

CELINA DE OLIVEIRA POERSCH

**AVALIAÇÃO E APERFEIÇOAMENTO DE DIFERENTES MÉTODOS
PARA O DIAGNÓSTICO DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

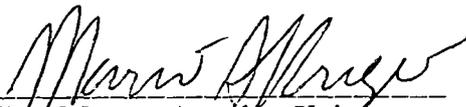
2003

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

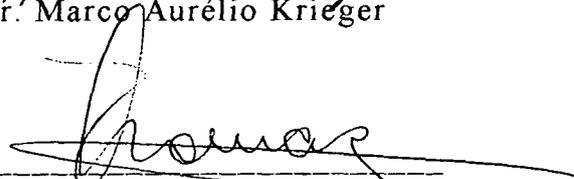
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

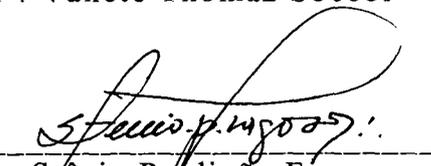
A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado “**AVALIAÇÃO E APERFEIÇOAMENTO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA O DIAGNÓSTICO DA DENGUE**”, de autoria da pós-graduanda **Celina de Oliveira Poersch**, e com a Banca Examinadora constituída pelos Professores: Dr. Marco Aurélio Krieger (Orientador e Presidente do Instituto de Biologia Molecular do Paraná-IBMP), Dr. Stênio Perdigão Fragoso (IBMP) e Dr^a. Vanete Thomaz Soccol (Departamento de Patologia Básica – UFPR). Segundo a avaliação da Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, a candidata foi: APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 15 de abril de 2003.



Dr. Marco Aurélio Krieger



Dr^a. Vanete Thomaz Soccol



Dr. Stênio Perdigão Fragoso

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo imenso carinho, pelo excelente exemplo e pela educação inquestionável.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger, não só pela ótima orientação, mas também pelo apoio, confiança e amizade.

À Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos, por compartilhar amostras, protocolos, materiais, conhecimento, experiência, dicas e conselhos, todos fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso e à Dra. Vanete Thomaz Soccol, pelo interesse na leitura dessa dissertação e pela contribuição dada à melhoria da mesma.

A todos os diretores do Instituto de Biologia Molecular (IBMP), por me disponibilizar um ambiente tão estimulante e agradável e por me deixar completamente confortável dentro dele.

Ao Mário Queiroz e aos demais colegas do lab 3, pela ajuda com as culturas de células e com tudo o que foi necessário.

A todos os colegas do IBMP, que tornaram tudo muito mais fácil e divertido.

À CAPES, à FIOCRUZ e ao TECPAR, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A dengue.....	1
1.2. O vírus.....	3
1.3. Aspectos clínicos e patogênese.....	6
1.4. Viremia e cinética da resposta humoral ao vírus.....	8
1.5. Diagnóstico laboratorial.....	10
1.5.1. Isolamento viral.....	10
1.5.2. RT-PCR (<i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>).....	11
1.5.3. ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	12
1.5.4. Inibição da hemaglutinação.....	14
1.5.5. Fixação do complemento.....	14
1.5.6. Teste de neutralização.....	15
1.5.7. <i>Dot-blot</i>	15
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Amostra populacional estudada.....	19
3.2. Diagnóstico sorológico.....	20
3.2.1. Produção de antígenos virais para ELISA.....	21
3.3. Diagnóstico molecular.....	21
3.3.1. PCR em tempo real para dengue tipo 1 (DEN1).....	21
3.3.1.1. <u>Desenho dos oligonucleotídeos</u>	24
3.3.1.2. <u>Deteccção das seqüências</u>	25
3.3.1.3. <u>Preparo dos padrões</u>	25
3.3.2. <i>Nested</i> – PCR.....	26
3.3.3. Avaliação da sensibilidade.....	27

3.3.4. Avaliação da especificidade.....	28
3.3.5. Obtenção do RNA.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Diagnóstico sorológico.....	29
4.2. Diagnóstico molecular.....	30
4.3. Sorologia e PCR.....	39
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICES.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Distribuição atual do <i>Aedes aegypti</i>	2
FIGURA 2 - Sorotipos circulantes do vírus da dengue nos estados brasileiros até janeiro de 2003.....	3
FIGURA 3 - Desenho esquemático representando a estrutura do vírus da dengue.....	4
FIGURA 4 - Esquema representando o genoma do vírus da dengue e as proteínas por ele codificadas.....	6
FIGURA 5 - Resposta imune primária e secundária ao vírus da dengue.....	9
FIGURA 6 - Representação esquemática das etapas de uma PCR em tempo real.....	23
FIGURA 7 - Curva padrão mostrando a correlação entre o número de cópias iniciais e o valor do Ct na PCR em tempo real para DEN1.....	31
FIGURA 8 - Sensibilidade dos métodos de diagnóstico molecular na detecção do vírus da dengue do tipo 1.....	32
FIGURA 9 - Amostras amplificadas por <i>nested</i> PCR visualizadas em géis de agarose e poliacrilamida.....	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real de DEN1.....	24
TABELA 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação e tipagem do vírus da dengue por <i>nested</i> PCR.....	27
TABELA 3 - Detecção de IgM contra o vírus da dengue através de MAC-ELISA utilizando dois antígenos distintos.....	30
TABELA 4 - Detecção do vírus da dengue do tipo 1 por PCR em tempo real, utilizando RNAs extraídos antes e após passagem dos soros em cultura celular.....	36
TABELA 5 - Detecção do vírus da dengue do tipo 1 por <i>nested</i> PCR, utilizando RNAs obtidos de duas maneiras distintas.....	36
TABELA 6 - Detecção dos quatro sorotipos de vírus da dengue por <i>nested</i> PCR, utilizando RNAs obtidos de duas maneiras distintas.....	37
TABELA 7 - Detecção do RNA do vírus da dengue em soro de paciente, através de dois métodos diagnósticos distintos.....	38
TABELA 8 - Detecção do RNA do vírus da dengue do tipo 1 em células C6/36 infectadas com soro de paciente, através de dois métodos diagnósticos distintos.....	38
TABELA 9 - Comparação entre diagnóstico sorológico e molecular de dengue.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

Ct: *threshold cycle*

DEN1: vírus da dengue sorotipo 1

DEN2: vírus da dengue sorotipo 2

DEN3: vírus da dengue sorotipo 3

DEN4: vírus da dengue sorotipo 4

DEPC: dietilpirocarbonato

DHF: *dengue hemorrhagic fever* (febre hemorrágica da dengue)

DNA: *deoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

cDNA: DNA complementar

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DO: densidade óptica

DTT: ditioneitol

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imuno-enzimático)

FAM: 6-carboxifluoresceína

Fc: fragmento cristalino do anticorpo

FFU: *foci forming unit*

HRP: *horse radish peroxidase*

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL-2: interleucina-2

IL-6: interleucina-6

M: molar

MAC-ELISA: *IgM antibody capture - enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio imuno-enzimático de captura de IgM)

μl: microlitro

ml: mililitro

μM: micromolar

mM: milimolar

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pb: pares de base

RT-PCR: *reverse transcription - polymerase chain reaction*

TAMRA: 6-tetrametilcarboxirrodamina

T_m: *melting temperature*

TMB: 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina

TNF α : *tumor necrosis factor α* (fator de necrose tumoral α)

RESUMO

A dengue tornou-se, na última década, a mais importante arbovirose em termos de morbidade e mortalidade, afetando, aproximadamente, 100 milhões de pessoas ao ano. A doença é causada por um vírus de RNA cadeia simples, o qual é transmitido através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, presentes ao longo de toda a região tropical e subtropical do mundo. Uma vez que não existem vacinas contra a dengue e seus sintomas são semelhantes aos de outras doenças, um método diagnóstico rápido e confiável é fundamental para o controle efetivo de epidemias. Os principais métodos diagnósticos utilizados atualmente são os ensaios imunoenzimáticos de captura de IgM (MAC-ELISA) e a detecção do RNA viral através de RT-PCR. A eficiência dessas duas técnicas, no entanto, é variável e depende da qualidade dos reagentes e do protocolo utilizado. A fim de contribuir para a melhoria das técnicas de diagnóstico atualmente utilizadas no Brasil, desenvolveu-se esse trabalho, cujos principais objetivos foram: 1) obter antígenos específicos e a um baixo custo, capazes de substituir antígenos produzidos em cérebro de camundongo, utilizados em um teste de MAC-ELISA desenvolvido no Brasil; 2) estabelecer um protocolo de PCR em tempo real para detectar o RNA do vírus da dengue em amostras de soro humano, utilizando como protótipo o sorotipo 1 do vírus (DEN1). Os antígenos usados no teste de MAC-ELISA foram produzidos em cultivo celular e foram testados utilizando-se 50 soros de indivíduos suspeitos de infecção por dengue. Os resultados foram comparados com os do teste original. Apenas dois resultados discordantes foram obtidos. A análise dessas duas amostras por uma terceira técnica (*dot-blot*) confirmou os resultados obtidos com o antígeno feito em cultura, sugerindo que este, além de ser mais facilmente produzido, é mais sensível e específico. Os dois testes sorológicos detectaram um número maior de amostras positivas entre os soros coletados após o sétimo dia de início dos sintomas. O protocolo de PCR em tempo real desenvolvido nesse trabalho foi comparado com um protocolo de *nested* PCR descrito na literatura. Ambos os testes foram avaliados quanto sua sensibilidade e especificidade utilizando RNA de vírus da dengue dos sorotipos 1 (DEN1) e 2 (DEN2) e de vírus da febre amarela. A *nested* PCR foi capaz de detectar o RNA proveniente de 2×10^2 FFU/ml, enquanto que a sensibilidade da PCR em tempo real foi inferior a $6,25 \times 10^{-1}$ FFU/ml. A PCR em tempo real para DEN1 não foi capaz de amplificar amostras de DEN2, mas detectou como positivas as amostras de febre amarela, o que não ocorreu na *nested* PCR. O mesmo painel de soros testado por ELISA foi submetido às duas técnicas de PCR e os resultados obtidos foram comparados. A baixa sensibilidade da *nested* PCR foi confirmada pela baixa taxa de detecção observada quando RNAs extraídos diretamente dos soros foram usados na reação. Quando os soros foram passados em cultura celular antes da extração do RNA, porém, o número de amostras positivas aumentou consideravelmente, indicando que essa etapa é importante para o melhor funcionamento dessa técnica. A maior sensibilidade da PCR em tempo real parece compensar, no entanto, esse problema. As duas técnicas de PCR detectaram um número maior de amostras positivas entre os soros coletados antes do sétimo dia após o início dos sintomas, indicando que os métodos moleculares são complementares aos testes sorológicos e as duas abordagens devem, portanto, ser utilizadas em conjunto a fim de garantir um diagnóstico preciso. Além disso, os resultados até o momento obtidos sugerem que, devido sua maior sensibilidade e

simplicidade, a PCR em tempo real é mais apropriada, do que a nested PCR, para o diagnóstico da dengue.

