram registrados casos de dengue.

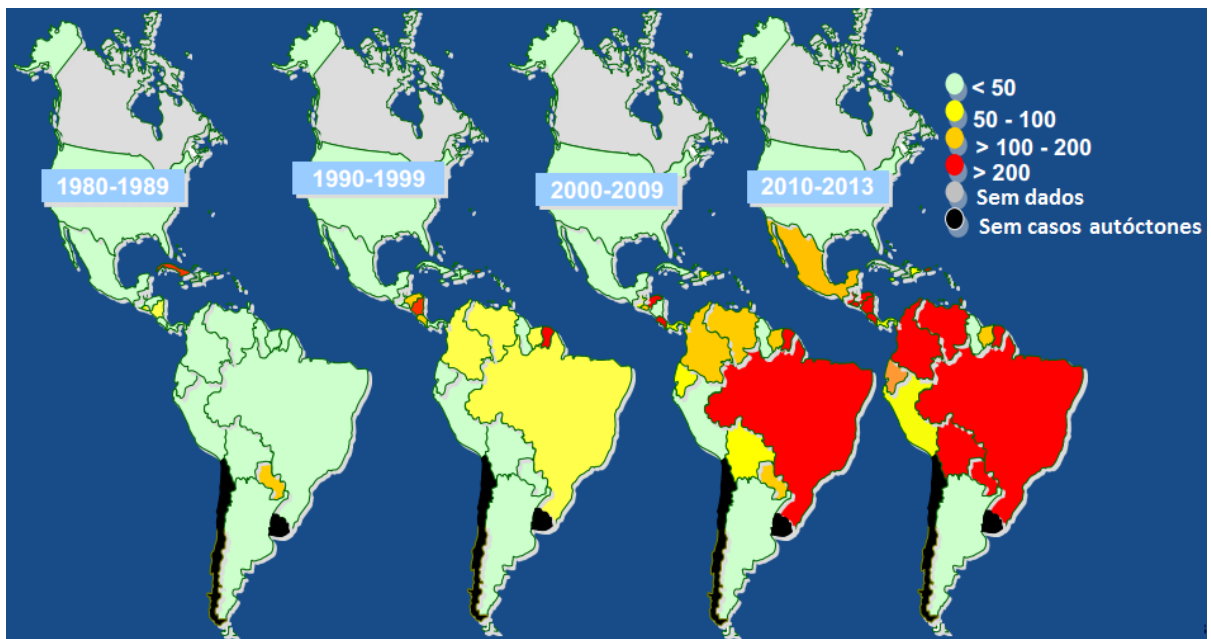
Na Ásia, o problema da dengue é mais evidente na região sudeste, onde emergiu como grave problema de saúde pública após a urbanização da região depois da Segunda Guerra Mundial, quando houve um crescimento acelerado e mal planejado de centros urbanos e resultou na epidemia de dengue no local (OOI; GUBLER, 2009). Os quatro sorotipos de DENV circulam na região sudeste da Ásia, o que aumenta as chances de desenvolvimento da forma grave da doença em pacientes (GUZMAN; ISTURIZ, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

Na África, sabe-se que a dengue está presente desde o começo do século XX, porém, há a necessidade de que seja feita a vigilância de casos para determinar o papel da dengue na saúde pública nesta região (AMARASINGHE et al., 2011). Surto e epidemias de dengue já ocorreram em todas as regiões da África e todos os quatro sorotipos já foram detectados circulando na região (MESSINA et al., 2014; WERE, 2012).

Na região das Américas, houve um grande aumento no número de casos de dengue nas últimas décadas e hoje, é verificado altas taxas de transmissão do vírus em quase todos os países, principalmente na América do Sul e Central (SAN MARTIN et al., 2010), sendo considerada uma área hiperendêmica, com mais de um sorotipo circulando. A elevada

incidência de casos nessa região ocorre devido a vários fatores que levam ao aparecimento de mais criadouros para o mosquito vetor *Ae. aegypti*, entre eles estão: crescimento acelerado das populações urbanas, recursos financeiros insuficientes, falta de saneamento, alterações climáticas, entre outros (TAPIA-CONYER; BETANCOURT-CRAVIOTO; MENDEZ-GALVAN, 2012). A figura 2 mostra a incidência de dengue nas Américas, entre o ano de 1980 e 2013.

Figura 2- Regiões da América e sua incidência de dengue nos anos 1980 a 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2014, tradução nossa)

Nota: Incidência por 100.000 habitantes

Os mosquitos que atuam como vetores de DENV também chegaram às regiões subtropicais e temperadas, incluindo América do Norte e países da Europa (BROWN et al., 2013; SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTEL, 2013). Na Europa, a dengue é rara, porém, frequentemente casos são importados por turistas que vem de áreas endêmicas para países europeus (BOUZID et al., 2014). *Aedes albopictus*, vetor secundário da dengue nas Américas, se encontra estabelecido em vários países da Europa (SEYLER et al., 2009) e, por isso, casos autóctones vem ocorrendo nestas regiões (GJENERO-MARGAN et al., 2011; LA RUCHE et al., 2010; TOMASELLO; SCHLAGENHAUF, 2013). Nos Estados Unidos, a maioria dos casos de dengue também foram importados, mas também foram detectados casos autóctones de dengue (ANEZ; RIOS, 2013) como ocorreu na Flórida entre 2009 e 2012 (RADKE et al., 2012).

Vários fatores estão envolvidos na incidência e dispersão geográfica da dengue,

como: mudanças evolutivas no vírus, a falta de um programa de controle de vetores eficaz, aumento do fluxo do transporte aéreo, entre outros fatores (GUBLER, 2011). Segundo Tauil (2001), o fluxo migratório rural-urbano que ocorreu a partir dos anos 60 foi um dos grandes desencadeadores da epidemia de dengue, principalmente em países subdesenvolvidos, pois houve um crescimento desordenado das cidades, gerando problemas de saneamento e abastecimento de água, o que facilitou a proliferação de criadouros potenciais de *Ae. aegypti* e, conseqüentemente, favoreceu a disseminação da doença.

2.2 O mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762)

O mosquito *Aedes aegypti* é uma espécie originária da África subsahariana, pertence à família Culicidae, subfamília Culicinae, gênero *Aedes*, e subgênero *Stegomyia*. Quando adulto, *A. aegypti* apresenta as seguintes características: tórax enegrecido com manchas, faixas ou desenhos branco-prateadas; pernas listradas e probóscide de comprimento semelhante ao fêmur anterior do mosquito (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

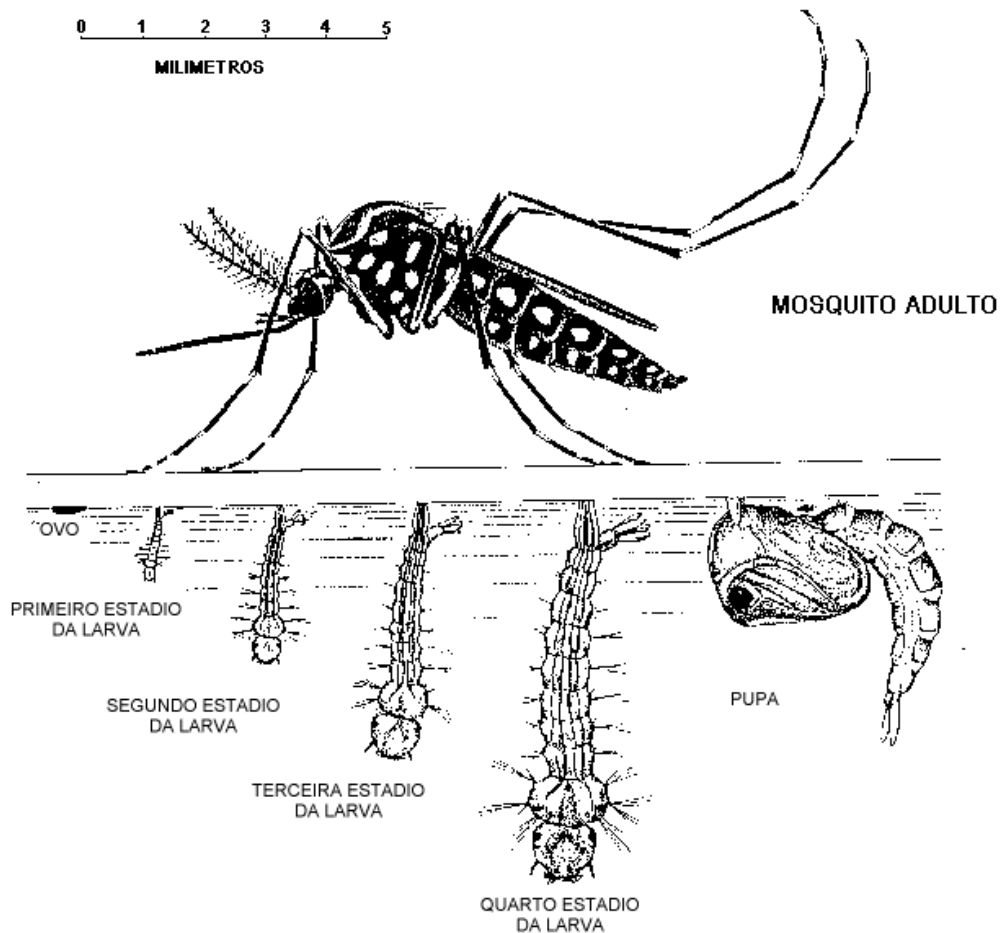
Aedes aegypti é o vetor primário da dengue nas Américas, mas além dele, o mosquito *Aedes albopictus* (SKUSE, 1894) também apresenta competência vetorial para DENV, ou seja, consegue transmitir o vírus, sendo, portanto, considerado um vetor secundário nesta região (ALENCAR et al., 2008). Além de DENV, *A. aegypti* é um vetor importante do vírus da febre amarela, Chikungunya e Zika (LI et al., 2012; POWELL; TABACHNICK, 2013).

Em relação à sua distribuição pelo mundo, *A. aegypti* é cosmopolita, habita ambientes tropicais e subtropicais e preferencialmente onde há maior concentração humana, sendo encontrado no próprio domicílio humano, pois a fêmea se alimenta de sangue de vertebrados (principalmente humano) e coloca seus ovos em recipientes artificiais feito pelo homem (GUBLER, 2011).

Além de locais urbanos, *A. aegypti* também pode ser encontrado em áreas afastadas de aglomerados de pessoas, em ambientes semi-silvestres, e também utiliza recipientes naturais, como bromélias, buracos em árvore, escavação em rocha e bambu, como criadouros, desde que acumule água limpa (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994; GUBLER, 1997).

Aedes aegypti é holometábolo, seu ciclo de vida inclui as fases de ovo, larva (4 estádios: L1, L2, L3, L4), pupa e adulto, com duração de cada estágio variável de acordo com as condições do ambiente (EIRAS, 2005). Em média, todo o desenvolvimento do mosquito até a fase adulta dura em torno de 10 dias. O esquema do ciclo de vida de *A. aegypti* está representado na figura 3.

Figura 3- Representação dos estágios de vida do mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Boyacá (2013)

Na natureza, estes mosquitos se alimentam de néctar de flores e frutos, porém, a fêmea de *A. aegypti* também se alimenta de sangue, processo denominado de repasto sanguíneo (hematofagia) (Figura 4). Este tipo de alimentação é necessário para a maturação dos ovos. Após a digestão de um ou mais repastos sanguíneos, acontece a maturação dos ovos (BARATA et al., 2001). As fêmeas de *A. aegypti* realizam a hematofagia preferencialmente de dia, com maior atividade no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino ou podem ser oportunistas e atacar o homem pela noite (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). O comportamento de hematofagia das fêmeas do mosquito aumenta a possibilidade deste ingerir sangue contaminado com vírus a partir de um humano doente e transmiti-lo a outro sadio, dando início ao ciclo da transmissão biológica (KUNO; CHANG, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Assim, através da picada do mosquito, ele pode se infectar ou transmitir os sorotipos virais para o humano sadio, que pode passar a desenvolver a doença.

Figura 4 - Fêmea de *Aedes aegypti* no momento do repasto sanguíneo.

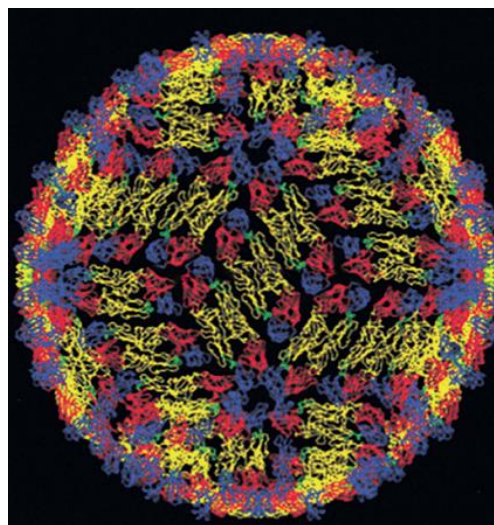


Fonte: Paupy et al. (2009)

2.3 O vírus dengue (DENV) e o ciclo de transmissão

O DENV é um vírus de RNA fita simples de cadeia positiva, o qual possui um formato esférico e apresenta um envelope lipídico (GUBLER, 1998) (Figura 5). Ele pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* e pode ser encontrado na forma de quatro sorotipos diferentes (DENV 1-4) os quais podem ser detectados por métodos sorológicos e moleculares (HALSTEAD, 1988; YONG et al., 2007). Para cada um dos sorotipos existentes há diferentes linhagens ou genótipos (HENCHAL; PUTNAK, 1990).

Figura 5- Estrutura representativa do vírus dengue

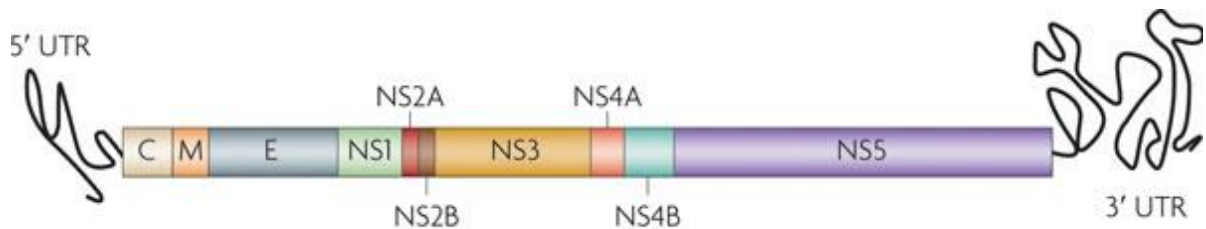


Fonte: Sreaton et al. (2015)

O genoma do vírus apresenta um comprimento de 11kb e codifica três tipos

diferentes de proteínas estruturais que formam a partícula viral (capsídeo, C, membrana, M, e envelope, E). Além destas, codificam outros sete tipos de proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) importantes para a replicação viral (PERERA; KUHN, 2008; SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007; YONG et al., 2007). No genoma de DENV há uma região não traduzida (UTR) localizada em cada extremidade da fase aberta de leitura (ORF) (DEUBEL; KINNEY; TRENT, 1988), as quais são importantes na regulação da tradução e replicação do genoma viral (HARRIS et al., 2006). A organização do genoma de DENV está representada na figura 6.