ABSTRACT

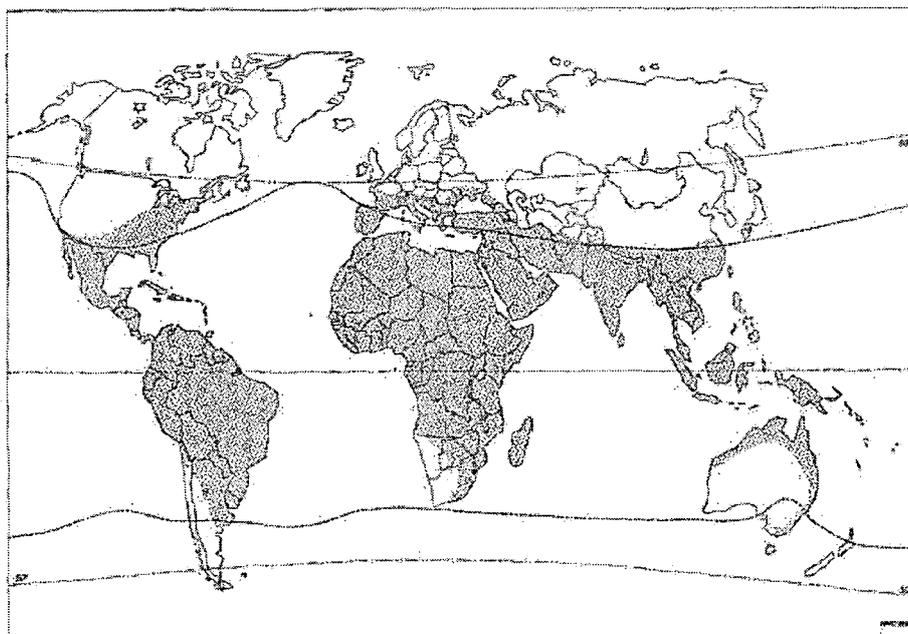
Dengue is today the most important arthropod-borne viral disease and affects over one hundred million people each year. The disease is caused by a RNA virus, which is transmitted by the bite of infected mosquitoes of the genus *Aedes*, present all over the tropical and subtropical regions of the world. To date, vaccines are not available and the control of the disease depends strongly on the control of the vector and the availability of diagnostic services in the areas of transmission. Currently, the main approaches used for dengue diagnosis are the identification of specific antibodies in the patient's serum by MAC-ELISA (IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay) or the detection of viral RNA by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR). The efficiency of those two techniques, however, depends on the quality of the reagents and the protocol utilized. The main objectives of this work were: 1) to obtain specific antigens in a low cost way, able to replace those produced in mouse brain currently used in a MAC-ELISA test developed in Brazil; 2) to establish a protocol for real time PCR to detect dengue virus RNA in human serum samples, utilizing as a prototype the serotype 1 of the virus (DEN1). The dengue antigens for the MAC-ELISA were produced in culture cells and evaluated using the sera of 50 suspected cases of dengue infection. The results were compared to those obtained by the test performed with the original antigen. Only two discordant results were noticed. The analysis of those two samples by a third technique (dot blot) confirmed the results obtained with the antigens produced in cell culture, suggesting that they are more sensitive and specific than the mouse brain extract. Both of the serological tests detected a larger number of positive samples among those collected after the seventh day of the onset of the symptoms. The real time PCR protocol developed in this work was initially evaluated using RNA from dengue virus serotype 1 (DEN1), serotype 2 (DEN2), and yellow fever virus. The sensitivity and specificity of a nested RT-PCR described before were also evaluated in the same manner. The nested PCR was able to detect the RNA originating from 2×10^2 FFU/ml, while the sensitivity of the real time PCR was lower than $6,25 \times 10^{-1}$ FFU/ml. The real time PCR was not able to amplify samples of DEN2, but detected as positive the yellow fever samples; it did not occur with the nested PCR. The same panel of serum used in the ELISA was submitted to the two PCR techniques and the results obtained were compared. The lower sensitivity of the nested PCR was confirmed by the low rate of detection observed when RNAs extracted directly from serum samples were used. However, when the virus were amplified in cell culture prior to RNA extraction, the positive number increased, indicating that such procedure is essential for this technique. The higher sensitivity of the real time PCR seems to compensate, in part, this problem. For the two PCR based techniques the detection of viral RNA were greater among the samples collected before the seventh day after the onset of the disease. These results suggest that the MAC-ELISA should be used in conjunction with an RT-PCR approach in order to improve the efficiency of dengue diagnosis. In addition, the real time PCR seems to be more suitable for the dengue diagnosis since it's more sensitive and easier to perform than the nested PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A dengue

A dengue é hoje a mais importante arbovirose (doença viral transmitida por artrópodes) que afeta o homem, constituindo um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente em países tropicais onde as condições do meio ambiente favorecem a proliferação dos seus vetores, os mosquitos do gênero *Aedes* (FUNASA, 2002). O *Aedes aegypti*, seu principal vetor, encontra-se presente em praticamente todos os países entre as latitudes de 35°N e 35°S (figura 1), sendo que, atualmente, mais de 2,5 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para a doença (WHO, 1997). As primeiras epidemias de que se tem conhecimento ocorreram entre os anos de 1779 e 1780 na Ásia, África e América do Norte. No entanto, a dengue foi considerada, por muito tempo, uma doença benigna, com grandes epidemias acontecendo apenas em intervalos de 10 a 40 anos (GUBLER; CLARK, 1995). O crescimento populacional, a urbanização descontrolada, a falta de programas efetivos para o controle do vetor e o aumento das viagens comerciais nos últimos anos contribuíram para a expansão geográfica do mosquito transmissor e do vírus, ocasionando não só o aumento da incidência da forma clássica da doença (febre da dengue) como também a emergência de epidemias da forma mais severa, conhecida como febre hemorrágica da dengue (DHF).

FIGURA 1 - Distribuição atual do *Aedes aegypti*



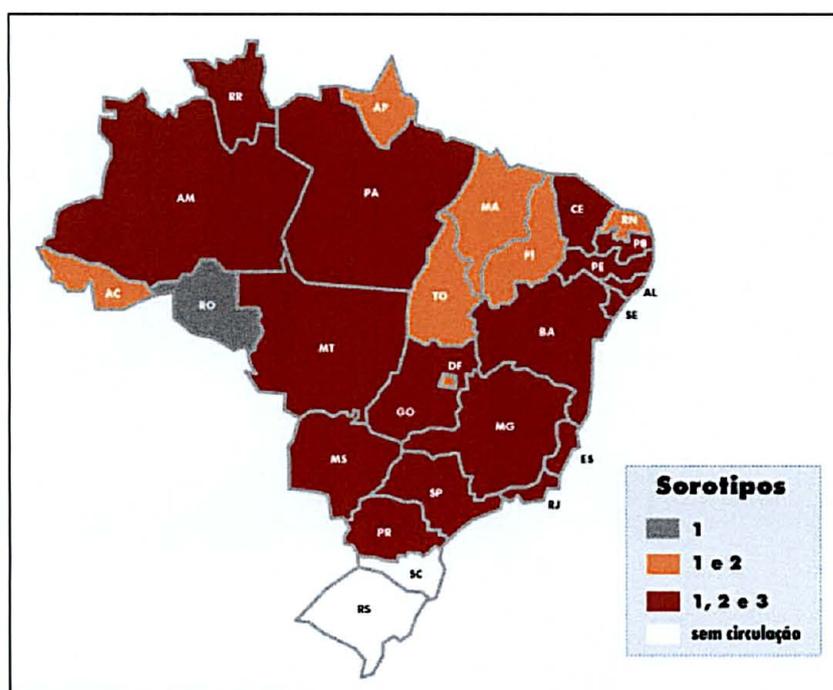
FONTE: *World Health Organization (WHO)*, 1997

A primeira epidemia de febre hemorrágica ocorreu entre os anos de 1953 e 1954, nas Filipinas, expandindo rapidamente para vários países asiáticos e ilhas do Pacífico. Nas Américas Central e do Sul, desde a re-introdução do *Aedes aegypti* no início dos anos 70, grandes epidemias de febre da dengue e febre hemorrágica da dengue vêm sendo registradas. Atualmente, o vírus da dengue afeta mais de 100 milhões de pessoas ao ano, causando, aproximadamente, 24.000 mortes (GUBLER, 1998).

No Brasil, a situação epidemiológica da dengue é alarmante e o país contribui, atualmente, com mais de 80% dos casos de dengue registrados nas Américas (SANTOS *et al.*, 2002). Três dos quatro sorotipos existentes do vírus já são encontrados em 17 estados da federação, inclusive no Paraná (figura 2), aonde

o número de casos de dengue clássica e de febre hemorrágica vem aumentando consideravelmente nos últimos anos (FUNASA, 2002).

FIGURA 2 - Sorotipos circulantes do vírus da dengue nos estados brasileiros até janeiro de 2003



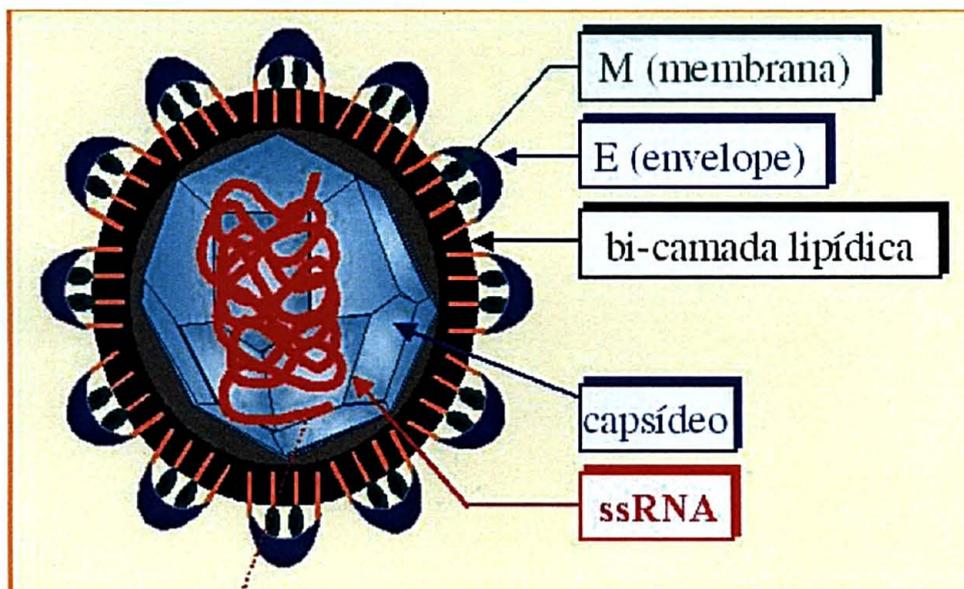
FONTE: Fundação Nacional de Saúde (FUNASA)

1.2. O vírus

O vírus da dengue pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* e pode ser classificado em quatro sorotipos distintos, sendo eles DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4. O virion tem formato esférico e diâmetro entre 40 e 60 nm. O nucleocapsídeo icosaédrico, composto por proteínas C (capsídeo) e RNA fita simples de polaridade positiva, é envolvido por uma bi-camada lipídica a qual constitui o envelope. Embebidas na bi-camada do envelope, encontram-se proteínas

E (envelope) e M (membrana), que também pode ser encontrada em sua forma não processada prM (pré-membrana) (figura 3). A proteína E possui os domínios responsáveis pela interação do vírus com a membrana da célula hospedeira (CHEN *et al.*, 1996), bem como os epítomos considerados os principais alvos da resposta humoral, alguns sendo comuns a todos os flavivírus e outros específicos do grupo ou do sorotipo (GUZMÁN; KOURI, 1996). Após a entrada do vírus na célula por endocitose, a proteína E é, também, capaz de promover a fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo, permitindo que a partícula infectante escape dessas vesículas (ROEHRIG, 1997).

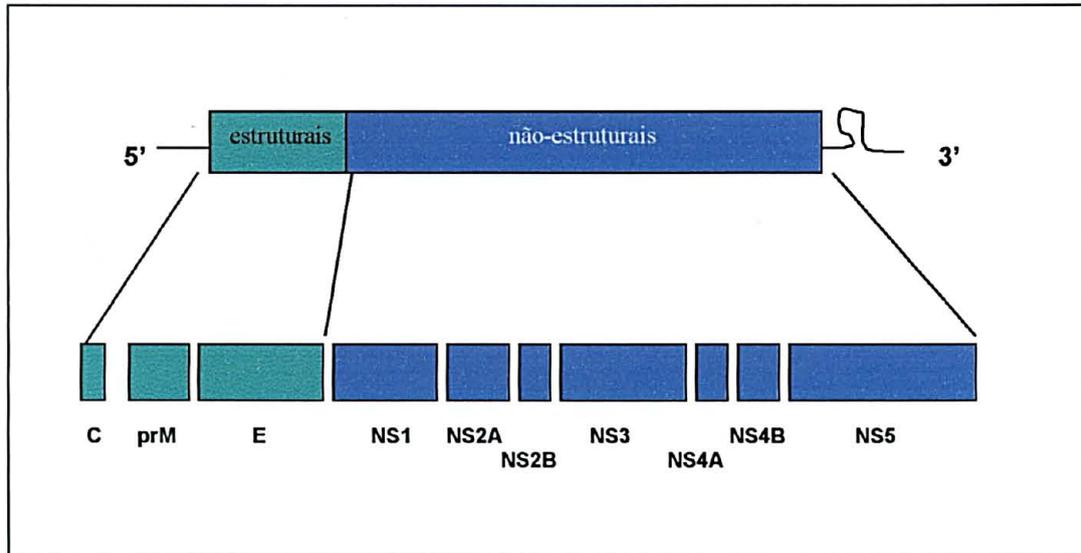
FIGURA 3 - Desenho esquemático representando a estrutura do vírus da dengue



Os macrófagos e monócitos são considerados os principais alvos do vírus e a infecção dessas células ocorre, principalmente, através da interação de receptores de Fc com partículas virais opsonizadas, sendo, portanto, particularmente importante em infecções secundárias. Outras células, como, por exemplo, hepatócitos, linfócitos, células de Kupffer (ROTHMAN, 1997) e células de Langerhans, são, no entanto, também permissíveis ao vírus, sendo infectadas por um mecanismo independente de Fc (WU *et al.*, 2000). Nessas células, moléculas de heparan sulfato presentes em sua superfície interagem com o vírus, facilitando a ligação da proteína E com receptores específicos, ainda não completamente caracterizados (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002; THULLIER *et al.*, 2001).

O genoma do vírus tem um comprimento aproximado de 11 kb e codifica, além das proteínas estruturais C, E e prM, sete proteínas não estruturais (NS) denominadas de NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O RNA é traduzido como uma seqüência única a partir do primeiro ou segundo códon AUG presente na porção codificadora da molécula, resultando em uma poli-proteína que é clivada co- e pós-traducionalmente por proteases do vírus e do hospedeiro. A região codificadora é flanqueada por regiões não traduzidas conservadas, que supostamente estão envolvidas na replicação do RNA (figura 4). Sabe-se que todas as proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação viral ou no processamento da poli-proteína, embora o mecanismo exato de ação da maioria delas ainda não esteja completamente esclarecido (revisado por RICE, 1996).

FIGURA 4 - Esquema representando o genoma do vírus da dengue e as proteínas por ele codificadas



1.3. Aspectos clínicos e patogênese

A infecção por qualquer um dos sorotipos causa manifestações clínicas semelhantes que podem variar de febre comum, não diferenciada, a febre alta associada a fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e aumento da permeabilidade vascular, caracterizando a febre hemorrágica da dengue (DHF) (ROTHMAN; ENNIS, 1999). A infecção em humanos por um sorotipo confere imunidade permanente contra re-infecções subseqüentes pelo mesmo sorotipo, mas apenas proteção parcial e temporária contra os outros sorotipos. Tem sido observado que em infecções subseqüentes por diferentes sorotipos do vírus a chance de desenvolvimento de uma forma mais severa da doença é maior. Esse fato pode ser explicado pela teoria da "potencialização dependente de anticorpos" (*antibody-dependent enhancement*), segundo a qual anticorpos não-neutralizantes, adquiridos

em uma infecção prévia por um vírus heterólogo, ligam-se ao novo sorotipo infectante e facilitam sua entrada nos macrófagos, por intermédio dos receptores de Fc (HALSTEAD, 1988). Esse mecanismo levaria à rápida ativação de linfócitos T pré-existentes, causando a liberação exacerbada de citocinas e mediadores químicos que causariam os sintomas característicos da febre hemorrágica (KURANE; ENNIS, 1994). De fato, os níveis de diversas citocinas, tais como IL-2 (KURANE; INNIS, 1991), IL-6 e TNF α (KUNO; BAILY, 1994), já foram encontrados elevados em pacientes com DHF quando comparados com indivíduos com febre da dengue. A hipótese de que a febre hemorrágica da dengue é causada por fatores predominantemente imunológicos associados a infecções secundárias é fortemente sustentada pelo fato de que casos de febre hemorrágica ocorrem preferencialmente em áreas onde há a circulação de múltiplos sorotipos e costuma acometer habitantes dessas regiões, enquanto que visitantes manifestam a forma clássica da doença (ROTHMAN, 1997). A observação de que casos de febre hemorrágica acontecem em infecções primárias e de que nem todas as infecções secundárias resultam em DHF sugere, no entanto, que outros fatores devem contribuir para a severidade da doença. Entre eles pode-se citar sexo, idade e características genéticas do hospedeiro (HALSTEAD, 1988), além de particularidades das cepas que podem afetar sua virulência (LEITMEYER *et al.*, 1999; RICO-HESSE *et al.*, 1997; VAUGHN *et al.*, 2000; WATTS *et al.*, 1999).

O período de incubação da doença varia de 3 a 14 dias e o período febril costuma durar de 2 a 7 dias. Na dengue clássica a febre é, normalmente, acompanhada de mialgia, artralgia, dor retroorbital, fotofobia e linfadenopatia, podendo ocorrer náusea, vômito, leucopenia, trombocitopenia, erupções cutâneas e manifestações hemorrágicas. Na primeira fase da febre hemorrágica os sintomas

são muito semelhantes aos da forma clássica. Após a remissão da febre, no entanto, o aumento da permeabilidade vascular leva à rápida perda de fluidos, que, se não tratada adequadamente, pode levar a choque e morte (GUBLER, 1998).

1.4. Viremia e cinética da resposta humoral ao vírus

A viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente apresentar-se doente o suficiente para recorrer a tratamento médico. Vírus circulantes permanecem, no entanto, detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (VORNDAM; KUNO, 1997).