Figura 6 - Representação esquemática do genoma do DENV.

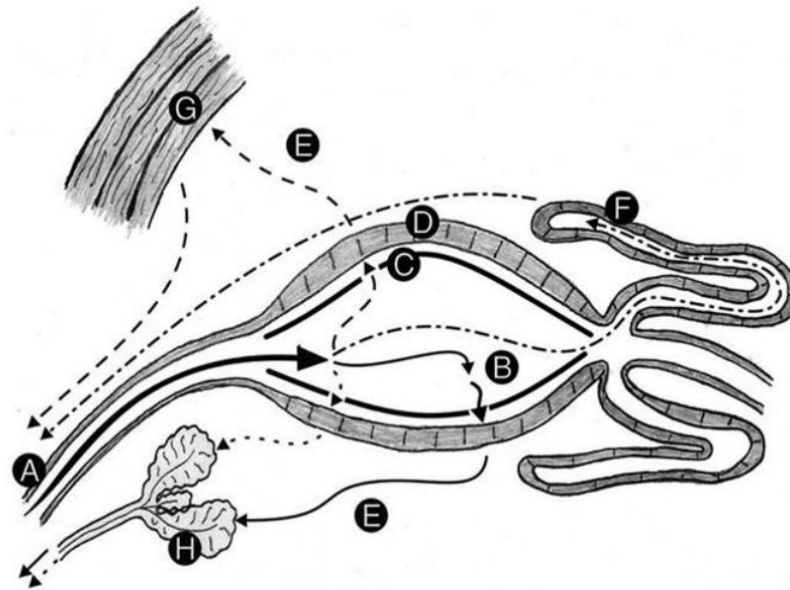


Fonte: Guzman et al. (2010)

No ciclo de transmissão do vírus, primeiramente o hospedeiro vertebrado é picado pelo mosquito vetor que está infectado com o vírus e após um período médio de incubação de 5 a 7 dias, pode começar a apresentar os sintomas da doença (SILER; HALL; HITCHENS, 1926). O mosquito se infecta ao picar uma pessoa infectada e pode se tornar infectante após um período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias (GUBLER; ROSEN, 1976).

No mosquito, primeiro há a infecção das células epiteliais que revestem o intestino, depois o vírus pode migrar do epitélio do intestino médio para a hemocele e infectar a glândula salivar quando, a partir desta etapa, o mosquito se torna infectante (BLACK et al., 2002). Além desta forma de infecção do mosquito, que é a mais comum, eles também podem se infectar através da transmissão transovariana, onde a fêmea pode infectar sua progênie, e na transmissão venérea, onde o macho infecta a fêmea durante a cópula (JOSHI; MOURYA; SHARMA, 2002; KOW; KOON; YIN, 2001). Os órgãos-alvo do mosquito onde ocorre a infecção e multiplicação de DENV estão representados na figura 7.

Figura 7 - Regiões de desenvolvimento do DENV dentro do mosquito.



Fonte: Beersntsen, James e Christensen (2000)

Legenda: A) Local de ingestão do sangue contaminado; B) Intestino; C) Matriz peritrófica; D) Células epiteliais do intestino; E) Hemolinfa; F) Túbulos de Malpighi; G) Musculatura torácica e H) Glândulas salivares.

Quando o humano se infecta com um sorotipo, ele fica permanentemente imune àquele sorotipo, mas não aos outros, portanto, os humanos podem ser infectados por todos os sorotipos existentes (GUBLER, 1998). Quando a pessoa se infecta com o vírus pela segunda vez, há uma maior probabilidade do desenvolvimento da forma mais grave da doença (SINGHI; KISSOON; BANSAL, 2007). Este fato pode ocorrer devido a altas cargas virais resultantes do processo denominado de ‘*antibody-dependent enhancement*’ que ocorre na segunda infecção (VAUGHN et al., 2000). O estado imunológico do paciente, sorotipos e genótipos específicos mais virulentos e níveis elevados da proteína NS1 do DENV também são fatores que podem levar o paciente a desenvolver a forma grave da doença (FOX et al., 2011; LEITMEYER et al., 1999; LIBRATY et al., 2002).

Em relação à patogenia da doença, a dengue pode ser assintomática ou apresentar-se de três formas, com manifestações clínicas diferentes: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (BRASIL, 2014). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), a dengue pode causar febre, dor de cabeça intensa, dor retro-orbital, artralgia, mialgia, erupção cutânea e raramente é fatal, já a dengue com sinais de alerta e dengue grave são as formas mais severas da doença, onde o paciente pode desenvolver complicações mais sérias, podem apresentar quadros graves com choque, com hemorragia ou não, e apresentar risco de morte, porém, se forem diagnosticadas precocemente e se o paciente receber o tratamento adequado

pode ser curado.

2.4 Vigilância Epidemiológica

Apesar de todo o esforço de pesquisas recentes (CAPEDING et al., 2014; DA COSTA et al., 2014; THOMAS; ROTHMAN, 2015) para o desenvolvimento de uma vacina contra os quatro sorotipos de DENV e de já se encontrar disponível uma vacina desenvolvida pelo grupo francês Sanofi Pasteur aprovada (GUY et al., 2015), o controle da doença é realizado através de várias ações, que tem como principal objetivo a detecção precoce de casos que serão capazes de indicar as medidas cabíveis para prevenir novas ocorrências (TEIXEIRA; BARRETO; ZOURAIDE, 1999). A vigilância epidemiológica conta com o trabalho de diversos profissionais de saúde que tenham um bom conhecimento da doença e de um diagnóstico laboratorial eficiente, tem como objetivo evitar grandes epidemias e a letalidade da doença (RIGAU-PEREZ, 1999; TAUIL, 2001).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2009), além de detectar precocemente os casos da doença e evitar o aparecimento de epidemias, a vigilância epidemiológica visa promover tratamento adequado dos pacientes, a fim de reduzir o número de mortes, realizar investigação para identificar a área de transmissão, orientar ações integradas de bloqueio e controle vetorial, acompanhar a curva epidêmica, identificando quais as áreas e grupos com maior ocorrência de casos e realizar investigação de óbitos suspeitos, visando identificar possíveis determinantes.

Para Tauil (2002), a informação obtida pela Vigilância Epidemiológica é essencial para desencadear ações de controle e também para informar à população sobre o risco de infecção. É através destas notificações precoces de casos de dengue que os serviços de saúde e programas de controle da doença podem responder com as devidas ações preventivas para uma determinada região.

2.4.1 Vigilância Entomológica

A Vigilância Entomológica está associada à Vigilância Epidemiológica, mas apresenta como foco, o estudo sobre a ecologia dos vetores da doença, visando medidas que auxiliem a redução do contato do vetor da doença com o hospedeiro, evitando assim, a transmissão do DENV (DONALÍSIO; GLASSER, 2002; TEIXEIRA; BARRETO; ZOURAIDE, 1999).

As informações geradas por este tipo de vigilância levam em conta características ecológicas e biológicas do vetor, sua interação com seu hospedeiro, perfil de transmissão da doença e possíveis mudanças neste perfil que estejam sob influência de fatores ambientais (GOMES, 2002).

A Vigilância Entomológica pode ser feita através da coleta de larvas, no qual é feita a vistoria de depósitos de água e outros recipientes em imóveis e também, através da coleta de adultos, que é realizada por aspiradores de mosquitos. Estes são encontrados dentro e fora das casas, frequentemente em locais pouco acessíveis (BRAGA; VALLE, 2007). Este trabalho é feito por especialistas no campo da ecologia e taxonomia de artrópodes, pois ela utiliza diversas ferramentas para as diferentes espécies de artrópodes (GOMES, 2002).

Segundo Gubler (1989), a Vigilância Entomológica não deve ser feita apenas quando a epidemia está instalada, mas também, durante períodos interepidêmicos, quando não é identificado muitos casos de infecção por dengue, assim é possível prever mais precisamente um futuro surto da doença.

2.4.2 Vigilância Laboratorial

Um dos desafios encontrados na vigilância de casos de dengue é a dificuldade no diagnóstico, já que ela pode ser confundida com muitas doenças febris (TEIXEIRA; BARRETO; ZOURAIDE, 1999). Com isso, o apoio laboratorial é essencial na vigilância ativa da dengue devido à necessidade da confirmação diagnóstica, determinação dos sorotipos circulantes e da possibilidade de um novo surto de dengue (CLARK, 1995). Segundo Wang e Sekaran (2010), para que a vigilância laboratorial seja eficaz, deve-se dar prioridade ao diagnóstico da dengue no paciente durante a fase aguda, pois quanto mais rápido o diagnóstico da doença, melhor as ações tomadas para conter novos surtos da doença.

Dentro da Vigilância Epidemiológica, a Vigilância Laboratorial é realizada através de intervenções clínicas apropriadas e oportunas e conta com o diagnóstico precoce da dengue (TANG; OOI, 2012), e também fornece informações úteis às autoridades sanitárias para que estas possam tomar as medidas a fim de evitar a transmissão do vírus e prevenir a morbidade e mortalidade da doença (OLIVEIRA et al., 2011a).

Diversas técnicas são utilizadas no diagnóstico laboratorial da infecção por DENV, entre elas: isolamento viral (em camundongos ou cultura de células), imunofluorescência (IFA), detecção de antígeno do vírus [por ensaio imunoenzimático (ELISA)], detecção de

anticorpo antivírus da dengue (por inibição de hemaglutinação [HI], teste de fixação de complemento [CF], testes de neutralização, ELISA), e a detecção de ácido nucléico do DENV, através da RT-PCR (GUZMAN; KOURI, 1996; WANG; SEKARAN, 2010). Porém, vale ressaltar que deve-se considerar o período de acometimento da doença em que se encontra o paciente para que seja feita a escolha do teste de diagnóstico mais apropriado para cada caso e também é de extrema importância para a Vigilância Epidemiológica que o diagnóstico da doença seja feito de forma rápida, precisa e seja de baixo custo (KAO et al., 2005; MELO, 2012).

Quanto mais sensível e específico o teste de diagnóstico, mais complexo e caro, como é o caso do isolamento viral e detecção de ácidos nucléicos. A detecção de anticorpos e uso de métodos sorológicos, apesar de mais simples, rápidos e acessíveis, podem ter sua sensibilidade e especificidade comprometida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2009). Por isso, é preciso ter cuidado na escolha do método de diagnóstico para garantir a confiança nos resultados destes testes.

2.4.2.1 RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) se tornou uma ferramenta bastante útil para a Vigilância Epidemiológica de várias doenças virais. No caso do diagnóstico de doenças causadas por vírus de RNA, é utilizada a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa).

O uso da técnica de RT-PCR apresenta várias vantagens em relação às outras técnicas de diagnóstico de DENV. A técnica é capaz de detectar DENV em humanos até o décimo dia após o início dos sintomas (ALVAREZ et al., 1996; DE PAULA; FONSECA, 2004), permite a identificação e diferenciação dos quatro sorotipos responsáveis por um dado foco de infecção (MCBRIDE et al., 1998) e as amostras que serão utilizadas pela RT-PCR podem ser estocadas por longos períodos, para posterior uso no diagnóstico.

Lanciotti (1992), desenvolveu uma técnica de RT-PCR de detecção de DENV, através da "reação *two-step Multiplex nested RT-PCR*", que usa *primers* que apresentam homologia na região C/pM do gene do vírus. Nesta técnica, primeiramente são utilizados dois *primers* (D1 e D2) que amplificam o material genético de todos os sorotipos, e numa segunda reação são utilizados *primers* específicos (TS1, TS2, TS3 e TS4) para cada sorotipo. Porém, segundo o autor da técnica, podem ocorrer resultados falso-positivos, devido à contaminação, ou falso-negativos.

Harris (1998), adaptou e modificou a técnica de Lanciotti (1992), e desenvolveu a “*one-step Multiplex RT-PCR*”, onde todas as reações são realizadas em um único tubo, reduzindo as chances de contaminação e tornando a técnica mais simples e prática. Nesta reação são utilizados cinco *primers* numa única reação: um *primer* na extremidade 5’ que reconhece uma região do gene do Capsídeo (C) comum aos quatro sorotipos DENV (Dcon1) e quatro *primers* diferentes na extremidade 3’ (TS1, TS2, TS3 e TS4) que tem a propriedade de reconhecer regiões específicas de cada um dos quatro sorotipos.

Mishra et al. (2011) avaliaram a aplicabilidade da técnica de “*one-step Multiplex RT-PCR*” em comparação com a “*two-step Multiplex nested RT-PCR*”, e pela primeira vez detectaram com sucesso a infecção simultânea utilizando a técnica mais simples, usando na detecção de sorotipos DENV em amostras clínicas de uma epidemia de dengue de 2008 em Chandigarh, na Índia.

Segundo Guzmán e Kourí (1996), apesar da técnica da RT-PCR no diagnóstico de DENV ter sido bastante utilizada, é necessário melhorar e uniformizar os protocolos para o uso como método de diagnóstico de rotina nos laboratórios, com isso, mais pesquisas devem ser feitas pra o desenvolvimento de novas metodologias que permitam um diagnóstico rápido, precoce e sensível do DENV.

Através da técnica de RT-PCR *Multiplex* é possível identificar os sorotipos que circulam em níveis elevados numa região geográfica e que apresentam risco de serem transmitidos para os humanos, ajudando a determinar quais os locais que se encontram em estado de alerta para possíveis surtos (COSTA; SANTOS; BARBOSA, 2009). Desta forma, os programas de controle da doença podem direcionar melhor suas intervenções para estas regiões necessitadas e assim, responder de forma mais rápida e eficaz às futuras epidemias que possam ocorrer em uma área com populações humanas suscetíveis (EISEN et al., 2009).

A RT-PCR utilizada no diagnóstico de sorotipos de DENV também tem sido bastante aplicada na vigilância do vírus em vetores, uma vez que permite a identificação dos sorotipos DENV também em amostras de mosquitos. O monitoramento da circulação viral em vetores, através da técnica de RT-PCR, permite que níveis de disseminação do vírus sejam identificados precocemente e de forma confiável (COSTA; SANTOS; BARBOSA, 2009).

Diversos autores utilizaram a técnica de RT-PCR para detectar DENV em amostras de mosquitos, dentre eles: o estudo de Chow *et al.* (1998), através da utilização da técnica de RT-PCR baseado no gene NS3, seguido de sequenciamento, detectaram DENV em mosquitos coletados em Singapura; Kow *et al.* (2001) detectaram os quatro sorotipos DENV que estavam circulando em mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de Singapura; Zeidler et

al. (2008) realizaram o diagnóstico das formas larvais do *Aedes aegypti* em Roraima, Brasil; Guedes et al. (2010) utilizaram a técnica de RT-PCR para monitorar os sorotipos circulantes na população vetora da Região Metropolitana do Recife (PE), Barbosa (2016) detectou os sorotipos DENV, através da RT-PCR *Multiplex*, em mosquitos do arquipélago de Fernando de Noronha-PE, Brasil, entre outros.