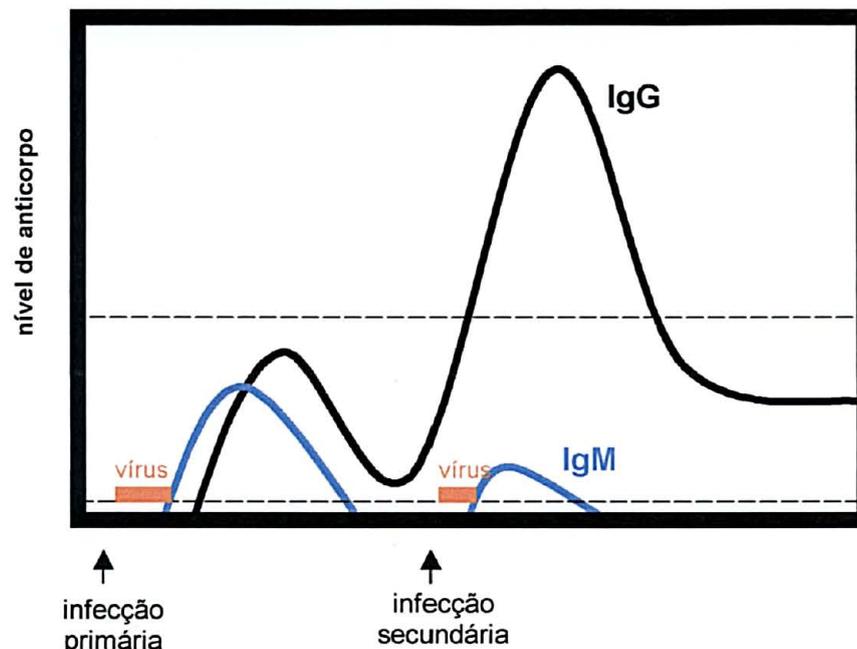
Anticorpos contra sete das dez proteínas codificadas pelo vírus da dengue já foram descritos (BRINTON *et al.*, 1998), sendo que aqueles direcionados contra a proteína E são os únicos neutralizantes e os mais freqüentemente detectados tanto em respostas primárias quanto em secundárias (VALDÉS *et al.*, 2000).

O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é o IgM. Uma pequena porcentagem dos pacientes apresenta níveis detectáveis de IgM já no primeiro dia da doença e a maioria já se encontra positivo no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas. Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, o que faz desses anticorpos bons indicadores de infecções recentes (GUBLER; SATHER, 1988). Anticorpos IgG começam a aparecer, em uma resposta primária, alguns dias depois dos IgM, sendo detectáveis a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente durante semanas e, apesar de

serem muito mais baixos que os de IgM, permanecem detectáveis por toda a vida. Indivíduos com imunidade prévia ao vírus da dengue ou mesmo a outro flavivírus desenvolvem uma resposta secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG quase que imediatamente após o início dos sintomas. Os níveis de IgM são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária (figura 5) (WHO, 1997). A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos podem ser, portanto, usados na identificação de respostas primárias e secundárias.

Anticorpos IgM e IgG podem ser específicos para um determinado sorotipo em algumas infecções primárias, o que geralmente não ocorre em infecções secundárias. O grau de reação cruzada apresentada por esses anticorpos é variável e depende do antígeno e do teste diagnóstico utilizado (VORNDAM; KUNO, 1997).

FIGURA 5 - Resposta imune primária e secundária ao vírus da dengue



1.5. Diagnóstico laboratorial

A inexistência de vacinas para a dengue faz com que o controle efetivo da doença dependa exclusivamente da disponibilidade de serviços diagnósticos nas áreas de transmissão e do controle do vetor. Uma vez que os sintomas da dengue são muito semelhantes aos de outras doenças febris tais como sarampo, malária e leptospirose, as quais, normalmente, co-circulam com dengue, métodos eficientes de diagnóstico laboratorial devem ser utilizados não só para que o tratamento dos pacientes seja adequado, mas, principalmente, para que uma possível epidemia possa ser contida.

O diagnóstico laboratorial da dengue pode ser feito através da detecção direta do vírus ou da detecção de anticorpos anti-dengue no soro dos pacientes. As técnicas comumente utilizadas para detecção do vírus são isolamento viral e RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*). Já o diagnóstico sorológico é, usualmente, feito através de ensaios imuno-enzimáticos (ELISA), inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização e *dot-blot*. Uma descrição breve, destacando as principais vantagens e desvantagens de cada uma dessas abordagens, será feita a seguir.

1.5.1. Isolamento viral

O isolamento viral pode ser feito inoculando-se soro ou plasma do paciente em cérebro de camundongo, mosquito ou cultura de células de mamífero ou de inseto. A inoculação em cérebro de camundongo e em células de mamífero em cultura são técnicas caras, demoradas e pouco sensíveis e, por isso, não recomendadas (GUBLER, 1998). A inoculação de mosquito é o método mais

sensível, sendo o mais confiável para a confirmação de casos fatais de febre hemorrágica da dengue. O vírus se replica na maioria dos tecidos do mosquito e atinge títulos elevados em apenas 4 ou 5 dias. Porém, esse sistema tem a desvantagem de ser trabalhoso e requerer instalações especiais para a produção e manutenção dos mosquitos. A utilização de linhagens celulares de insetos é uma boa alternativa à inoculação de mosquitos. Apesar de não ser tão sensível como esta última técnica e de ser mais suscetível a contaminações, ela é econômica e permite o processamento de uma grande quantidade de soros simultaneamente (GUZMÁN; KOURI, 1996). O vírus isolado por qualquer um dos métodos acima, ou mesmo presente em amostras fixadas de tecido, é normalmente detectado através de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (VORNDAM; KUNO, 1997).

No entanto, o vírus pode ser inativado por calor, pH e alguns químicos, fazendo com que o sucesso do isolamento seja seriamente afetado por problemas de manipulação e armazenamento das amostras. Outro fator a ser considerado é que o tempo de duração da viremia é de, apenas, 4 ou 5 dias e algumas cepas podem manter um título viral abaixo do limite de detecção durante toda a infecção. O aumento do título de anticorpos faz, também, com que a eficiência do método diminua rapidamente, o que é particularmente problemático em casos de infecções secundárias (GUBLER, 1998).

1.5.2. RT-PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*)

Uma outra forma de verificar a presença do vírus é através da detecção do RNA viral por RT-PCR. Essa técnica vem sendo cada vez mais utilizada no diagnóstico da dengue devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade

(GUZMÁN; KOURI, 1996). Vários protocolos de RT-PCR para detecção do vírus da dengue e determinação do seu sorotipo foram desenvolvidos nos últimos anos, como, por exemplo, o uso de quatro iniciadores sorotipo-específicos em uma única reação (HARRIS *et al.*, 1998) e reações de amplificação utilizando um único par de iniciadores universais para dengue seguidas de *nested PCR* (LANCIOTTI *et al.*, 1992), análise com enzimas de restrição (PAULA *et al.*, 2002a), ou hibridação com sondas específicas (HENCHAL *et al.*, 1991). A RT-PCR permite a detecção de diminutas quantidades de RNA viral mesmo em amostras onde o vírus está inativo ou associado a anticorpos. No entanto, ela é altamente a contaminações, depende de cuidados específicos com a manipulação do RNA e, assim como ocorre com o isolamento viral, sua aplicação está restrita ao período de viremia (WHO, 1997).

A metodologia de PCR em tempo real, por ser um processo quase que totalmente automatizado, é considerada muito mais confiável e reprodutível do que as técnicas tradicionais de amplificação e vem contribuindo para que a PCR seja cada vez mais aceita como um método diagnóstico (BUSTIN, 2002). Recentemente, alguns protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico da dengue foram publicados (CALLAHAN *et al.*, 2001; DROSTEN *et al.*, 2002; HOUNG *et al.*, 2000; LAUE *et al.*, 1999).

1.5.3. ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Entre os testes sorológicos para o diagnóstico da dengue, os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) são considerados os mais eficientes devido a sua praticidade, especificidade e sensibilidade. O teste de MAC-ELISA (*IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*), em particular, vem sendo amplamente utilizado para a confirmação de infecções recentes (WANG *et al.*, 2000). Nesse

teste, anticorpos IgM do soro dos pacientes são capturados não especificamente por anticorpos anti-IgM fixados em uma placa. Os anticorpos capturados são, então, testados com antígenos do vírus da dengue e reações positivas são detectadas utilizando-se um segundo anticorpo anti-dengue conjugado a uma enzima (VORNDAM; KUNO, 1997). Preparações relativamente grosseiras de antígeno, como macerado de cérebro de camundongo infectado ou extrato de cultura celular, podem ser utilizadas nesse teste, embora o uso de proteínas recombinantes represente uma excelente alternativa (CUZZUBBO *et al.*, 2001).

Uma vez que esse tipo de teste permite a detecção quantitativa e qualitativa dos anticorpos, sua utilização, em conjunto com testes de captura de IgG baseados no mesmo princípio, permite a distinção entre resposta primária e secundária (INNIS *et al.*, 1989; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999).

Atualmente, vários testes de captura de IgM e IgG estão disponíveis comercialmente, possibilitando a análise rápida e reprodutível de um grande número de amostras, sem a necessidade de equipamentos sofisticados (LAM *et al.*, 2000; PALMER *et al.*, 1999; VAUGHN *et al.*, 1999).

Problemas inerentes a todos os métodos sorológicos de diagnóstico da dengue, no entanto, também são evidenciados nesse teste. A ocorrência de reação cruzada, por exemplo, impossibilita a diferenciação do sorotipo do vírus infectante. Além disso, resultados falso-negativos podem ocorrer se o soro for coletado em uma fase muito inicial da doença, antes que os anticorpos atinjam níveis detectáveis (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

Alguns ensaios imuno-enzimáticos para detecção de antígenos virais, presentes no soro desde os primeiros dias de sintomas clínicos, vêm sendo desenvolvidos com sucesso (ALCON *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 2000).