Segundo Dalla Bona et al. (2011), a vigilância virológica de dengue em mosquitos é mais viável que em humanos, pois não apresenta implicações éticas e os mosquitos permanecem infectados pelo resto da vida (após o período de incubação intrínseco), ao passo que nos humanos, a viremia apresenta um período curto e torna o diagnóstico mais difícil. A sensibilidade da RT-PCR em amostras humanas tende a declinar depois de três dias após o início da doença, portanto, a técnica só é eficaz para o diagnóstico da dengue apenas durante estágios muito recentes da doença (POK et al., 2010), ou seja, no período de viremia, mas não no período de convalescência. Como desvantagem, a detecção de DENV em vetores através do método de RT-PCR pode gerar resultados falso-negativos, pois o concentrado de suspensões de mosquitos pode conter proteases e/ou RNAses que inativam ou degradam o vírus, o que faz com que o método não seja 100% confiável (VOGE et al., 2013).

2.4.2.2 Novos métodos de diagnóstico de DENV

Segundo Guzmán e Kourí (2004), o controle da dengue ainda não é eficaz, há limitações no desenvolvimento tecnológico, principalmente nos países endêmicos, onde há maior necessidade de uma vigilância ativa de casos. Na maioria destes países, a infraestrutura dos laboratórios não é adequada e o conhecimento técnico e capacidade de pesquisa são limitados, tornando o sistema de vigilância da dengue lento e falho.

O contínuo desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico de DENV e o aperfeiçoamento dos métodos já existentes é essencial para tornar o controle da doença mais satisfatório. Estes novos métodos devem ser mais simples, sensíveis, específicos e apresentar melhor custo-benefício para o diagnóstico precoce da dengue (OLIVEIRA et al., 2011a).

Recentemente, foram desenvolvidos métodos mais sensíveis e rápidos como: a detecção do vírus por PCR usando um ‘coquetel’ de *primers* que detecta várias linhagens do DENV e também utiliza alguns *primers* ‘*human-blind*’, desenhados de forma que sua probabilidade de se anelar com DNA humano é extremamente baixa, e desta forma, tornam a técnica mais sensível, descrito por Gijavanekar et al. (2011); qRT-PCR *Fourplex*, o qual detecta o sorotipo do vírus e diferentes linhagens em aproximadamente 3 horas,

desenvolvido por Johnson et al. (2005); A reação de PDCR (*Polymerase chain displacement reaction*), é uma modificação da PCR convencional que utiliza mais de um par de *primers* “pan-dengue” e aumenta a sensibilidade da amplificação, diminui as chaces de contaminação e diminui o tempo de conclusão (HARRIS et al., 2013); A reação de MPS (*Massively paralled sequencing*) detecta arbovírus de importância médica e microorganismos (HALL-MENDELIN et al., 2013).

Apesar de todo o avanço no desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico de DENV, no caso da detecção do vírus realizada no vetor, ainda não há uma técnica confiável que permita identificar a integridade do RNA extraído e os sorotipos DENV na mesma reação de RT-PCR *Multiplex*.

Considerando o exposto, este estudo visou a otimização da RT-PCR *Multiplex* com a adição de um controle endógeno na reação. Este aperfeiçoamento da técnica evitaria a possibilidade de resultados falsos negativos e consequentemente, uma má interpretação dos resultados.

3 JUSTIFICATIVA

O monitoramento da infecção por DENV em populações de mosquitos permite aos programas de controle do vetor direcionar melhor suas intervenções em áreas com maior risco de epidemias e responder de forma mais rápida e eficaz às epidemias de DENV em novas áreas com populações humanas suscetíveis. O desenvolvimento de melhores métodos de vigilância de DENV em populações de mosquitos seria de grande valor para programas de saúde pública e controle de vetores, pois uma das formas de manutenção do vírus na natureza é através do mosquito, e este uma vez infectado, permanece infectado pelo resto da vida, podendo até transmitir para a prole. A RT-PCR é um método tradicional e muito utilizado no diagnóstico da doença em humanos, mas no caso da detecção do vírus em mosquitos, podem haver problemas de resultados falso-negativos devido à má conservação do material genético do mosquito o que compromete a integridade do RNA extraído. É necessário o desenvolvimento de um método eficaz e confiável para detecção de DENV na população vetora que além da identificação dos sorotipos virais, confirme a qualidade do RNA. Desta forma, os resultados falso-negativos serão evitados e a confiabilidade nos resultados será assegurada.

4 PERGUNTA CONDUTORA

A otimização da RT-PCT *Multiplex*, através da introdução de um controle endógeno na detecção de DENV em amostras de *Aedes aegypti* infectadas artificialmente pelo vírus, é capaz de reduzir os resultados falso-negativos?

5 HIPÓTESE

A otimização da RT-PCT Multiplex, através da introdução de um controle endógeno na detecção de DENV em amostras de *Aedes aegypti* infectadas artificialmente pelo vírus, é capaz de reduzir os resultados falso-negativos.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Otimizar a técnica de RT-PCR *Multiplex* para detecção de DENV em amostras de *Aedes aegypti*.

6.2 Objetivos Específicos

- a) Desenhar primers que atuem como um controle endógeno da qualidade do RNA para ser usado na RT-PCR *Multiplex* em amostras de mosquitos;
- b) Avaliar o efeito de diferentes formas de preservação do material genético das amostras de mosquitos sobre a performance na RT-PCR *Multiplex*;
- c) Avaliar o efeito de diferentes formas de extração de RNA sobre a performance na RT-PCR *Multiplex*;
- d) Validar a RT-PCR em *pools* infectados artificialmente com o DENV-2.

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Desenho de *primers* e RT-PCR *Multiplex in silico*

Com o objetivo de obter um controle endógeno para ser usado na RT-PCR *Multiplex* em amostras de mosquitos, foram selecionadas sequências dos genes candidatos através do site do *VectorBase* (<https://www.vectorbase.org/>). *Primers* foram desenhados no site Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e avaliados *in silico* através da ferramenta online *Multiplex primer analyzer* disponível no site da *Thermo Fisher Scientific* (www.thermofisher.com), com o objetivo de verificar se havia competição entre os *primers*. Os *primers* selecionados foram adicionados à RT-PCR *Multiplex* de DENV com os *primers* de Lanciotti et al. (1992) a fim de verificar se havia amplificação inespecífica quando usados simultaneamente.

7.2 Comparação da estabilidade do RNAm do gene do controle endógeno e dos diferentes sorotipos DENV

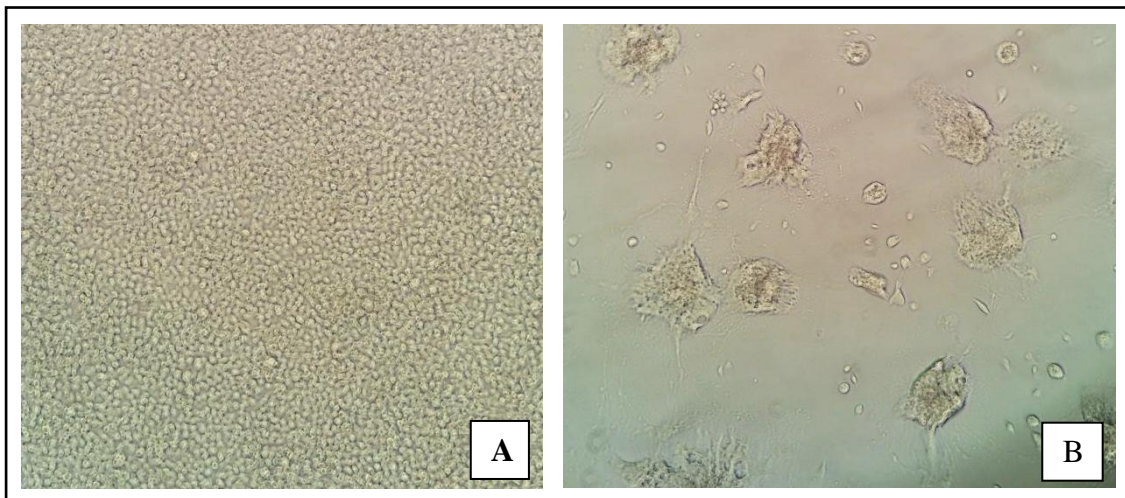
Para avaliar se os genes possuem estabilidade comparáveis, quanto à degradação do RNAm do mosquito e do vírus, foi feita a exposição do material à temperatura ambiente, por períodos diferentes, e posterior utilização desse material na RT-PCR *Multiplex*. Nesse experimento, a mesma amostra contendo cinco mosquitos infectados por DENV foi dividida em diferentes tubos, contendo 2µl do RNA extraído desta amostra e submetida a um tempo diferente para eventual degradação: 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 14h, 18h e 24h.

7.3 Preparação dos vírus

Para os experimentos de alimentação artificial, foi usado o vírus Dengue sorotipo 2 (DENV2- 3808). Este estoque foi gentilmente cedido pela Dra. Marli Tenório do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE) e foi usado para expandir o vírus em cultura de células de mosquitos (C6/36). Os vírus foram expandidos em garrafas de cultura de células contendo células C6/36 em meio L-15 de crescimento (meio Leibovitz com 5% de soro fetal bovino) e a propagação dos vírus em células C6/36 foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Guedes et al. (2012).

Foi preparada uma garrafa de cultura (25cm²) com aproximadamente 6x10⁶ células adicionadas a 10 ml de meio Leibovitz suplementado com 5% de soro fetal bovino (meio L-15 de crescimento). Após duas horas para a formação da monocamada, o meio L-15 de crescimento foi desprezado e 250 µl de cada estoque viral foram colocados na garrafa de cultura. Estas garrafas foram colocadas na estufa a 28°C por uma hora para a adsorção do vírus nas células e, após este tempo, foram adicionados 10 ml de meio L-15 de manutenção em cada garrafa de cultura. As garrafas foram colocadas novamente na estufa a 28°C e observadas diariamente em microscópio invertido para acompanhamento da formação do efeito citopático (Figura 8). Quando 80-90% das células contidas nas garrafas de cultura apresentaram efeito citopático, as garrafas foram submetidas a processos de congelamento em freezer -80°C e descongelamento em banho-maria a 37°C (por três vezes) e por último, foram misturadas ao sangue de coelho desfibrinado na proporção de 1:1.

Figura 8 – Perfil do efeito citopático em células C6/36 infectadas por DENV-2 visualizadas em microscópio óptico (aumento de 40 X).



Fonte: O autor

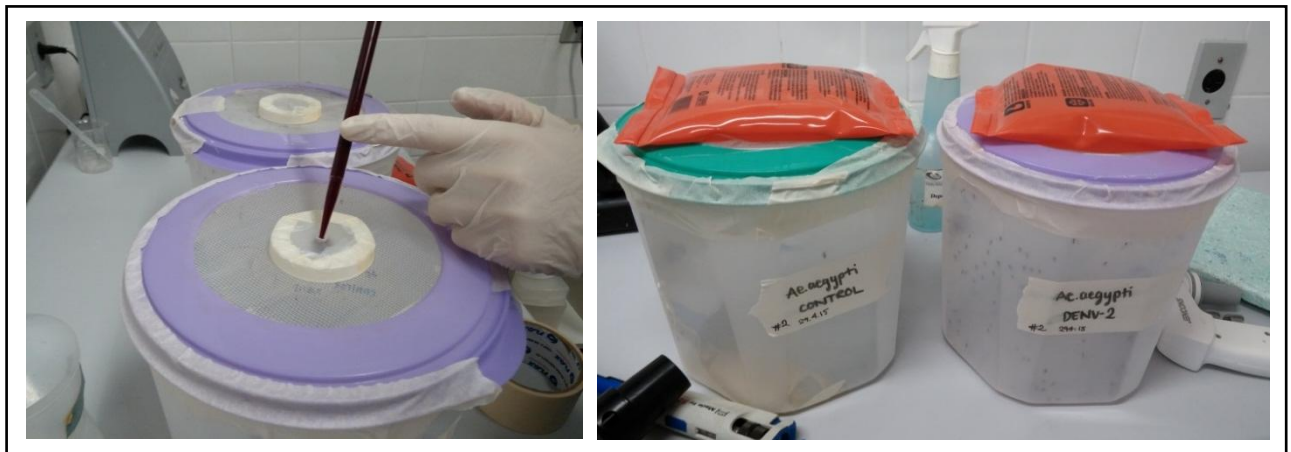
Legenda: A) Células não infectadas B) Células infectadas com DENV-2 no sétimo dia pós infecção.

7.4 Alimentação artificial dos mosquitos com o vírus Dengue sorotipo 2 (DENV-2)

O procedimento de infecção oral foi realizado no infectório do Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ). As etapas de infecção e manutenção dos mosquitos infectados foram realizadas dentro das normas internacionais de biossegurança e o procedimento de infecção oral de *Ae. aegypti* com DENV seguiu o protocolo descrito por Carvalho-Leandro (2012), com algumas modificações descritas a seguir.

Aproximadamente 60 fêmeas de *A. aegypti* com 7-10 dias de emergência foram infectadas com DENV-2 através de alimentação sanguínea artificial, com sangue de coelho infectado. A alimentação com sacarose e água foi retirada 24 horas antes da infecção oral e os mosquitos foram alimentados durante 45-60 minutos com uma mistura de suspensão de vírus previamente expandida em células C6/36 e sangue na proporção de 1:1. Esta mistura foi colocada em uma placa de alimentação de mosquitos e mantida a aproximadamente 37°C através de bolsas térmicas durante a alimentação oral. Um grupo de aproximadamente 30 fêmeas foi alimentado com sangue não infectado, para ser utilizado como controle negativo nos experimentos. O esquema da alimentação artificial via oral com DENV em *Ae. aegypti* está respresentado na figura 9.

Figura 9 – Esquema da alimentação artificial via oral com vírus dengue em *Aedes aegypti*.



Fonte: O autor

Após a alimentação, os mosquitos foram anestesiados em gelo e mantidos em placa fria para separação das fêmeas ingurgitadas. As fêmeas que não se alimentaram adequadamente foram descartadas do estudo e as fêmeas ingurgitadas permaneceram no infectório por 7 dias, com alimentação de água e açúcar até o seu armazenamento.

7.5 Armazenamento dos mosquitos alimentados artificialmente com DENV-2

No 7º dia após alimentação, os mosquitos obtidos na alimentação artificial foram sacrificados em freezer -80° C rapidamente, divididos em *pools* de cinco mosquitos e colocados em microtubos de 1,5 ml livres de DNase e RNase. O total de *pools* foi dividido em três grupos, onde cada grupo foi submetido a uma forma diferente de armazenamento: com solução de RNA *later*, em freezer -80°C ou em nitrogênio líquido. As amostras foram

acondicionadas por sete dias no laboratório do Departamento de Entomologia da FIOCRUZ/PE para posterior utilização.

7.6 Preparação dos inóculos dos mosquitos alimentados artificialmente com DENV-2

Os inóculos foram preparados a partir das amostras de *pools* de cinco mosquitos alimentados artificialmente com DENV-2. Os mosquitos foram retirados dos microtubos e foram transferidos para um novo microtubo de 1,5 ml contendo 350 µl de água ultra-pura destilada livre de RNase e DNase (Invitrogen™, *Life Technologies*). Os *pools* de mosquitos armazenados em RNA *later* passaram por um processo de retirada de excesso de RNA *later* antes de serem transferidos para um novo tubo. As amostras foram maceradas com o uso de micropistilos limpos e estéreis até a completa homogeneização do material. Após a homogeneização, os microtubos contendo as amostras de mosquitos macerados foram centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) e depois, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo microtubo e estocado em freezer -80°C até a sua utilização.

7.7 Extração de RNA

Com o objetivo de comparar a eficácia e qualidade dos diferentes métodos de extração de RNA do DENV e do mosquito em uma mesma reação, após a preparação dos inóculos de todas as amostras, o RNA de cada amostra foi extraído de três formas diferentes: por TRIzol® (Invitrogen), *RNeasy Mini Kit* da QIAGEN® e pelo protocolo descrito por Chomczynski-Sacchi (1987), conforme descrições nas seções abaixo.

7.7.1 Extração de RNA por TRIzol® (Invitrogen)

A extração de RNA usando o reagente TRIzol® (Invitrogen™) foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante com modificações conforme descrição a seguir: cem microlitros (100 µl) do inóculo foram transferidos para um microtubo de 1,5 ml estéril e livre de DNases e RNases, contendo 200 µl de Trizol. Após homogeneização do material e incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado ao microtubo 100 µl de clorofórmio. A mistura foi novamente homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 3 minutos. Após incubação, os microtubos foram submetidos à centrifugação em

centrífuga refrigerada (4°C) a 12000 rpm por 15 minutos. A parte aquosa foi transferida para um novo microtubo e a este microtubo foram adicionados 250 µl de isopropanol. Após nova homogeneização e incubação por 10 minutos, o microtubo foi novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o *pellet* de RNA. O *pellet* foi lavado com 300 µl de etanol 75% e, após centrifugação de 5 minutos a 10500 rpm, o etanol foi descartado e o microtubo levado à estufa a 37°C por 20 minutos para secagem do material. O *pellet* de RNA foi ressuscitado em 30 µl de água livre de DNAses e RNAses e armazenado no freezer -80°C.

7.7.2 Extração de RNA pelo *RNeasy Mini Kit* da QIAGEN®

A extração de RNA dos *pools* de mosquitos pelo *RNeasy Mini Kit* da QIAGEN® foi realizada seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Primeiramente foi preparada uma solução de 10 µl de β-Mercaptoetanol (β-ME) para cada 1 ml de *Buffer* RTL (disponível no kit) e quatro volumes de etanol foram adicionados ao tubo do *Buffer* RPE (disponível no kit). Foram colocados 100 µl da amostra (mosquitos macerados em água ultra-pura destilada) e 600 µl do *Buffer* RTL (com β-ME) em um microtubo onde a mistura foi homogeneizada em um agitador de tubos AP 56 (*Phoenix*), por 40 segundos, e centrifugada por três minutos em velocidade máxima a 20°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e transferido para outro eppendorf, onde foi adicionado um volume de etanol 70%. A mistura foi homogeneizada com o uso de uma pipeta e 700 µl foi transferida para a coluna spin RNeasy inserida em um tubo 1,5 de ml (disponível no kit). Em seguida, a amostra na coluna foi centrifugada por 15 segundos a 1000 rpm e 20°C, o líquido do tubo coletor foi descartado e o tubo, reutilizado. Após o descarte, 700 µl do *Buffer* RW1 foram adicionados na coluna, a amostra foi submetida a centrifugação por 15 segundos, 1.000 rpm a 20°C. O líquido do tubo coletor foi descartado novamente. Foram adicionado 500 µl do *Buffer* RPE (diluído) na coluna com o tubo, este foi centrifugado por 2 minutos, 1000 rpm a 20°C, o tubo de 2 ml com o líquido foi descartado e foi colocado um novo tubo 2ml. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação por 1 minuto, 14.000 rpm a 20°C, o tubo com o líquido foi novamente descartado e a coluna foi colocada em um microtubo de 1,5 ml. Finalmente foi adicionados 30 µl de água livres de RNase (disponível no kit) na coluna, e após um minuto, em temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada por um min, 1000 rpm a 20°C, a água com o RNA da amostra desceu para o microtubo e este foi armazenado no freezer -80°C

7.7.3 Extração de RNA pelo método de extração Chomczynski-Sacchi

A extração de RNA dos *pools* de mosquitos pela técnica Chomczynski-Sacchi (1987) foi realizada de acordo com o protocolo descrito a seguir: Em um microtubo de 1,5 ml (Eppendorf) contendo 100 µl da amostra de mosquito macerada em água ultra-pura, foram adicionados 100 µl de isotiocianato de guanidina, 100 µl de fenol ácido (pH 5.0), 50 µl de clorofórmio e 25 µl de acetato de sódio (2M). O microtubo foi agitado por inversão 10 vezes, centrifugado por 20 minutos, por 1000 rpm e 4°C. A porção superior do sobrenadante foi retirada e colocada em outro microtubo, onde foi adicionado um volume proporcional de isopropanol. Em seguida, o tubo foi agitado por inversão 20 vezes. Após este procedimento, a amostra foi armazenada no freezer a -20°C por aproximadamente 12 horas e após este tempo, foi centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão e o tubo permaneceu aberto e invertido por 15 minutos com a finalidade de secar o *pellet* de RNA no fundo do tubo. Em seguida o tubo foi revertido e transferido para uma estufa (37°C) por 5 minutos para secagem do material. Finalmente o *pellet de RNA* foi ressuspendido em 30 µl de água livre de DNAsas e RNAsas e armazenado no freezer -80°C.

7.8 Tratamento dos RNAs com DNase e quantificação das amostras

Após a extração, os RNAs foram tratados com DNase (Turbo DNase Cat No AM2238 - Ambion, *Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante, com a finalidade de evitar contaminação com DNA genômico.

Antes e após o tratamento com DNase, RNAs foram quantificados através do *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific)*, onde foi avaliado a concentração de RNA e o grau de pureza das amostras através do cálculo da razão entre as absorvâncias 260 nm e 280 nm. Após tratamento e quantificação, os RNAs foram estocados em freezer -80°C até serem utilizados.

7.9 RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)

A RT-PCR foi realizada através da técnica de RT-PCR *Multiplex* para Dengue como descrito em Mishra et al. (2011) com modificações e com a adição de *primers* para o controle endógeno, que foram desenhados neste trabalho. Após o procedimento, o desempenho da técnica foi avaliado.

Na RT-PCR *Multiplex*, foram utilizados na mistura: H₂O, Taq polimerase, TP Buffer, dNTP (2nM), MgCl₂, DTT (1M), RT-AMV (Introgen) (15U/μl), RNase OUT (Invitrogen) (10 μM), *primers* (10 μM) do quadro 1 (para amplificação dos sorotipos de dengue), e do controle endógeno e 2μl de RNA da amostra. A mistura foi amplificada em um termociclador (BIOMETRA-Thermo Trio Block) programado para: 1 ciclo de 50°C por 60 minutos; 1 ciclo a 95°C por 3 minutos, 55°C por 15 segundos, 72°C a 30 segundos; 34 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. O tamanho do amplicon para os sorotipos DENV são os seguintes: 489 pb para DENV-1, 119 pb para DENV-2, 290 pb para DENV-3 e 392 pb para DENV-4. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M e EDTA 0,002 M, pH 8,3), corado com brometo de etídeo e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

Quadro 1 - *Primers* usados na técnica de RT-PCR para identificação dos diferentes sorotipos de DENV e suas respectivas sequências e tamanho do amplicon.

<i>Primers</i>	Seqüência 5' → 3'	Amplicon
Dcon1 (<i>foward</i>)	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	
TS1 (<i>reverse</i>)	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	489 pb
TS2 (<i>reverse</i>)	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119 pb
TS3 (<i>reverse</i>)	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290 pb
TS4 (<i>reverse</i>)	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392 pb

Fonte: Lanciotti et al. (1992)

7.10 Ensaio para determinação do limiar de detecção do gene do controle endógeno e do DENV-2

Para determinar o limiar de detecção do gene do controle endógeno e do DENV-2 foram realizadas diluições seriadas para obter uma curva de concentrações através das diluições 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰. Após diluições, os resultados das concentrações foram convertidos para cópias de moléculas por μl usando a seguinte fórmula (KRIEG, 1990):

$$Y \text{ moléculas/ } \mu\text{l} = \frac{X \text{ g/ } \mu\text{l RNA}}{\text{Tamanho do transcrito (bp)} \times 340} \times 6.02 \times 10^{23}$$

7.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism versão 4.00, onde foram utilizados os testes ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey para avaliar os resultados.

8 RESULTADOS

8.1 Escolha de *primers* e RT-PCR *Multiplex in silico*

Primers que funcionam como controle endógeno de mosquito, já publicados anteriormente e disponíveis no laboratório do Departamento de Entomologia (CPqAM – FIOCRUZ), foram testados na RT-PCR *Multiplex* junto com os *primers* que amplificam os sorotipos de DENV para escolha do melhor par de *primers*. Foram testados na reação de RT-PCR *Multiplex*, *primers* que amplificam um fragmento do gene da actina de mosquito, com amplicon de 211 pb, porém quando testados *in silico* através da ferramenta online *Multiplex primer analyzer* (Thermo Fisher Scientific), foi verificado que haveria formação de dímeros com os *primers* que amplificam sorotipos de DENV, o que foi confirmado nos testes *in situ*. Outro par de *primers* que amplifica um fragmento do gene da β -actina do mosquito, com um amplicon de 159 pb, também foi testado, porém não houve uma boa amplificação da banda, apresentando-se muito clara e não sendo ideal para ser utilizada como controle endógeno. Por último, foram testados *primers* que amplificam um fragmento do gene constitutivo da proteína ribossomal L8 (rpL8) do mosquito, com um amplicon de 122 pb (MAGALHAES et al., 2008). Com estes *primers* foi observado uma boa amplificação da banda quando este era avaliado sozinho na técnica de RT-PCR, porém quando era avaliado simultaneamente com os *primers* Dcon1, TS1, TS2, TS3 e TS4, não era possível diferenciar a banda do rpL8 e a correspondente ao DENV-2. O amplicon do DENV-2 apresenta um tamanho 119 pb, diferenciando-se do rpL8 por apenas 3 pb, o que não é suficiente para separar duas bandas distintas em gel de agarose. O quadro 2 apresenta todos os *primers* que foram testados como controle endógeno da reação.

Quadro 2 - *Primers* testados na técnica de RT-PCR para amplificação de um gene constitutivo do mosquito (controle endógeno) e suas respectivas sequências e tamanho do amplicon.

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'	Amplicon
<i>Actin (forward)</i>	TCGCACACAGTCCCAATCTACGAA	
<i>Actin (reverse)</i>	CGGTGGCCATTTCCTGTTCAAAGT	211pb
β - <i>actin (forward)</i>	AAGGCTAACCGTGAGAAGATGAC	
β - <i>actin (reverse)</i>	GATTGGGACAGTGTGGGAGAC	159pb
rpL8 (<i>forward</i>)	TGGGGCGTGTTATTCGTGCACAG	
rpL8 (<i>reverse</i>)	CAGGTATCCGTGACGTTCCGGCA	122pb

Fonte: O autor

A fim de se obter um par de *primers* que não tivesse tamanho próximo dos demais amplicons para DENV na reação, foram desenhados dois novos *primers* (*Forward e reverse*) que amplificam o gene rpL8, porém, com o tamanho do amplicon de 80 pb. As sequências estão mostradas na tabela 3.

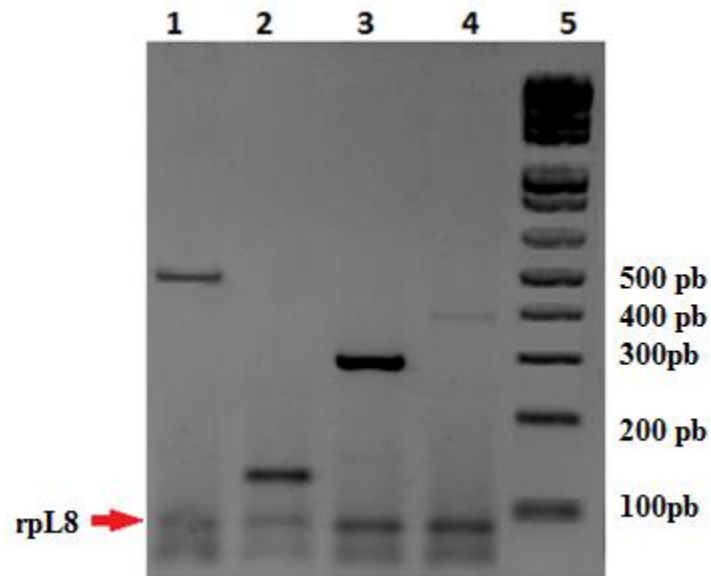
Quadro 3 - *Primers* desenhados para serem utilizados na técnica de RT-PCR para amplificação do gene rpL8 (controle endógeno) e suas respectivas sequências.

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'	Amplicon
rpL8 (<i>forward</i>)	GCAACCTGGAGGAGAAGACC	
rpL8 (<i>reverse</i>)	GGATTGTGGGCAATGACGGA	80pb

Fonte: O autor

A reação de RT-PCR *Multiplex* foi realizada com os sete *primers* em um único tubo (*primers* dos sorotipos da dengue e *primers* do rpL8, com amplicon de 80pb) da seguinte forma: quatro tubos com RNA extraído de mosquitos não infectados foram misturados com o RNA dos diferentes sorotipos de DENV (um sorotipo em cada tubo) na proporção de 1:1, e foram submetido a RT-PCR e eletroforese. No fim da reação, foi possível observar no gel de agarose todas as bandas distintas (Figura 10). Também não foi verificada a presença de competição entre estes 7 *primers* através da ferramenta online *Multiple primer analyzer* (*Life technologies*)

Figura 10- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando a amplificação das bandas de cada sorotipo do vírus dengue (DENV) junto com a banda do rpL8



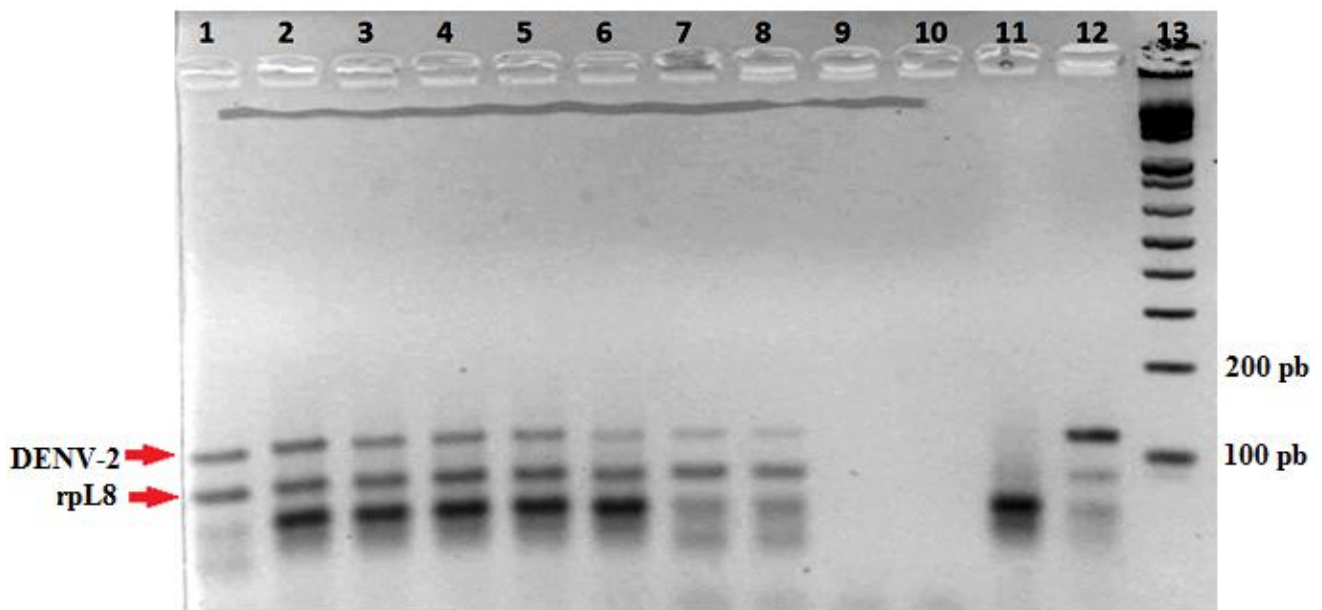
Fonte: O autor

Legenda: 1- Controle positivo para DENV-1 (489 pb) e controle positivo para rpL8 (80 pb); 2- Controle positivo para DENV-2 (119 pb) e controle positivo para rpL8 (80 pb); 3- Controle positivo para DENV-3 (290 pb) e controle positivo para rpL8 (80 pb); 4- Controle positivo para DENV-4 (392 pb) e controle positivo para rpL8 (80 pb); 5- Marcador molecular 1kb Plus Ladder.