1.5.4. Inibição da hemaglutinação

Esse ensaio depende da habilidade dos anticorpos em inibir a aglutinação de hemácias mediada por glicoproteínas virais e, desde o seu desenvolvimento, em 1958, permaneceu praticamente inalterado (VORNDAM; KUNO, 1997). Os soros devem ser testados em diversas diluições e tratados com acetona ou caolina, a fim de que inibidores da hemaglutinação sejam removidos. Uma vez que esse teste não faz a diferenciação entre IgM e IgG, um resultado confiável requer a utilização de amostras pareadas, coletadas com um intervalo mínimo de 7 dias. Reações positivas são caracterizadas por um aumento de quatro vezes ou mais entre os títulos da primeira e segunda amostra, com um título máximo de, pelo menos, 1:1280 em respostas secundárias e menor do que isso em respostas primárias. Respostas cruzadas com outros flavivírus são comuns, fazendo com que um diagnóstico preciso não seja possível com base apenas nesse teste (WHO, 1997).

1.5.5. Fixação do complemento

Esse teste é pouco utilizado para o diagnóstico da dengue devido a sua baixa sensibilidade e pouca praticidade (GUBLER, 1998). Ele é baseado no princípio de que moléculas do complemento são consumidas em uma reação antígeno-anticorpo. Em uma primeira etapa da reação, o soro do paciente, o antígeno e quantidades conhecidas de complemento são incubados juntos. Se houver a fixação do complemento, não haverá a lise de hemácias adicionadas em uma segunda etapa da reação. Uma das vantagens da técnica é que anticorpos fixadores de complemento aparecem posteriormente aos anticorpos responsáveis pela inibição da hemaglutinação e persistem por pouco tempo no soro, tornando-a útil para a detecção de infecções correntes. Além disso, em infecções primárias, os anticorpos

fixadores de complemento são relativamente específicos, permitindo, em alguns casos, a diferenciação do vírus quanto ao sorotipo (VORNDAM; KUNO, 1997).

1.5.6. Teste de neutralização

Nesse teste, diluições do soro previamente inativado por calor são incubadas com quantidades definidas de vírus. A fração de vírus não neutralizada é adsorvida a uma monocamada de células suscetíveis e, após um período apropriado de incubação, as placas resultantes são contadas. O título é determinado como sendo a diluição máxima do soro capaz de reduzir em 50 a 90% o número de placas. Um aumento de quatro vezes ou mais entre os títulos de amostras pareadas é indicativo de infecção corrente. Apesar de ser sensível, é um teste demorado e tecnicamente difícil (GUBLER, 1998).

1.5.7. *Dot-blot*

Ensaio de *dot-blot*, que utilizam os mesmos princípios dos ensaios imunoenzimáticos de captura de IgM e IgG, vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos (CARDOSA *et al.*, 1995; CUZZUBBO *et al.*, 2001). A substituição das placas de ELISA por tiras individuais de nitrocelulose, nesses testes, permite que eles sejam realizados sem nenhum equipamento específico. Essa mesma característica, porém, dificulta a análise de muitas amostras simultaneamente e torna a quantificação muito subjetiva, já que ela é totalmente dependente de julgamento visual. Testes calibrados para detectar IgM em respostas primárias e secundárias e IgG apenas em respostas secundárias, já disponíveis comercialmente, são capazes de superar essa limitação e podem ser usados da mesma forma que os ELISAs de captura para diferenciar esses dois tipos de resposta (CUZZUBBO *et al.*, 2001). Por ser uma

tecnologia recentemente introduzida para o diagnóstico da dengue, informações mais precisas sobre a performance desses testes ainda são inexistentes.

2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A situação epidemiológica da dengue vem se agravando nos últimos anos e a principal forma de controle da doença é através da realização de um diagnóstico rápido e preciso. Algumas particularidades da infecção, como curta viremia e presença de resposta imune cruzada com outros flavivírus, no entanto, dificultam o estabelecimento de métodos diagnósticos confiáveis e reprodutíveis. Constantes esforços são necessários, portanto, para que melhorias sejam introduzidas aos testes já existentes ou para que novas alternativas sejam criadas.

Devido a algumas características, como sensibilidade e facilidade de execução, os testes de captura de IgM e aqueles baseados em PCR vêm substituindo as técnicas mais tradicionais de detecção de anticorpos e isolamento viral, respectivamente.

No Brasil, um teste de MAC-ELISA foi, recentemente, desenvolvido pelo Departamento de Reativos para Diagnóstico (DRD) de Bio-Manguinhos e vem sendo utilizado por diversos laboratórios públicos em todo o país. Apesar dos resultados satisfatórios, esse teste utiliza antígenos produzidos em cérebro de camundongo, exigindo a inoculação intracerebral e o sacrifício de um animal para cada 15 reações. Essa prática, além de demandar perícia técnica, é eticamente questionável, já sendo desaconselhada pela Organização Mundial de Saúde e podendo, em breve, ser definitivamente proibida.

Considerando esses problemas, desenvolveu-se esse trabalho, cujos objetivos foram:

- produzir antígenos de boa qualidade e a um baixo custo, que possam substituir os antígenos feitos em cérebro de camundongo no teste imunoenzimático para o diagnóstico da dengue;
- desenvolver um método molecular de diagnóstico da dengue baseado na técnica de PCR em tempo real;
- avaliar o método desenvolvido quanto à sua eficiência e sensibilidade e compará-lo com um método de *nested* PCR descrito na literatura;
- comparar as técnicas sorológicas com as técnicas moleculares testadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostra populacional estudada

Quatro métodos diagnósticos distintos foram analisados utilizando-se uma amostra populacional composta por 50 indivíduos suspeitos de infecção por dengue e 7 controles negativos para esta doença. Os soros dos pacientes suspeitos foram coletados entre os anos de 2001 e 2003 por diferentes unidades de saúde dos Estados do Paraná e Santa Catarina e enviados para o Laboratório Central (LACEN) do Paraná. Dos 50 soros possivelmente positivos, 23 foram coletados entre o dia 0 (dia de início dos sintomas) e o terceiro dia após o aparecimento dos sintomas, 13 foram coletados entre os dias 4 e 6 e os demais 14 soros foram coletados no mínimo sete dias após o surgimento dos primeiros sintomas. Os soros negativos foram coletados de indivíduos saudáveis, residentes na cidade de Curitiba, que nunca estiveram em áreas epidêmicas para dengue e nunca apresentaram os sintomas característicos da patogenia. Dos sete indivíduos classificados como negativos para dengue, três haviam sido vacinados para febre amarela em torno de sete dias antes da coleta do sangue.

Uma alíquota de cada um dos soros foi utilizada nos testes imunoenzimáticos e outra alíquota foi processada para a extração do RNA viral, utilizado nos testes moleculares.

3.2. Diagnóstico sorológico

Para o diagnóstico sorológico das amostras utilizou-se, inicialmente, um método de MAC-ELISA (*IgM antibody capture - enzyme-linked immunosorbent assay*) desenvolvido no Departamento de Reativos para Diagnóstico (DRD) de Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (RJ). O teste foi executado seguindo as recomendações propostas pelos fabricantes. Brevemente, dois poços de uma placa de ELISA, previamente sensibilizada com anticorpos de cabra anti-IgM humana, foram incubados, por 30 minutos a 37°C, com 50 µl de uma diluição 1:100 de cada soro a ser testado. Controles positivos e negativos que acompanham o kit foram, também, incluídos em duplicata. A placa foi lavada cinco vezes com uma solução de lavagem e foi adicionado, a cada poço, 50 µl de uma mistura de antígenos, produzida a partir de macerado de cérebros de camundongos infectados com os sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue. A placa foi incubada e lavada como descrito anteriormente. Anticorpos anti-dengue conjugados com a enzima HRP (*horse radish peroxidase*) foram adicionados e incubados por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada sete vezes e o substrato da enzima (H₂O₂ – peróxido de hidrogênio) e o cromógeno (TMB - 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina) foram adicionados. Após uma incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M. A densidade óptica (DO) de cada poço foi lida a 450 nm. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma densidade óptica superior a 2,2 vezes a média da DO dos controles negativos.

3.2.1. Produção de antígenos virais para ELISA

A fim de encontrar um substituto para os antígenos feitos com macerado de cérebro de camundongo, antígenos virais foram produzidos em cultura celular. A metodologia para obtenção desses antígenos está sob sigilo, visando a obtenção de pedido de privilégio intelectual (patente) em nome do Instituto de Biologia Molecular do Paraná e da Fundação Oswaldo Cruz, não podendo, no momento, ser detalhada.

Os antígenos produzidos foram testados utilizando-se o mesmo ensaio imuno-enzimático de captura de IgM (MAC-ELISA) descrito anteriormente. Com exceção da substituição dos antígenos, todos os demais reagentes e procedimentos empregados no teste original foram mantidos.

Para determinar o ponto de corte do MAC-ELISA feito com os antígenos produzidos em cultura, testou-se, com este método, o soro de 15 indivíduos diagnosticados como negativos para dengue pelo teste não modificado de Bio-Manguinhos. Foram consideradas como positivas, as amostras que apresentaram um valor de DO superior à média das densidades ópticas obtidas para esses 15 controles negativos acrescida de dois desvios padrões.