8.2 Comparação da estabilidade do mRNA do gene rpL8 e dos diferentes sorotipos DENV

Para avaliar o perfil de degradação de cada mRNA, foi realizada uma reação de RT-PCR *Multiplex* das amostras, utilizando os *primers* que amplificam uma região do gene rpL8 (80 pb) e *primers* que amplificam os sorotipos do DENV. Após a exposição das amostras à tempos diferentes em temperatura ambiente, foi feita a eletroforese, em gel de agarose 2,5%, e foi possível observar, através do aspecto da banda do rpL8 (controle endógeno) e do sorotipo DENV-2, como é o perfil de degradação de cada mRNA (Figura 11). Através desta análise, foi possível observar que o mRNA do rpL8 é mais estável que o DENV-2.

Figura 11- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando o teste de degradação dos mRNAs do vírus e do mosquito (*pool* de mosquitos infectados com DENV-2) quando submetidos a diferentes tempos de exposição a temperatura ambiente.



Fonte: O autor

Legenda: 1-amostra de mosquitos infectados com DENV-2 sem exposição a temperatura ambiente (amostra armazenada apenas no freezer -80°C); 2- amostra de mosquitos infectados com DENV-2 submetidos a 2 horas a temperatura ambiente; 3- 4 horas; 4- 6 horas; 5- 8 horas; 6- 10 horas; 7- 12 horas; 8- 14 horas; 9- 18 horas; 10- 24 horas; 11- controle negativo; 12- controle positivo DENV-2; 13- Marcador molecular 1kb Plus Ladder.

8.3 Alimentação artificial dos mosquitos com o DENV-2

As alimentações artificiais de mosquitos com DENV-2 foram realizadas em triplicata. Após cada infecção os mosquitos foram divididos em *pools* de cinco mosquitos. Foram realizadas três infecções nos dias 04/08/2015, 24/09/2015 e 13/10/2015, e o título do estoque de DENV2 usado foi de aproximadamente $3,7 \times 10^5$ FFU/ml. Na primeira infecção foram obtidos 12 *pools* de mosquitos infectados com DENV-2 e 6 *pools* de mosquitos alimentados com sangue não infectado, controles negativos. Na segunda infecção, 9 *pools* de mosquitos infectados com DENV-2 e 9 *pools* de controle negativo. Por último, na terceira infecção, 21 *pools* de mosquitos infectados e 3 *pools* de mosquitos não infectados. O total de *pools* de cada alimentação foi dividido em 3, onde cada grupo foi armazenado em 1 das 3 formas de acondicionamento, podendo ser em nitrogênio líquido, RNA *later* (em freezer -20°C) ou freezer -80°C.

Somando todos os mosquitos recuperados após as três infecções realizadas, obtivemos um total de 60 *pools* (300 fêmeas) de mosquitos alimentados, onde 42 *pools* (210 fêmeas)

eram mosquitos alimentados com sangue infectado por DENV-2 e 18 pools (90 fêmeas) eram mosquitos alimentados com sangue sem o vírus (controle negativo para DENV).

8.4 Comparação das três formas de preservação das amostras

Em relação a comparação das três formas de acondicionamento das amostras por 7 dias no nitrogênio líquido, RNA *later* ou freezer -80°C , não foi observado diferenças significativas entre os métodos em relação a concentração de RNA das amostras. O quadro 4 mostra a variação da concentração de RNA das amostras armazenadas pelas três formas nas três repetições do experimento, independente da forma de extração.

Quadro 4 - Variação da concentração de RNA (ng/ μl) das amostras obtidas nas três alimentações artificiais e armazenadas pelas três formas.

Forma de preservação	Variação da concentração de RNA (ng/ μl) das amostras
- 80°C	8 - 1153,6
RNA <i>later</i> a -20°C	4,7 – 11118,6
Nitrogênio Líquido	11,8 – 9008,2

Fonte: O autor

8.5 Comparação das três formas de extração de RNA

Através das análises das três formas de extração de RNA, após tratamento com DNase e quantificação das amostras, verificamos que as mais altas concentrações de RNA encontradas nos extraídos de mosquitos infectados com DENV-2 das três alimentações artificiais correspondem ao método Chomczynski-Sacchi. As amostras extraídas por este método, após quantificação, apresentaram concentrações entre 307,2 e 1949,9 ng/ μl na primeira alimentação; 148,8 e 11118,6 ng/ μl na segunda infecção e 150,1 e 10772,1 ng/ μl na terceira infecção.

O método de extração por TRIzol® (Invitrogen) apresentou concentrações variando de 88,1 a 579,1 ng/ μl na primeira infecção, 218,5 e 707,5 ng/ μl na segunda infecção e 105,3 e 918,2 na terceira infecção. O método de extração de RNA pelo *RNeasy Mini Kit* da QIAGEN® apresentou os piores resultados em relação a concentração de RNA das amostras extraídas pelo método, onde as concentrações variaram de 4,7 a 49,7 ng/ μl na primeira infecção, 8,3 e 83,4 ng/ μl na segunda infecção e 9,6 e 167,6 ng/ μl na terceira infecção. O

quadro 5 mostra a variação das concentrações de RNA (ng/μl) das amostras obtidas nas três alimentações artificiais e extraídas pelas diferentes formas de extração.

Quadro 5 - Variação da concentração de RNA (ng/μl) das amostras obtidas nas três alimentações artificiais e extraídas pelas três formas

Forma de extração	Variação da concentração de RNA (ng/μl) das amostras
Chomczynski-Sacchi	148,8 - 11118,6
TRIzol® (Invitrogen)	88,1 - 918,2
RNeasy Mini Kit da QIAGEN®	4,7 - 167,6

Fonte: O autor

Em relação a pureza do RNA obtido (qualidade) pelas diferentes formas de extração, o método que resultou no RNA com maior grau de pureza, ou seja, um maior número de amostras com valores entre 1,75 e 2 na razão 260/280 nm, antes e após tratamento com DNase, foram as extrações pelos métodos de TRIzol® e Chomczynski-Sacchi. As amostras que apresentavam RNA com menor grau de pureza foram obtidas pelo kit *RNeasy* da QIAGEN®.

Na primeira alimentação artificial: 72,2% das amostras extraídas por Trizol apresentaram um grau de pureza satisfatório antes do tratamento com DNase e 100% após tratamento com DNase; das amostras extraídas pelo kit RNeasy, 0% antes do tratamento e 61,1% após o tratamento; e as amostras extraídas pela técnica Chomczynski-Sacchi, 50% antes do tratamento e 44,4 % após. Na segunda alimentação artificial: 72,2% das amostras extraídas por Trizol apresentavam razão 260/280 nm entre 1,75 e 2 antes do tratamento com DNase e a mesma porcentagem após tratamento com DNase; das amostras extraídas pelo kit RNeasy, 77,7% antes do tratamento e após o tratamento; e as amostras extraídas pelo pela técnica Chomczynski-Sacchi, 72,2% antes do tratamento e 33,3 % após. Na terceira alimentação artificial: 45,8% das amostras extraídas por Trizol apresentavam razão 260/280 nm entre 1,75 e 2 antes do tratamento com DNase e 79,1% após tratamento com DNase; das amostras extraídas pelo kit RNeasy, 0% antes do tratamento e 8,3% após o tratamento; e as amostras extraídas pela técnica de Chomczynski-Sacchi, 58,3% antes do tratamento e 70,8 % após o tratamento com DNase. O quadro 6 mostra a média da porcentagem das amostras obtidas nas três alimentações artificiais que apresentaram RNA com razão 260/280 nm entre 1,75 e 2 antes e após o tratamento com DNase.

Quadro 6 - Porcentagem das amostras obtidas nas três alimentações artificiais, extraídas pelas três formas de extração com razão 260/280 nm entre 1,75 e 2 (grau de pureza) antes e após o tratamento com DNase.

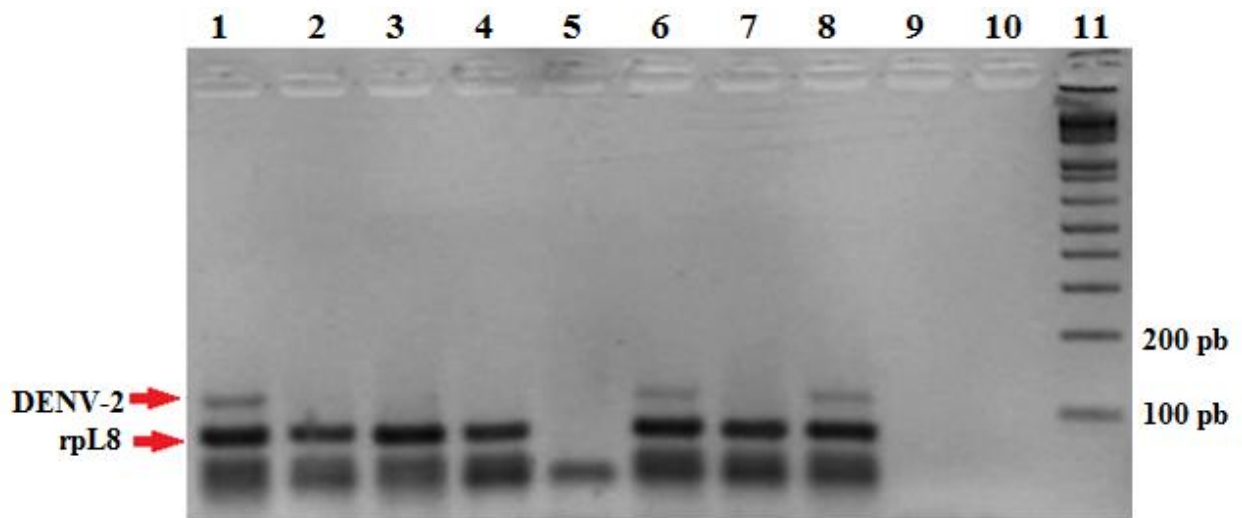
Formas de extração	% das amostras com razão 260/280 nm entre 1,75 e 2	
	Antes do tratamento com DNase	Após tratamento com DNase
Chomczynski-Sacchi	60,1	49,5
TRIzol® (Invitrogen)	63,4	83,7
RNeasy Mini Kit da QIAGEN®	25,9	49

Fonte: O autor

Nas reações de RT-PCR *Multiplex* sempre eram utilizados um controle negativo (água ultra-pura no lugar de RNA molde) e um controle positivo DENV-2 (RNA de DENV-2 previamente isolado em laboratório). Após eletroforese de todas as amostras (60 pools de mosquitos) das três infecções extraídas pelas diferentes formas, foi possível verificar a banda do rpL8 no gel de agarose 2,5% em 36 pools de mosquitos infectados e não infectados. O controle positivo (DENV-2) amplificou em todas as reações e não houve amplificação do controle negativo (água) em nenhuma das reações, como esperado.

Nenhuma amostra de mosquito alimentado com sangue não infectado apresentou a banda do DENV-2 no gel. Não foi possível visualizar a banda do DENV-2 em nenhuma das amostras de mosquitos infectados extraídas pelo kit *RNeasy* da QIAGEN®; de um total de 42 pools de mosquitos infectados por DENV-2 nas 3 infecções, foi observada a banda do DENV-2 em 8 pools extraídos pelo método do TRIzol®; e finalmente, pelo método Chomczynski-Sacchi (Figura 12), foi possível observar a banda do DENV-2 em 18 pools.

Figura 12- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas do rpL8 e do DENV-2 de algumas das amostras de mosquitos infectados com DENV-2 extraídas pelo método Chomczynski-Sacchi.



Fonte: O autor

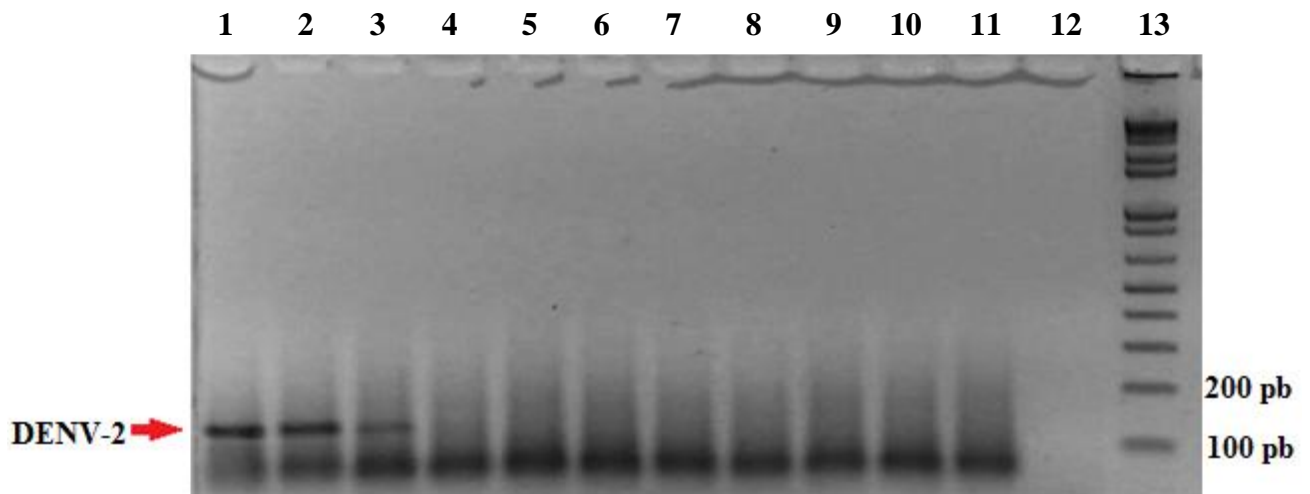
Legenda: 1, 6 e 8- amostras positivas para rpL8 e DENV-2 ; 2,3,4 e 7- amostras positivas para rpL8 e negativas para o DENV-2; 5 e 9 - amostras negativas para rpL8 e DENV-2, 10- controle negativo; 11- Marcador molecular 1kb Plus Ladder.

8.6 Ensaio para determinação do limiar de detecção do gene do controle endógeno (rpL8) e do DENV-2

No ensaio para determinação do limiar de detecção do DENV-2, uma amostra utilizada como controle positivo de DENV-2, com concentração de 545 ng/ μ l, foi submetida à diluição seriada até a concentração 10^{-10} da amostra e foi possível detectar a banda do DENV-2 até a diluição com concentração 10^{-2} (Figura 13), ou seja, até 5,45 ng/ μ l.

Através da fórmula de conversão das concentrações das amostras para cópias de moléculas por μ l, foi obtido o valor de $513,32 \times 10^{10}$ moléculas/ μ l na concentração inicial de DENV-2 e $513,32 \times 10^8$ moléculas/ μ l como limiar de detecção.

Figura 13- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas de uma amostra de controle positiva DENV-2 (com concentração 545 ng/ μ l) diluídos nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , respectivamente.



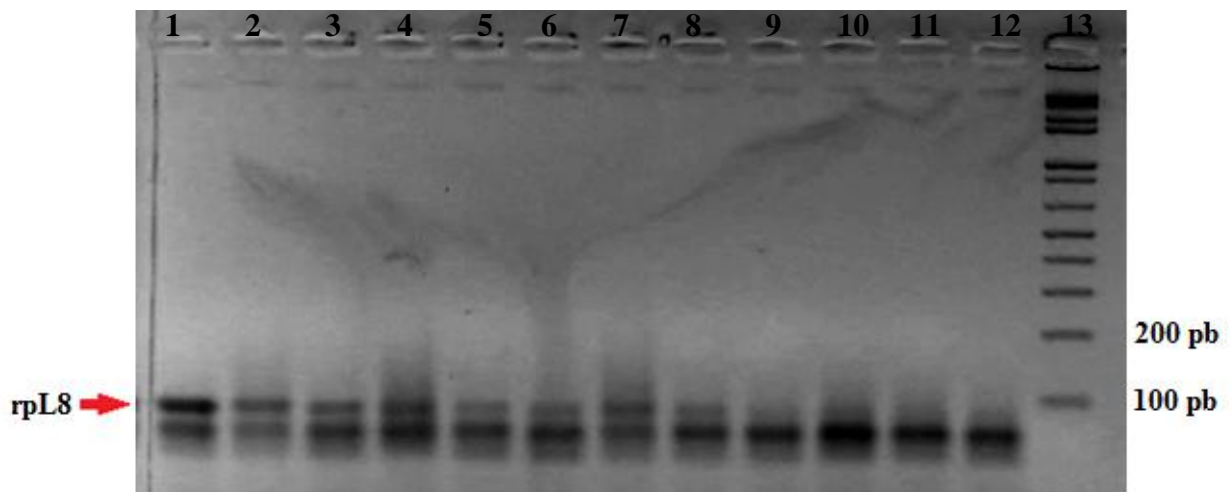
Fonte: O autor

Legenda: 1- amostra sem diluição positiva para DENV-2 ; 2 e 3- amostras diluídas positivas para DENV-2; 4 - 11 – amostras diluídas negativas para DENV-2; 12- controle negativo; 13 - Marcador molecular 1kb Plus Ladder.

No ensaio para determinação do limiar de detecção do controle endógeno (rpL8), foi utilizada uma amostra de 5 mosquitos não infectados por DENV-2, com concentração de 449,2 ng/ μ l, onde esta foi submetida à diluição seriada e foi possível detectar a banda do rpL8 até a diluição da concentração inicial a 10^{-7} (Figura 14), ou seja, até 44,92 (fentogramas) fg/ μ l.

Através da fórmula de conversão das concentrações das amostras para cópias de moléculas por μ l, foi obtido o valor de $994,18 \times 10^{10}$ moléculas/ μ l na concentração inicial de DENV-2 e $994,18 \times 10^3$ moléculas/ μ l como limiar de detecção.

Figura 14- Visualização do gel de agarose a 2,5% mostrando bandas do rpl8 de uma amostra de *pool* de 5 mosquitos (com concentração 449,2 ng/ μ l) diluídos nas concentrações de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , respectivamente.



Fonte: O autor

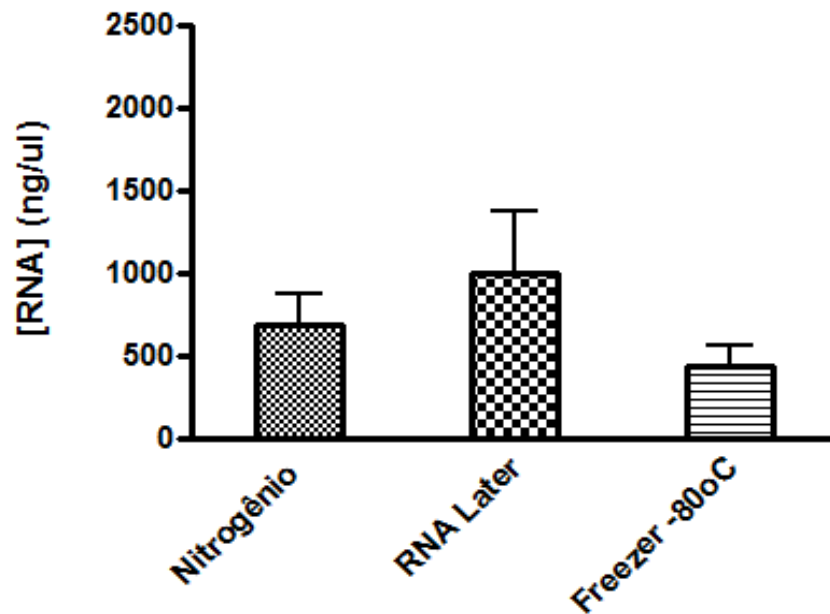
Legenda: 1- amostra sem diluição positiva para rpl8; 2-8- amostras diluídas positivas para rpl8; 9- 11- amostras diluídas negativas para rpl8; 12- controle negativo; 13- Marcador molecular 1kb Plus Ladder.

8.7 Análise estatística

Nas análises estatísticas feitas pelo software GraphPad Prism versão 4.00, foi realizada a comparação das concentrações de RNA das amostras que foram obtidas quando submetidas às diferentes formas de armazenamento e de extração de RNA nas três repetições dos experimentos. Foram utilizados os testes ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey para avaliar os resultados.

Em relação às formas de armazenamento, quando comparado as médias das concentrações de RNA das amostras armazenadas em RNA later, em freezer -80°C e em nitrogênio líquido pelo teste ANOVA, o resultado não foi estatisticamente significativo ($P=0,3581$), ou seja, não existe diferença na concentração de RNA quando comparamos os três métodos de armazenamento. Estes resultados estão apresentados no gráfico 1.

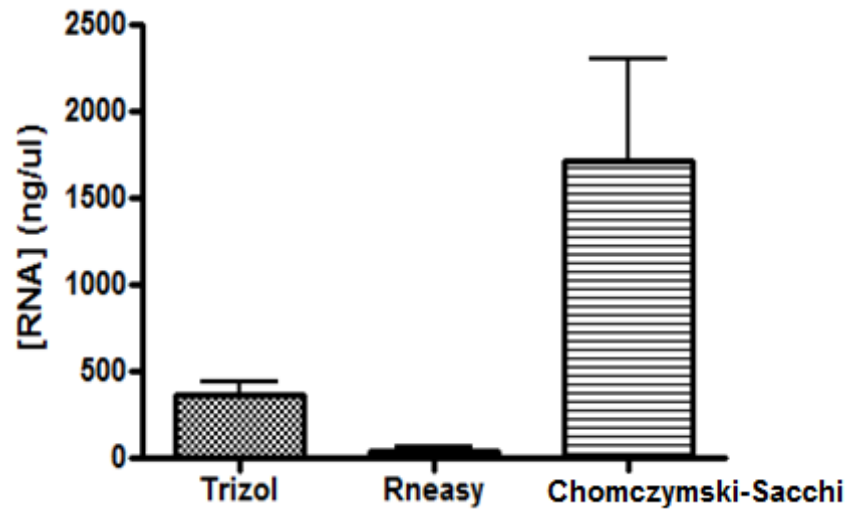
Gráfico 1 – Comparação das médias das concentrações de RNA (ng/μl) das amostras armazenadas por Nitrogênio líquido, em RNA later e em freezer -80°C e seus respectivos desvios padrões.



Fonte: O autor

Em relação às formas de extração, quando comparado as médias das concentrações de RNA das amostras extraídas por Trizol, kit RNeasy e pelo método Chomczynski-Sacchi, houve uma diferença estatisticamente significativa entre eles ($P = 0,0268$). Quando foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey, foi observado que esta diferença se deu pela concentração de RNA quando comparamos os métodos de extração por RNeasy e pela técnica de Chomczynski-Sacchi. Estes resultados estão mostrados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Comparação das médias das concentrações de RNA (ng/μl) das amostras extraídas por Trizol, Rneasy e Chomczynski-Sacchi e seus respectivos desvios padrões.



Fonte: O autor

9 DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada a adaptação do protocolo descrito por Lanciotti et al. (1992) para detecção de DENV em amostras biológicas. Este novo protocolo reduz a interpretação errônea de resultados, evitando falsos negativos, através da adição de um controle interno na reação de RT-PCR. Este protocolo foi validado, e sua sensibilidade foi avaliada frente a diferentes condições de extração e preservação do RNA.

O uso de um controle interno da qualidade do RNA (gene endógeno) se baseia na teoria de que estes genes são expressos de forma contínua e uniforme em todas as amostras biológicas que serão utilizadas para teste, assim é possível controlar possíveis variações e identificar possível degradação que ocorre devido a sua manipulação (MCNEILL; MILLER; KERIN, 2007). Estes genes são expressos em níveis relativamente altos em todas as células, possuem expressão estável quando submetido à diversas condições experimentais, e são ideais para serem usados como um controle positivo da amostra em uma reação de PCR quando o gene de interesse não é detectado (HUGGETT et al., 2005). No decurso dos experimentos, enquanto o gene de interesse é afetado, o controle endógeno deve mudar o mínimo possível para que este seja confiável (DEAN; GOODWIN; HSIANG, 2002). Bas et al. (2004) demonstraram a importância da escolha do gene de referência (controle endógeno), afirmando que se este gene for escolhido de forma errada, os resultados obtidos não serão confiáveis.

Diversos genes já foram utilizados como controle endógeno de mosquito na reação de PCR para verificar a qualidade do RNA de mosquitos coletados, como: gene da proteína ribossomal 49 (RP-49) de *Aedes aegypti* (OLIVEIRA et al., 2011b); gene da actina, (STALEY et al., 2010); gene da proteína ribossomal s17 (Rps17) (COOK et al., 2006; FRENTIU et al., 2014), entre outros.

O gene da proteína ribossomal L8 (rpl8) encontrado em mosquitos (LAN; FALLON, 1992) também foi muito utilizado como controle endógeno por vários autores, como: Magalhaes et al. (2008), que avaliaram a expressão temporal de defensinas, cecropin e transferrina em *Aedes aegypti* naturalmente refratário ao *Wuchereria bancrofti*; Albuquerque et al. (2011) que analisaram a prevalência de *Wolbachia pipientis* em *Aedes albopictus*; e Barbosa et al. (2016), através do estudo de vigilância de DENV em amostras de mosquitos coletados em Fernando de Noronha, Pernambuco. Estes estudos utilizaram *primers* que amplificam uma região de 122 pb do gene rpL8. O estudo desenvolvido por Carvalho-Leandro et al. (2012) também utilizou o gene rpL8 como controle endógeno da reação de PCR com amostras de *Aedes aegypti*, porém utilizando *primers* que amplificam uma região de

60 pb do gene, já o estudo de Wei et al. (2006) utilizou *primers* que amplificam uma região de 83 pb como controle interno de RNA da reação utilizando amostras de *Ae.albopictus*.

Na literatura, diversos estudos de detecção de DENV em mosquitos apresentam uma baixa taxa de infecção natural (CHUNG; PANG, 2002; LOURENCO-DE-OLIVEIRA et al., 2002; ZEIDLER et al., 2008), mas como observado neste estudo, estes resultados podem ser falsos negativos, pois não houve uso de um controle de RNA interno na reação, assim, não foi possível afirmar se os resultados negativos ocorreram devido à degradação do material genético ou não. A maioria dos trabalhos anteriores que realizam o monitoramento de patógenos circulantes em populações de vetores não utiliza este controle interno, portanto, é possível que as taxas de infecção descritas nestes trabalhos estejam subestimadas.

Para confirmar que os *primers* desenhados neste estudo realmente seriam ideais para serem utilizados como controle endógeno na reação de RT-PCR, foi feita a comparação da estabilidade dos mRNAs dos genes rpL8 e DENV. Nos testes de estabilidade dos mRNAs do nosso estudo, foi observado que a banda da região do rpL8 (80 pb) permanecia forte, mesmo quando submetida à degradação e foi possível detectar a banda no gel de agarose 2,5% quando a amostra era exposta até 14 horas à temperatura ambiente (25°C). Já a banda do DENV-2 (119 pb) ficou um pouco mais fraca à medida que era submetida à degradação mas, mesmo assim, também foi possível detectá-la quando a amostra foi exposta a até 14 horas à 25°C. Como foi possível detectar os dois genes (rpL8 e DENV-2) na mesma amostra quando estas eram submetidas à temperatura ambiente por 14 horas, independente das intensidades das bandas, concluímos que o gene rpL8 (constitutivo do mosquito) é mais estável que o DENV, mas isso não interfere na confiabilidade dos resultados.

Quando a amostra for submetida a até 14h à temperatura ambiente, pode-se afirmar que um resultado negativo para DENV é verdadeiramente negativo se ocorrer a amplificação do fragmento do gene rpL8, ou seja, enquanto houver amplificação do rpL8 no gel significa que, se o vírus realmente estiver presente na amostra, ele não se degradou. Desta forma, os *primers* desenhados neste estudo foram adequados para atuarem com um controle endógeno da reação de RT-PCR *Multiplex* para dengue em mosquitos. Porém, como foi revelado neste estudo, o poder de detecção do DENV pela RT-PCR é muito baixo, ou seja, pode ser que devido à baixa concentração de RNA do vírus na amostra não seja possível detectá-lo através da técnica, desta forma, poderia ser necessário o uso da RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), pois esta é mais sensível que a RT-PCR convencional (DE OLIVEIRA POERSCH et al., 2005) e permite a quantificação da carga viral por comparação com uma curva padrão

(NIESTERS, 2002). Desta forma é possível que o DENV fosse detectado quando este estivesse em uma concentração abaixo do limiar de detecção da RT-PCR convencional.