3.3. Diagnóstico molecular

3.3.1. PCR em tempo real para dengue tipo 1 (DEN1)

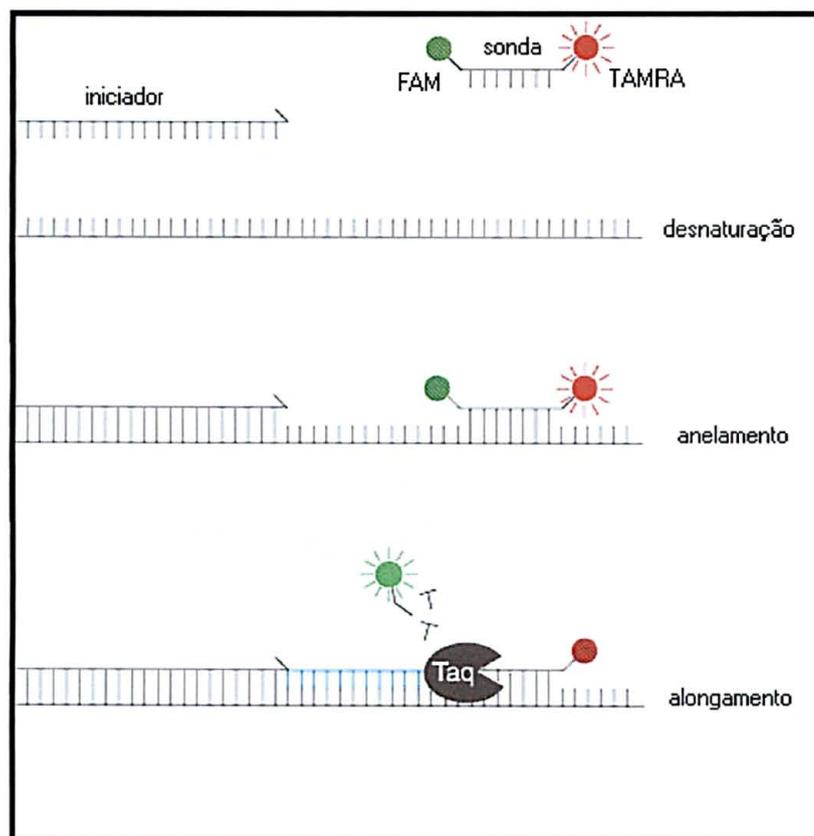
A fim de permitir um diagnóstico rápido e específico, desenvolveu-se um ensaio de PCR em tempo real, baseado na hidrólise de sondas fluorescentes, o qual foi testado na detecção do RNA do vírus da dengue presente em soro de paciente ou em células de cultura infectadas. Essa técnica permite a realização da reação de

transcrição reversa (RT) e de PCR em um mesmo tubo, sendo o produto da amplificação detectado imediatamente após sua síntese, durante o curso de toda a reação de PCR. A detecção em tempo real é possível devido à degradação de uma sonda complementar a uma região interna do segmento amplificado. Essa sonda é marcada com dois diferentes fluoróforos: geralmente FAM (6-carboxifluoresceína) em sua extremidade 5' e TAMRA (6-tetrametilcarboxirrodamina) em sua extremidade 3'. Quando a sonda está intacta, os dois fluoróforos mantêm-se próximos um do outro e a fluorescência emitida por FAM é absorvida por TAMRA. Durante a fase de extensão dos iniciadores, a sonda que estava anelada à sua seqüência complementar é degradada, devido à atividade 5' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. A degradação ocasiona a separação dos dois fluoróforos com conseqüente aumento da fluorescência na reação (figura 6) (BUSTIN, 2000). A fluorescência emitida em cada ciclo é captada e representada em um gráfico. Determina-se, manualmente, um valor mínimo de fluorescência necessário para que uma amostra seja considerada positiva. O ciclo em que a fluorescência de certa amostra atinge esse valor mínimo é denominado de Ct (*threshold cycle*).

Uma vez que a intensidade da fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto presente dentro de cada tubo de ensaio, essa técnica possibilita não só a simples detecção de um fragmento específico de RNA ou DNA como também a sua quantificação (HEID *et al.*, 1996). A quantificação é feita amplificando-se amostras padrões, com quantidades conhecidas e variadas de molde, concomitantemente com amostras cujas quantidades queira-se determinar. Os valores de Ct obtidos para as amostras padrões são utilizados na construção de uma curva representando o Ct versus o número de cópias iniciais. Os valores de Ct das amostras desconhecidas são interpolados na curva padrão, sendo possível a

determinação do número de cópias iniciais presentes nessas amostras. Uma vez que esse método não requer nenhum tipo de processamento após a reação de PCR, o material amplificado pode ser descartado sem que o tubo seja aberto, evitando a contaminação de amostras com o produto de uma amplificação anterior.

FIGURA 6 - Representação esquemática das etapas de uma PCR em tempo real



Na etapa de alongamento, a hidrólise da sonda permite a emissão da fluorescência de FAM, que é detectada e registrada a cada ciclo de amplificação.

3.3.1.1. Desenho dos oligonucleotídeos

Todas as seqüências que representavam genomas completos do vírus da dengue do tipo 1 presentes no *GenBank* foram alinhadas através do software CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997). Regiões do genoma que apresentavam um alto grau de conservação dentro do sorotipo 1, mas uma baixa similaridade entre os diferentes sorotipos, foram identificadas visualmente e selecionadas. A seqüência exata dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas complementares a essas regiões foram determinadas usando o software Primer Express® (Applied Biosystems). O conjunto de oligonucleotídeos que melhor se adequava aos parâmetros recomendados pelo programa foi escolhido. Dessa forma, os iniciadores utilizados apresentavam T_m (*melting temperature*) entre 58 e 60°C e a sonda uma T_m entre 7 a 10°C superior a dos iniciadores. As sondas não apresentavam guanina em sua extremidade 5' e o tamanho do fragmento amplificado não ultrapassava os 200 pares de base (pb) sendo minimizadas nesta escolha a probabilidade de formação de estruturas secundárias e de dimerização dos oligonucleotídeos. A seqüência dos oligonucleotídeos utilizados e suas principais características estão listadas na tabela 1.

TABELA 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real de DEN1

oligonucleotídeo	seqüência (5' → 3')	região genômica	tamanho do produto amplificado (pb)
DEN1-sense	GCTGATGCTGGTGACACCAT [#]	907 - 926	
DEN1-anti-sense	TCGACGAAGTCTCTGTTGCCTAT	951 - 973	66
DEN1-sonda	CCCACGCATCGCATGGCCAT	929 - 949	

[#]em preto, as bases conservadas entre todas as cepas do vírus da dengue do tipo 1 analisadas.

3.3.1.2. Detecção das seqüências

O ensaio de PCR em tempo real foi feito no sistema de detecção de seqüência ABI PRISM 7000[®] (Applied Biosystem), utilizando o kit TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix[®] (Applied Biosystems), conforme instruções do fabricante. As concentrações finais dos reagentes para uma reação de 25 μ l, utilizando 5 μ l de RNA, foram as seguintes: 0,4 μ M de cada iniciador, 0,3 μ M de sonda e os componentes do kit (*master mix* e enzima MultiScribe[®]) diluídos conforme recomendado. A ciclagem consistiu de um passo inicial de 30 minutos a 48°C, seguido por 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

3.3.1.3. Preparo dos padrões

Quantidades definidas (120, 480, 1920, 7680 e 30720 *foci forming units* - FFU) de vírus da dengue do tipo 1 (cepa BR90), previamente purificado e titulado, foram adicionadas a 140 μ l de soro negativo para dengue. Curvas padrões foram geradas em todos os ensaios, amplificando-se, em triplicata, 5 μ l do RNA extraído dessas alíquotas. A carga viral dos padrões foi calculada em FFU por mililitro (FFU/ml) e FFU por volume testado, com base no volume de soro utilizado para a extração do RNA (140 μ l), na quantidade total de RNA eluído (60 μ l) e no volume utilizado para a amplificação (5 μ l). Dessa maneira, a quantidade inicial de partículas virais presentes nas amostras testadas pôde, também, ser determinada em FFU/ml e FFU por volume testado.

3.3.2. *Nested* – PCR

Os resultados obtidos com a PCR em tempo real foram comparados com os resultados obtidos com o método diagnóstico modificado de LANCIOTTI *et al.* (1992). De acordo com essa metodologia, 5 μ l de RNA foram, inicialmente, convertidos em cDNA (DNA complementar) pela ação de uma enzima transcriptase reversa (Superscript[®] - Invitrogen), em uma reação contendo 2 unidades/ μ l desta enzima, 600 μ M de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de ditioneitol (DTT), 0,3 unidades/ μ l de inibidor de RNase (RNase OUT[®] - Invitrogen), 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 10 μ M do oligonucleotídeo iniciador D2 (tabela 02). Após incubação de 1 hora a 42°C, a totalidade do cDNA foi adicionada a uma primeira reação de PCR, na qual utilizou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (D1 e D2) complementares a seqüências comuns a todos os sorotipos do vírus da dengue (tabela 2). Para essa reação foram adicionados 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂, 125 μ M de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 10 μ M de cada um dos iniciadores e 0,05 unidades/ μ l de enzima Taq DNA polimerase. As amostras foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento dos iniciadores (56°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto), os quais foram antecidos por 2 minutos a 94°C. Um microlitro (1 μ l) do produto da primeira reação, diluído dez vezes, foi adicionado a uma segunda reação de amplificação, na qual o iniciador sense utilizado na primeira PCR (D1) foi usado em conjunto com quatro iniciadores anti-sense (TS1, TS2, TS3 e TS4), específicos para cada um dos quatro sorotipos do vírus. Os demais reagentes utilizados na PCR anterior foram mantidos, nas mesmas concentrações. A amplificação dos fragmentos

desejados deu-se após 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Uma alíquota do produto da segunda reação foi aplicada em gel de poliacrilamida 8%¹ e/ou em gel de agarose 1,5% e visualizada em luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Os tamanhos distintos das bandas resultantes da amplificação com cada um dos iniciadores específicos permitiram a sorotipagem do vírus infectante.