Nos ensaios para determinação do limiar de detecção do DENV-2 e do gene rpL8 foi possível observar que a banda do rpL8 no gel de agarose era detectada em diluições bem menores que o DENV. O rpL8 foi detectado após 7 diluições e o DENV-2 foi detectado pela última vez após 2 diluições. Este fato pode ter ocorrido, pois o número de cópias do RNA do gene estrutural (rpL8) do mosquito, em uma amostra de cinco mosquitos infectados, é maior que a do RNA viral presente na mesma amostra.

Trabalhar com RNA requer uma atenção especial pois ele se degrada mais facilmente que DNA, apresenta instabilidade química e quando é manipulado em laboratórios entra em contato com RNAses que comprometem a sua qualidade (HERNANDEZ; MONDALA; HEAD, 2009). O RNA pode ser degradado devido a várias condições e reações em que é submetido, por isso, deve ser armazenado da forma correta para que sua integridade não seja afetada (FABRE et al., 2014).

As condições de trabalho em campo para coleta de mosquitos algumas vezes dificulta a boa preservação do material genético das amostras. Nem sempre o pessoal que trabalha com coleta de mosquitos apresenta boa qualificação ou recebe treinamento adequado e isto pode resultar em amostras mal acondicionadas, comprometendo a qualidade do material genético presente nos mosquitos e conseqüentemente, os resultados do diagnóstico (BARBOSA et al., 2016). As amostras ainda podem ser afetadas negativamente pelo transporte do campo para o laboratório, pois elas podem ser mal acondicionadas, com pouca refrigeração, ou o tempo de transporte pode ser longo, o que também pode influenciar na integridade destas amostras.

As formas mais comuns de armazenamento de amostras para posterior análise molecular é o congelamento (-20°C, -80°C ou em nitrogênio líquido) em soluções livres de RNase, onde as amostras são descongeladas em gelo quando forem utilizadas (HERNANDEZ; MONDALA; HEAD, 2009). A solução de RNAlater® (Ambion/ABI, Foster City, CA), disponível comercialmente, também é utilizado para preservar o RNA de tecido e células em baixas temperaturas a longo prazo (MUTTER et al., 2004) ou, segundo as instruções do fabricante, em temperatura ambiente (18-25°C) por até 7 dias ou mantidas a 4°C por até um mês. Na avaliação das formas de armazenamento e extração das amostras de mosquitos infectados no nosso estudo, foi verificado se cada um dos processos avaliados interferia na qualidade final do material genético da amostra, ou seja, qual a forma de armazenamento e de extração que menos degrada a amostra e que mantém a integridade do seu RNA.

Em relação ao armazenamento das amostras por 7 dias em RNAlater a -20°C , em freezer -80°C e em nitrogênio líquido, os resultados não apresentaram diferenças significativas em relação à qualidade do RNA para as três formas de armazenamento analisadas. O estudo realizado por Auer (2014) comparou o efeito de tecidos humanos armazenados em freezers -80°C e em nitrogênio líquido a longo prazo (até 12 anos) na integridade do RNA e de proteínas e concluiu que o armazenamento de amostras por mais de 5 anos das duas formas preserva a qualidade do RNA e de proteínas igualmente, mas em relação ao rendimento do RNA, o armazenamento das amostras a -80°C obteve melhores resultados. Gorokhova et al. (2005) em seu estudo, verificaram que amostras de microcrustáceos em RNAlater podem ter seu RNA preservado da mesma forma por 1 mês em temperatura ambiente e em até 4 semanas em 5°C .

Grotzer et al. (2000) avaliaram a qualidade do RNA de tecido tumoral quando submetido por 7 dias em RNAlater à temperatura ambiente e em freezer -70°C e não observaram diferenças significativas em relação à integridade do RNA entre as duas formas de armazenamento, assim como observado em nosso estudo, porém, o autor afirma que a degradação de RNA também depende do conteúdo de RNase da amostra em que se trabalha. Kasahara et al. (2006) observaram que amostras congeladas armazenadas em RNAlater apresentaram menos degradação que aquelas congeladas sem RNAlater e concluiu que a degradação do RNA é mais dependente do tempo de descongelamento do que o de armazenamento, pois segundo o fabricante, amostras com RNAlater podem ser congeladas e descongeladas por até 10 vezes sem comprometer a qualidade da amostra. Segundo o mesmo autor, amostras em RNAlater se mantêm estáveis por até 1 ano quando armazenadas a -20°C . O nosso estudo avaliou as amostras armazenadas nas diferentes formas apenas por 7 dias, este tempo pode ter sido pouco para observar diferenças significativas na qualidade do RNA das amostras.

Em relação às formas de extração de RNA avaliadas (Chomczynski-Sacchi, TRIzol® e RNeasy Mini Kit), foi observado que o método Chomczynski-Sacchi obteve os melhores resultados. Noriega et al. (1993), obtiveram resultados promissores com a extração de RNA de mosquitos alimentados pelo método Chomczynski-Sacchi, afirmando que a técnica possui capacidade de remover quase todas as proteínas das amostras, é rápida e mantém a integridade do RNA. Dettogni e Louro (2011) compararam a técnica de extração pela técnica Chomczynski-Sacchi e pelo kit de extração viral QIAamp® UltraSens em amostras de humanos com dengue e observaram que as amostras extraídas pela técnica Chomczynski-Sacchi apresentavam maior quantidade de RNA que as amostras extraídas pelo kit de

extração, assim como foi encontrado em nosso estudo. Segundo os mesmo autores, o método Chomczynski-Sacchi tem a vantagem de ser mais sensível e apresentar menor custo, mas como desvantagem, requer mais tempo que o método de extração pelo kit, no entanto, considerando que a doença é mais comum em países em desenvolvimento, o custo tem prioridade na escolha no método.

O estudo realizado por Ridgeway e Timm (2014) comparou os métodos de extração pelo kit RNeasy, pelo Trizol e por mais duas outras técnicas em amostras de larvas de insetos, e ao contrário dos nossos resultados, os autores observaram diferenças entre as técnicas apenas na qualidade do RNA mas não na quantidade, e relataram que as amostras extraídas pelo kit RNeasy apresentavam RNA com melhor qualidade que aquelas extraídas pelo Trizol, onde houve degradação de parte do RNA. Esta degradação de parte do RNA da amostra pode ter ocorrido devido ao resíduo de fenol usado na extração por Trizol. De Paula et al. (2001) também obtiveram resultados diferentes dos nossos quando comparou a extração de RNA pelo Trizol, pela técnica Chomczynski-Sacchi e o kit de extração viral QIAamp® para diagnóstico de dengue em amostras humanas. Segundo o autor, o método de extração viral pelo kit apresentou melhores resultados que as demais técnicas. Nosso estudo não utilizou o kit de extração viral QIAamp® nas análises, apesar de vários estudos descritos na literatura terem utilizado o kit para detecção de DENV em mosquitos (CASTRO et al., 2012; DE FIGUEIREDO et al., 2010; DE PAULA et al., 2001; FRENTIU et al., 2014). O motivo pelo qual não utilizamos este kit foi que este apenas extrai o RNA viral e o nosso objetivo era detectar o RNA viral junto com o RNA do mosquito.

Nos experimentos descritos no presente trabalho, sempre foram usados controles negativos para o vírus, que são amostras de mosquitos alimentados com sangue não infectado durante a alimentação artificial. Em todas as reações foi possível observar que a banda do DENV-2 não foi amplificada nestes controles negativos, somente a banda do rpL8 teve amplificação, como esperado, já que são amostras de mosquitos.

Os controles positivos DENV-2 utilizados na RT-PCR amplificaram em todas as reações e a maior parte das amostras de mosquitos amplificaram a banda do rpL8, mostrando que a técnica de RT-PCR é bastante sensível. Quanto às amostras de mosquitos alimentados com DENV-2, a amplificação dependia da forma de extração que era utilizada, o método Chomczynski-Sacchi de extração, como já citado, foi o que mais obteve amostras positivas para DENV-2 no gel de agarose, porém, nem todas as amostras de mosquitos alimentadas com o vírus apresentaram a banda do DENV-2 no gel. Este fato ocorre porque cada mosquito presente no *pool* pode ter ingerido quantidades diferentes de sangue, consequentemente,

quantidades diferentes de vírus, assim cada *pool* teria uma quantidade diferente de RNA viral. Outra provável explicação para este fato seria a competência vetorial do mosquito, ou seja, a habilidade que cada mosquito possui de se infectar pelo vírus, permitindo que o vírus se replique e transmita o vírus para outro hospedeiro (BENNETT et al., 2002). Esta competência vetorial foi estudada no trabalho de Moura et al. (2015), através da análise da população de *Aedes aegypti* da Ilha de Santiago, Cabo Verde; Richard et al. (2012), em populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* da Flórida, EUA; Poole-Smith et al. (2015), em *Aedes mediovittatus* e *Aedes aegypti* do Caribe; entre vários outros estudos.

O nosso estudo destacou a importância do desenvolvimento de um método mais eficaz e confiável para detecção de DENV em mosquitos, onde os resultados falso-negativos são evitados consideravelmente. A técnica de RT-PCR Multiplex *one-step* foi aperfeiçoada de maneira que, além de detectar o sorotipo DENV presente na amostra, também detecta o gene constitutivo do mosquito rpL8, através de *primers* que amplificam uma região de 80 pb deste gene, confirmando assim a qualidade e integridade do RNA após o processamento. Este foi o primeiro estudo que realizou a detecção de um gene constitutivo de mosquito (controle endógeno) e dos quatro sorotipos DENV em uma mesma reação de RT-PCR *Multiplex* em amostras de *Aedes aegypti*. Além da otimização da técnica, também foi feita a comparação das formas mais comuns de preservação do material genético (RNAlater, freezer -80°C e Nitrogênio líquido) e das técnicas de três formas de extração de RNA (Trizol, kit RNeasy e Chomczynski-Sacchi), buscando detectar os procedimentos que apresentam melhor desempenho na detecção de DENV em mosquitos.

Sendo assim, o desenvolvimento de protocolos otimizados e confiáveis que garantam a qualidade das amostras será importante para o uso do xenomonitoramento para vigilância de vírus em populações de mosquitos vetores num futuro próximo. Desta forma, será possível realizar a detecção precoce de ameaças biológicas à saúde humana e animal de forma efetiva e confiável.

10 CONCLUSÕES

- a) O par de *primers* que detecta uma região de 80 pb do rpL8 funcionou bem como controle endógeno na reação de RT-PCR Multiplex de detecção de DENV;
- b) A técnica otimizada neste estudo aumentou a confiabilidade nos resultados, evitando os possíveis resultados falso-negativos devido à degradação do material genético da amostra;
- c) Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados na comparação de formas de armazenamento de amostras por 7 dias;
- d) O protocolo de extração descrito por Chomczynski-Sacchi obteve melhor desempenho, recuperando maior quantidade de RNA;
- e) A técnica do reagente Trizol recuperou menos RNA que a técnica Chomczynski-Sacchi, porém com melhor qualidade;
- f) O kit de extração RNeasy obteve o pior desempenho quando comparado com as demais técnicas e deve ser evitado para estudos de detecção de vírus.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, C. H. M. et al. Potencialidades do *Aedes albopictus* como vetor de arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária. Rev. APS., Juiz de Fora, v. 11, p. 459-467, 2008.
- ALVAREZ, M. et al. Secuenciación directa a partir de un producto de PCR de una muestra de suero de la epidemia de FHD de 1981. Rev. Cub. Med. Trop., La Habana, v. 48, 1996.
- AMARASINGHE, A. et al. Dengue virus infection in Africa. Emerg. Infect. Dis., Atlanta, v. 17, n. 8, p. 1349-1354, 2011.
- ANEZ, G.; RIOS, M. Dengue in the United States of America: a worsening scenario? Biomed. Res. Int., New York, v. 2013, p. 678645, 2013.
- AUER, H. et al. The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. Biotech. Histochem., Baltimore, v. 89, n. 7, p. 518-528, 2014.
- BANGS, M. J.; PUDIANTARI, R.; GIONAR, Y. R. Persistence of dengue virus RNA in dried *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) exposed to natural tropical conditions. J. Med. Entomol., Oxford, v. 44, n. 1, p. 163-167, 2007.
- BARATA, E. A. et al. [*Aedes aegypti* (L.) population in an endemic area of dengue in Southeast Brazil]. Rev. Saude Publica, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 237-242, 2001.
- BARBOSA, P. P. et al. Vector surveillance for Dengue virus detection in the archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. J. Med. Entomol., Annapolis, 2016. No prelo.
- BAS, A. et al. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. Scand. J. Immunol., Oxford, v. 59, n. 6, p. 566-573, 2004.
- BENNETT, K. E. et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 67, n. 1, p. 85-92, 2002.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. Nature, London, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BLACK, W. C. T. et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. Arch. Med. Res., Mexico, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.
- BOUZID, M. et al. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: case study of dengue fever. BMC Public Health, London, v. 14, p. 781, 2014.
- BOYACÁ. Secretaria de Salud. Cómo prevenir y controlar el dengue. Tunja, [2013?]. Disponível em: < <http://hospitalcubara.gov.co/como-prevenir-y-controlar-el-dengue/>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: Surveillance, Resistance, Monitoring, and Control Alternatives in Brazil. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 16, p. 295-302, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, DF, 2009. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. In: SAÚDE, S. D. V. E. (Ed.). Brasília, DF, 2014.
- BROWN, J. E. et al. Phylogeography and spatio-temporal genetic variation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations in the Florida Keys. J. Med. Entomol., Oxford, v. 50, n. 2, p. 294-299, 2013.
- CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. Lancet, New York, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014.
- CARVALHO-LEANDRO, D. et al. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. Acta Trop., Amsterdam, v. 124, n. 2, p. 113-119, 2012.
- CASTRO, M. G. et al. Dengue virus type 4 in Niteroi, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 107, n. 7, p. 940-945, 2012.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., New York, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.
- CHOW, V. T. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v. 58, n. 5, p. 578-586, 1998.
- CHUNG, Y. K.; PANG, F. Y. Dengue virus infection rate in field populations of female *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Singapore. Trop. Med. Int. Health, Oxford, v. 7, n. 4, p. 322-330, 2002.
- CLARK, G. G. Situación epidemiológica del dengue en América: desafíos para su vigilancia y control. Salud Publica Mex., Morelos, v. 37, p. 5-11, 1995.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. D. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Brasil, 1994.
- COOK, P. E. et al. The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, Atlanta, v. 103, n. 48, p. 18060-18065, 2006.
- COSTA, C. A.; SANTOS, I. G.; BARBOSA, M. G. [Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 677-681, 2009.

DA COSTA, V. G. et al. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: a meta-analysis of randomized trials. Vaccine, Amsterdam, v. 32, n. 39, p. 4885-4892, 2014.

DA MOURA, A. J. et al. Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. Parasit. Vectors, London, v. 8, p. 114, 2015.