TABELA 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação e tipagem do vírus da dengue por *nested* PCR (LANCIOTTI, 1992)

iniciador	sequência (5' → 3')	tamanho do produto amplificado (pb)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	511
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	511
TS1 ^a	GATCCGGGGGCATTTGTAGGTC	473
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392

^a seqüência não corresponde à descrita por LANCIOTTI *et al.* (1992)

3.3.3. Avaliação da sensibilidade

A fim de determinar o limite de detecção das técnicas moleculares de diagnóstico, quantidades conhecidas (60, 30, 15 e 7,5 FFU) de vírus da dengue do tipo 1 (cepa BR90), previamente purificado em sacarose e titulado, foram adicionadas a alíquotas de 140 µl de soro negativo para dengue. O RNA dessas alíquotas foi isolado e 5 µl foram submetidos, em triplicata, a um ensaio de PCR em

¹ a composição detalhada do gel de poliacrilamida 8% encontra-se descrita no apêndice 1

tempo real e de *nested* PCR. A quantidade de partículas virais detectadas foi ajustada para FFU por mililitro e FFU por volume testado, considerando o volume utilizado para a extração do RNA (140 μ l), o volume de RNA eluído (60 μ l) e o volume de RNA extraído utilizado na PCR (5 μ l).

3.3.4. Avaliação da especificidade

A especificidade de ambos os testes foi avaliada usando RNAs isolados de vírus da dengue do tipo 1 (cepa BR90) e do tipo 2 (cepa Jamaica) purificados, assim como RNAs extraídos do soro de três pacientes vacinados para febre amarela, coletado até sete dias após a vacina.

3.3.5. Obtenção do RNA

Os RNAs utilizados nos dois métodos de diagnóstico molecular foram isolados diretamente a partir de uma alíquota de 140 μ l de cada um dos soros a serem testados. A extração foi feita com o QIAmp Viral RNA Kit[®] (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Os RNAs eluídos em 60 μ l de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) foram armazenados a -70°C até o momento do seu uso.

RNAs que haviam sido extraídos conforme protocolo padrão de extração com fenol/clorofórmio, a partir de células C6/36 incubadas com os mesmos soros utilizados acima, foram, também, submetidos ao ensaio de PCR em tempo real.

4. RESULTADOS

4.1. Diagnóstico sorológico

A possibilidade de substituir antígenos produzidos a partir de macerado de cérebro de camundongo pelos antígenos desenvolvidos nesse trabalho no teste de MAC–ELISA desenvolvido por Bio-Manguinhos foi investigada. Para tal, um painel de 50 soros foi testado com o antígeno original (cérebro de camundongo) e com o antígeno a ser avaliado e os resultados obtidos foram comparados.

A concordância entre os resultados dos dois testes² foi de 100% para os soros coletados entre o quarto e o sexto dia após o início dos sintomas, 95,65% para os soros coletados entre os dias 0 e 3 e 92,85% para os soros coletados com sete ou mais dias depois do aparecimento dos primeiros sintomas (tabela 3). O sinal dos controles negativos permaneceu abaixo da linha de corte em ambos os testes.

² os resultados detalhados obtidos com todos os ensaios realizados estão listados no apêndice 2

TABELA 3 - Detecção de IgM contra o vírus da dengue através de MAC-ELISA utilizando dois antígenos distintos

dias ^a	nº de amostras positivas	
	antígeno 1 ^b	antígeno 2 ^c
0-3 (n=23)	4	5
4-6 (n=13)	3	3
≥7 (n=14)	7	6

^a número de dias após o início dos sintomas, que antecederam a coleta de sangue

^b antígeno 1: macerado de cérebro de camundongo infectado com vírus da dengue dos tipos 1, 2 e 3

^c antígeno 2: antígeno produzido em cultura celular

4.2. Diagnóstico molecular

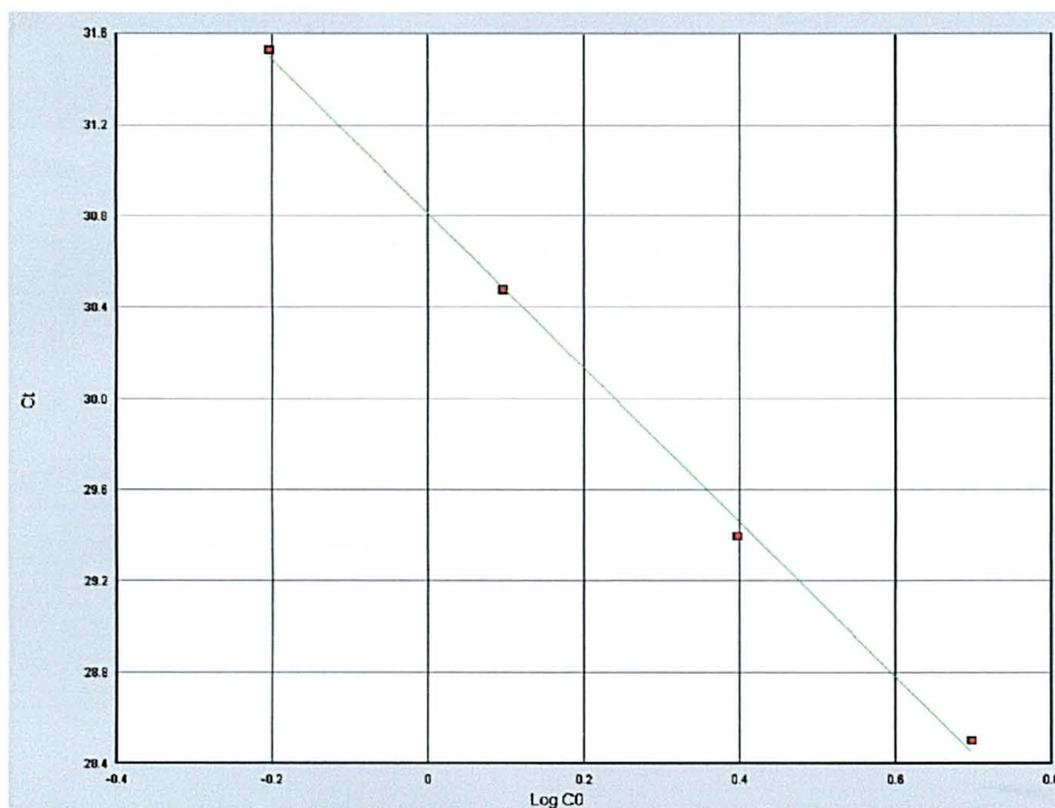
A sensibilidade e a especificidade das duas técnicas de PCR testadas foram avaliadas utilizando o RNA extraído de quatro alíquotas de soro negativo acrescidas de vírus da dengue do tipo 1 em concentrações que diferiam duas vezes entre si. Foram também usados RNAs extraídos de soros negativos para dengue, de soros de indivíduos vacinados contra febre amarela e de vírus da dengue do tipo 2 purificado após propagação em cultura celular.

No ensaio de PCR em tempo real, o RNA do vírus da dengue do tipo 1 foi detectado em todas as amostras controles (figura 8). Mesmo a concentração mais baixa utilizada (53,6 FFU/ml, equivalente a 0,625 FFU na reação) permaneceu dentro da faixa de linearidade na curva padrão, a qual teve um coeficiente de regressão linear de 0,99 (figura 7). A diferença entre os Cts de cada um dos quatro padrões da série (calculada com base na média dos resultados de três ensaios

reprodutíveis) foi, em média, de 1,06, o que corresponde a uma diminuição do título viral de 2,08 vezes, indicando uma boa correlação entre Ct e concentração do vírus.

Através do ensaio de *nested* PCR foram detectadas apenas as amostras contendo, na reação, uma quantidade de RNA correspondente a 5 e 2,5 FFU (equivalente a 428,6 e 214,3 FFU/ml, respectivamente) (figura 8).

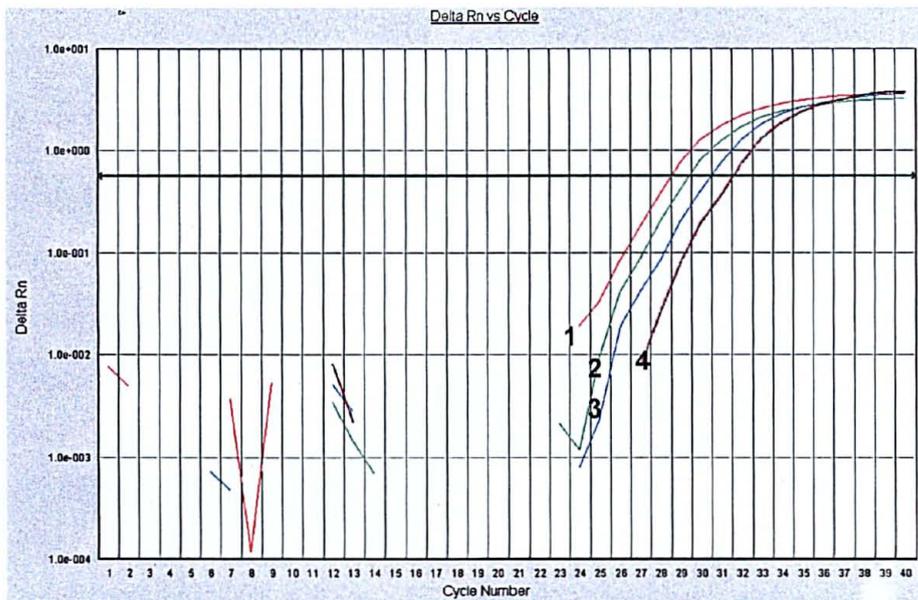
FIGURA 7 - Curva padrão mostrando a correlação entre o número de cópias iniciais e o valor do Ct na PCR em tempo real para DEN1



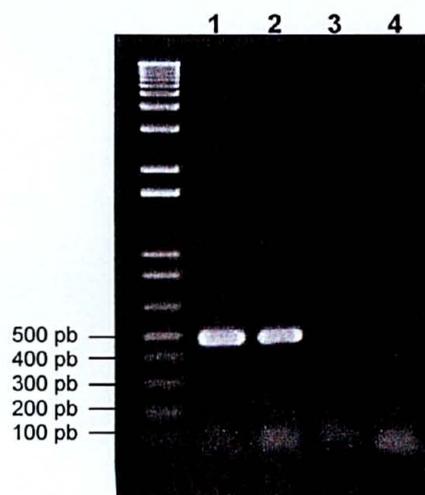
A quantidade de cópias iniciais acrescentada a cada reação foi de 5, 2,5, 1,25 e 0,625, e está representada no eixo x. O valor do Ct obtido para cada reação está indicado no eixo y.