DALLA BONA, A. C.; TWERDOCHLIB, A. L.; NAVARRO-SILVA, M. A. Detecção do vírus da dengue em populações naturais de mosquitos. Bol. malariol. salud ambient, Maracay, v. LI, n. 2, 2011.

DE ALBUQUERQUE, A. L.; MAGALHAES, T.; AYRES, C. F. High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 106, n. 6, p. 773-776, 2011.

DE FIGUEIREDO, M. L. et al. Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. Viol. J., London, v. 7, p. 152, 2010.

DE OLIVEIRA POERSCH, C. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. J. Clin. Virol., Amsterdam, v. 32, n. 4, p. 272-277, 2005.

DE PAULA, S. O.; FONSECA, B. A. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. Braz. J. Infect. Dis., Salvador, v. 8, n. 6, p. 390-398, 2004.

DE PAULA, S. O. et al. Comparison of techniques for extracting viral RNA from isolation-negative serum for dengue diagnosis by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods, Amsterdam, v. 98, n. 2, p. 119-125, 2001.

DEAN, J. D.; GOODWIN, P. H.; HSIANG, T. Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of beta-1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*. Plant Mol. Biol. Rep., New York, v. 20, n. 4, p. 347-356, 2002.

DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Dengue virus RNA purification from human plasma: a comparison of two techniques. Mol. Biol. Rep., Dordrecht, v. 38, n. 8, p. 4979-4983, 2011.

DEUBEL, V.; KINNEY, R. M.; TRENT, D. W. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. Virology, New York, v. 165, n. 1, p. 234-244, 1988.

DONALÍSIO, M. R.; GLASSER, C. M. Vigilância entomológica e controle de vetores do Dengue. Rev. Bras. Epidemiol, São Paulo, v. 5, n. 3, 2002.

EIRAS, Á. E. Culicidae. In: NEVES, D. P. (Coord.). Parasitologia humana. 11. ed. Rio de Janeiro, 2005.

EISEN, L. et al. Proactive vector control strategies and improved monitoring and evaluation practices for dengue prevention. J. Med. Entomol., Honolulu, v. 46, p. 1245-1255, 2009.

FABRE, A. L. et al. An efficient method for long-term room temperature storage of RNA. Eur. J. Hum. Genet., London, v. 22, n. 3, p. 379-385, 2014.

FOX, A. et al. Immunological and Viral Determinants of Dengue Severity in Hospitalized Adults in Ha Noi, Viet Nam. Plos negl. trop. dis., San Francisco, v. 5, n. 3, 2011.

FRENTIU, F. D. et al. Limited dengue virus replication in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia*. Plos negl. trop. dis., San Francisco, v. 8, n. 2, p. e2688, 2014.

GIJAVANEKAR, C. et al. PCR detection of nearly any dengue virus strain using a highly sensitive primer 'cocktail'. FEBS J, Oxford, v. 278, n. 10, p. 1676-1687, 2011.

GJENERO-MARGAN, I. et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. Euro Surveill., Saint-Maurice, v. 16, n. 9, 2011.

GOMES, A. C. Vigilância Entomológica. Inf. epidemiol. SUS., Brasília, v. 11, n.3, p. 79 – 90, 2002.

GOROKHOVA, E. Effects of preservation and storage of microcrustaceans in RNAlater on RNA and DNA degradation. Limnol. Oceanogr., Salt Lake City, v. 3, n. 2, p. 143-148, 2005.

GROTZER, M. A. et al. Biological stability of RNA isolated from RNAlater-treated brain tumor and neuroblastoma xenografts. Med. pediatr. oncol., New York, v. 34, n. 6, p. 438-442, 2000.

GUBLER, D. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Clin. Microbiol. Rev., v. 11, n. 3, p. 480-496, 1997.

GUBLER, D. J. Vigilancia activa del dengue y de la fiebre hemorragica del dengue / Active surveillance for dengue and dengue hemorrhagic fever. Bol. Oficina Sanit. Panam., Washington; v. 107,n.1, p. 22-30, 1989.

_____. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. Trop. Med. Health, Nagasaki, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011. Suplemento

GUBLER, D. J.; ROSEN, L. A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v. 25, n. 1, p. 146-150, 1976.

GUEDES, D. R. et al. Patient-based dengue virus surveillance in *Aedes aegypti* from Recife, Brazil. J. Vector Borne Dis., Delhi, v. 47, n. 2, p. 67-75, 2010.

GUEDES, D. R. D. Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* de Pernambuco. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, 2012.

GUY, B. et al. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. Vaccine, Kidlington, v. 33, n. 50, p. 7100-7111, 2015.

GUZMAN, A.; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. Int. j. antimicrob. agents., Amsterdam, v. 36, p. S40-S42, 2010.

GUZMAN, M. G.; GARCIA, G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever: research priorities. Ver. Panam. Salud Publica, Washington, v. 19, n. 3, p. 204-215, 2006.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nat. Ver. Microbiol., London, v. 8, n. 12, p. S7-16, 2010. Suplemento

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., Washington, v. 3, n. 6, p. 621-627, 1996.

_____. Dengue diagnosis, advances and challenges. Int. J. Infect. Dis., Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, 2004.

HALL-MENDELIN, S. et al. Detection of arboviruses and other micro-organisms in experimentally infected mosquitoes using massively parallel sequencing. PLoS ONE., San Francisco, v. 8, n. 2, p. e58026, 2013.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular-Biology. Science, Washington, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HARRIS, C. L. et al. Polymerase chain displacement reaction. Biotechniques, Natick, v. 54, n. 2, p. 93-97, 2013.

HARRIS, E. et al. Molecular biology of flaviviruses. Novartis Found Symp, v. 277, p. 23-39; discussion 40, 71-23, 251-253, 2006.

HARRIS, E. et al. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 36, n. 9, p. 2634-2639, 1998.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. Clin. Microbiol. Rev., Washington, v. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HERNANDEZ, G. E.; MONDALA, T. S.; HEAD, S. R. Assessing a novel room-temperature RNA storage medium for compatibility in microarray gene expression analysis. Biotechniques, Natick, v. 47, n. 2, p. 667-668, 670, 2009.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun., Basingstoke, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. J. Clin. Microbiol., Washington, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, 2005.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg., Baltimore, v. 67, n. 2, p. 158-161, 2002.

KAO, C. L. et al. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. J. Microbiol. Immunol. Infect., Hong Kong, v. 38, n. 1, p. 5-16, 2005.

KASAHARA, T. et al. Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. J. toxicol. sci., Sapporo, v. 31, n. 5, p. 509-519, 2006.

KOW, C. Y.; KOON, L. L.; YIN, P. F. Detection of dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR. J. med. entomol., Honolulu, v. 38, n. 4, p. 475-479, 2001.

KRIEG, P. A. Improved synthesis of full-length RNA probe at reduced incubation temperatures. Nucleic Acids Res., London, v. 18, n. 21, p. 6463, 1990.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. Clin. microbiol. ver., Washington, v. 18, n. 4, p. 608-637, 2005.

LA RUCHE, G. et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. Euro surveill., Saint-Maurice, v. 15, n. 39, p. 19676, 2010.

LAN, Q.; FALLON, A. M. Sequence analysis of a mosquito ribosomal protein rpL8 gene and its upstream regulatory region. Insect mol. biol., Oxford, v. 1, n. 2, p. 71-80, 1992.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. clin. microbiol., Whashington, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. J. virol., Whashington, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, 1999.

LI, M. I. et al. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. Plos negl. trop. dis., San Francisco, v. 6, n. 8, p. e1792, 2012.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. J. infect. dis., Chicago, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.

LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguacu, State of Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 799-800, 2002.

MAGALHAES, T. et al. Expression of defensin, cecropin, and transferrin in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) infected with *Wuchereria bancrofti* (Spirurida: Onchocercidae), and the abnormal development of nematodes in the mosquito. Exp. parasitol., New York, v. 120, n. 4, p. 364-371, 2008.

MCBRIDE, W. J. H. et al. Determinants of dengue 2 infection among residents of Charters Towers, Queensland, Australia. Am. j. epidemiol., Baltimore, v. 148, n. 11, p. 1111-1116, 1998.

MCNEILL, R. E.; MILLER, N.; KERIN, M. J. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. BMC mol. biol., London, v. 8, p. 107, 2007.

MELO, K. M. S. Desenvolvimento e validação de insumos para diagnóstico de infecções pelo vírus da dengue. 2012. (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Departamento de Saúde coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2012.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. Trends microbiol., Cambridge, v. 22, n. 3, p. 138-146, 2014.

MISHRA, B. et al. Clinical Applicability of Single-Tube Multiplex Reverse-Transcriptase PCR in Dengue Virus Diagnosis and Serotyping. J. clin. lab. anal., New York, v. 25, n. 2, p. 76-78, 2011.

MUTTER, G. L. et al. Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. BMC genomics., London, v. 5, p. 88, 2004.

NIESTERS, H. G. Clinical virology in real time. J. clin. virol., Amsterdam, v. 25 Suppl 3, p. S3-12, 2002.

NORIEGA, F. G.; WELLS, M. A. A comparison of three methods for isolating RNA from mosquitoes. Insect mol. biol., Oxford, v. 2, n. 1, p. 21-24, 1993.

OLIVEIRA, A. S. et al. Dignóstico laboratorial da dengue: Situação atual e perspectivas. Rev. bras. anal. clin., Rio de Janeiro, v. 43, p. 125-130, 2011a.

OLIVEIRA, J. H. et al. Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota. PloS pathog., San Francisco, v. 7, n. 3, p. e1001320, 2011b.

OOI, E. E.; GUBLER, D. J. Dengue in Southeast Asia: epidemiological characteristics and strategic challenges in disease prevention. Cad. saúde pública., Rio de Janeiro, v. 25 Supl. 1, p. S115-124, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control, Geneva, 2009.

_____. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Geneva, 2010.

_____. Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever. Geneva, 2011.

_____. Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020. Geneva, 2012.

_____. Dengue and severe dengue. Geneva. 2016.

_____. Dengue and severe dengue. Geneva, 2015.

PAUPY, C. et al. Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes infect., Paris, v. 11, n. 14-15, p. 1177-1185, 2009.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. Curr. opin. microbiol., New York, v. 11, n. 4, p. 369-377, 2008.

POK, K. Y. et al. Evaluation of Nonstructural 1 Antigen Assays for the Diagnosis and Surveillance of Dengue in Singapore. Vector borne zoonotic dis., Larchmont, v. 10, n. 10, p. 1009-1016, 2010.

POOLE-SMITH, B. K. et al. Comparison of Vector Competence of Aedes mediovittatus and Aedes aegypti for Dengue Virus: Implications for Dengue Control in the Caribbean. Plos negl. trop. dis., San Francisco, v. 9, n. 2, 2015.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of Aedes aegypti - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 108, p. 11-17, 2013.

RADKE, E. G. et al. Dengue outbreak in Key West, Florida, USA, 2009. Emerg. infect. dis., Atlanta, v. 18, n. 1, p. 135-137, 2012.

RICHARDS, S. L.; ANDERSON, S. L.; ALTO, B. W. Vector competence of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) for dengue virus in the Florida Keys. J. med. entomol., Honolulu, v. 49, n. 4, p. 942-946, 2012.

RIDGEWAY, J. A.; TIMM, A. E. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. J. insect sci., Tucson, v. 14, 2014.

RIGAU-PEREZ, J. G. Surveillance for an emerging disease: dengue hemorrhagic fever in Puerto Rico, 1988-1997. Puerto Rico Association of Epidemiologists. P. R. health sci. j., San Juan, v. 18, n. 4, p. 337-345, 1999.

ROSEN, L. Sur le mechanism de la transmission verticale du virus de la dengue chez les moustiques. C. R. Acad. Sci., Paris, v. 304, p. 347-350, 1987.

SAN MARTIN, J. L. et al. The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. Am. j. trop. med. hyg., Baltimore, v. 82, n. 1, p. 128-135, 2010.

SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; VAN BORTEL, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. Clin. microbiol. infect., Oxford, v. 19, n. 8, p. 685-692, 2013.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. Nat. rev. immunol., London, v. 15, n. 12, p. 745-759, 2015.

SEYLER, T. et al. Assessing the risk of importing dengue and chikungunya viruses to the European Union. Epidemics, v. 1, n. 3, p. 175-184, 2009.

SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity and Prevention., Manila, 1926.

SINGHI, S.; KISSOON, N.; BANSAL, A. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. J. pediatr., Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. S22-35, 2007. Suplemento

STALEY, M. et al. Universal primers for the amplification and sequence analysis of actin-1 from diverse mosquito species. J. Am. Mosq. Control Assoc., Fresno CA, v. 26, n. 2, p. 214-218, 2010.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. Expert rev. ant. infect. ther., London, v. 10, n. 8, p. 895-907, 2012.

TAPIA-CONYER, R.; BETANCOURT-CRAVIOTO, M.; MENDEZ-GALVAN, J. Dengue: an escalating public health problem in Latin America. Paediatr Int Child Health, London, v. 32 Suppl 1, p. 14-17, 2012.

TAUIL, P. L. [Urbanization and dengue ecology]. Cad. saúde pública, Rio de Janeiro, v. 17, p. 99-102, 2001. Suplemento

_____. [Critical aspects of dengue control in Brazil]. Cad. saúde pública, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 867-871, 2002.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L.; ZOURAIDE, G. Epidemiology and preventive measures of Dengue. Inf. Epidemiol. SUS., Brasília, v. 8. n. 4, 1999.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? Cad. saúde pública, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1307-1315, 2005.

THOMAS, S. J.; ROTHMAN, A. L. Trials and Tribulations on the Path to Developing a Dengue Vaccine. Am. j. prev. med., New York, v. 49, n. 6 Suppl 4, p. S334-344, 2015.

TOMASELLO, D.; SCHLAGENHAUF, P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. Travel med. infect. dis., Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 274-284, 2013.

URDANETA, L. et al. Detection of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. Infect. gent. evol., Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 177-184, 2005.

VAUGHN, D. W. et al. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. J. infect. dis., Chicago, v. 181, n. 1, p. 2-9, 2000.

VOGE, N. V. et al. Detection of dengue virus NS1 antigen in infected *Aedes aegypti* using a commercially available kit. Am. j. trop. med. hyg., Baltimore, v. 88, n. 2, p. 260-266, 2013.

WANG, S. M.; SEKARAN, S. D. Early diagnosis of Dengue infection using a commercial Dengue Duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. Am. j. trop. med. hyg., Baltimore, v. 83, n. 3, p. 690-695, 2010.

WEI, W. et al. The pathogenicity of mosquito densovirus (C6/36DENV) and its interaction with dengue virus type II in *Aedes albopictus*. Am. j. trop. med. hyg., Baltimore, v. 75, n. 6, p. 1118-1126, 2006.

WERE, F. The dengue situation in Africa. Paediatr. Int. Child. Health, London, v. 32, p. 18-21, 2012.

YONG, Y. K. et al. Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. Singap. med. j., Singapore, v. 48, n. 7, p. 662-668, 2007.

ZEIDLER, J. D. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. Rev. Saude Publica, Sao Paulo, v. 42, n. 6, p. 986-991, 2008.