FIGURA 8 - Sensibilidade dos métodos de diagnóstico molecular na detecção do vírus da dengue do tipo 1

A



B



A) amplificação dos controles por PCR em tempo real. O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. B) controles submetidos à amplificação por *nested* PCR visualizados em gel de agarose 1,5%. As linhas do gráfico (A) e as canaletas do gel de agarose (B) mostram, da esquerda para a direita, o resultado da amplificação de 5 (1), 2,5 (2), 1,25 (3) e 0,625 (4) FFU, através de PCR em tempo real e *nested* PCR, respectivamente.

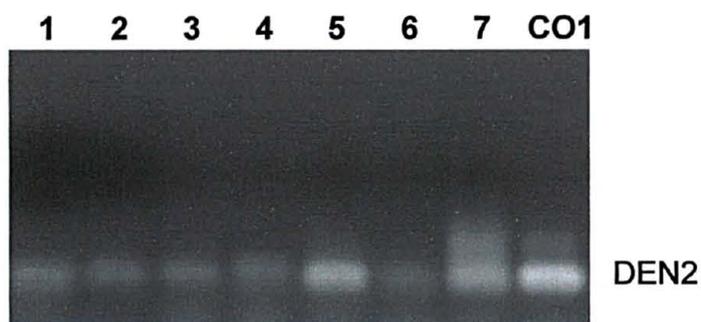
O ensaio de *nested* PCR com o RNA extraído diretamente do soro resultou na amplificação de bandas inespecíficas de tamanhos muito próximos ao tamanho esperado para a banda de dengue tipo 2 (DEN2), o que dificultou o diagnóstico através desse método. Esse problema pôde, em parte, ser resolvido submetendo as amostras amplificadas a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, em vez de gel de agarose 1,5% conforme havia sendo, tradicionalmente, utilizado. Amostras que não apresentaram uma banda de tamanho exatamente igual ao da banda do controle positivo para DEN2, foram, então, consideradas negativas (figura 9).

A correta sorotipagem dos vírus purificados dos tipos 1 e 2 na *nested* PCR e a falha em amplificar o RNA extraído dos controles negativos para dengue demonstraram a especificidade desse método.

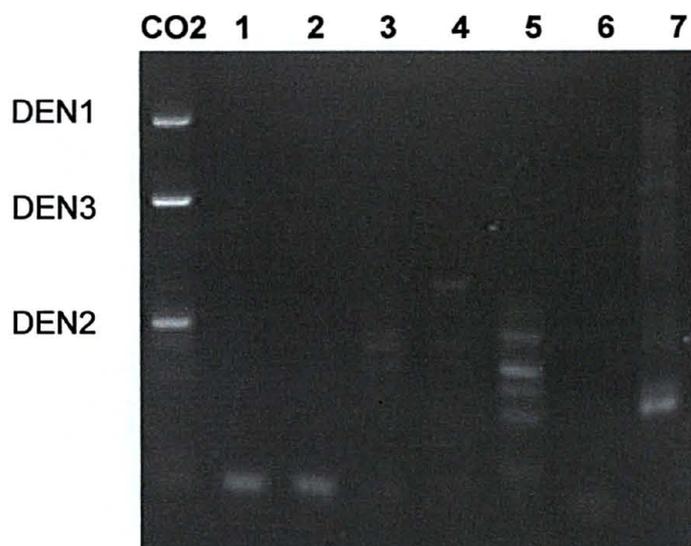
A PCR em tempo real, no entanto, apesar de amplificar corretamente as amostras padrões de DEN1 e não amplificar os controles negativos e de DEN2, detectou como positivos para DEN1 dois dos três indivíduos vacinados para febre amarela.

FIGURA 9 - Amostras amplificadas por *nested* PCR visualizadas em géis de agarose e poliacrilamida

A



B



A) gel de agarose 1,5%; B) gel de poliacrilamida 8%; CO1) controle positivo para DEN2; CO2) controles positivos para DEN1, DEN3 e DEN2.

Números iguais (1 a 7) representam as mesmas amostras.

NOTA: após análise em gel de poliacrilamida, nenhuma das amostras acima foi considerada positiva.

A fim de avaliar os dois métodos de PCR quanto a sua capacidade em detectar o RNA do vírus da dengue em amostras clínicas, foram utilizados os RNAs extraídos do mesmo painel de soros testado por ELISA, antes e após passagem dos mesmos em cultura. Os resultados da PCR em tempo real de DEN1 e da *nested* PCR feitas com os RNAs isolados de soros passados ou não em cultura foram comparados entre si. A *nested* PCR com os RNAs extraídos das amostras passadas em cultura foi feita anteriormente no Instituto de Biologia Molecular do Paraná e os resultados cedidos para essa análise.

Comparando os resultados obtidos com uma mesma técnica de PCR, utilizando RNAs isolados de fontes diferentes (soro e cultura celular) e através de metodologias distintas (kit e fenol/clorofórmio, respectivamente) notou-se que, para a maioria dos casos, a porcentagem de detecção do RNA viral foi maior entre as amostras passadas por cultura (tabelas 4, 5 e 6). No entanto, três indivíduos tipados como positivos para DEN1 na PCR em tempo real usando o RNA extraído diretamente do soro, foram considerados negativos quando os RNAs extraídos das células de cultura foram submetidos à mesma técnica (tabela 4).

Das cinco amostras amplificadas a partir do RNA extraído do soro na *nested* PCR (tabela 6), apenas três tiveram tipagem igual àquela obtida para o teste feito após passagem do soro em cultura. As duas amostras discordantes foram tipadas como dengue do tipo 2 no soro e do tipo 1 e 3 na cultura.

TABELA 4 - Detecção do vírus da dengue do tipo 1 por PCR em tempo real, utilizando RNAs extraídos antes e após passagem dos soros em cultura celular

dias ^a	nº de amostras positivas para dengue 1	
	soro ^b	cultura ^c
0-3 (n=23)	1	5
4-6 (n=13)	5	4
≥7 (n=14)	0	3
total (n=50)	6	12

^a número de dias após o início dos sintomas, que antecederam a coleta de sangue

^b resultados obtidos com os RNAs extraídos diretamente do soro dos pacientes

^c resultados obtidos com os RNAs extraídos de cultura de células incubadas com soro de paciente

TABELA 5 - Detecção do vírus da dengue do tipo 1 por *nested* PCR, utilizando RNAs obtidos de duas maneiras distintas

dias ^a	nº de amostras positivas para dengue 1	
	soro ^b	cultura ^c
0-3 (n=23)	0	6
4-6 (n=13)	1	2
≥7 (n=14)	0	1
total(n=50)	1	9

Legenda: ver tabela 4

TABELA 6 - Detecção dos quatro sorotipos de vírus da dengue por *nested* PCR, utilizando RNAs obtidos de duas maneiras distintas

dias ^a	nº de amostras positivas para dengue	
	soro ^b	cultura ^c
0-3 (n=23)	4	23
4-6 (n=13)	1	13
≥7 (n=14)	0	4
total (n=50)	5	40

Legenda: ver tabela 4

A comparação entre os dois métodos de diagnóstico molecular permitiu constatar que, pela técnica de PCR em tempo real, um número maior de amostras foi detectado como positivo para DEN1, tanto entre aquelas cujo RNA foi extraído a partir do soro (tabela 7) como entre as amostras cujo RNA foi extraído após passagem em células de cultura (tabela 8). Houve uma grande discordância entre as tipagens dos RNAs isolados de cultura feitas por PCR em tempo real e por *nested* PCR (tabela 8). Das nove amostras tipadas como dengue 1 na *nested* PCR, apenas duas tiveram a mesma tipagem na PCR em tempo real. Das outras dez amostras tipadas como dengue 1 pela PCR em tempo real, sete foram consideradas dengue do tipo 2 ou 3 e três foram consideradas negativas pela *nested* PCR, o que representa uma discordância na tipagem de 77,8%.

TABELA 7 - Detecção do RNA do vírus da dengue em soro de paciente, através de dois métodos diagnósticos distintos

dias ^a	nº de amostras positivas para dengue 1	
	PCR em tempo real	<i>nested</i> PCR
0-3 (n=23)	1	0
4-6 (n=13)	5	1
≥7 (n=14)	0	0
total (n=50)	6	1

^a número de dias após o início dos sintomas, que antecederam a coleta de sangue

TABELA 8 - Detecção do RNA do vírus da dengue do tipo 1 em células C6/36 incubadas com soro de paciente, através de dois métodos diagnósticos distintos

dias	nº de amostras positivas para dengue 1	
	PCR em tempo real	<i>nested</i> PCR
0-3 (n=23)	5	6
4-6 (n=13)	4	2
≥7 (n=14)	3	1
total (n=50)	12	9

Legenda: ver tabela 7

Com o objetivo de testar a capacidade da técnica de PCR em tempo real de determinar a concentração viral no soro dos pacientes, a amplificação de todas as amostras nesse ensaio se deu paralelamente à amplificação de seis amostras controles, que tiveram o RNA extraído de alíquotas de soro contendo quantidades conhecidas de vírus da dengue do tipo 1. Segundo a quantificação feita através desse método, a carga viral dos pacientes analisados variou de $4,97 \times 10^{-2}$ a $3,06 \times 10^2$ FFU/ml.

4.3. Sorologia e PCR

A detecção de anticorpos IgM específicos para dengue, feita através de MAC-ELISA com antígenos produzidos em cultura celular, foi comparada com a detecção do RNA viral feita por *nested* PCR. De acordo com a tabela 9, é possível observar que, para as amostras coletadas entre os dias 0 e 6, uma maior porcentagem de resultados positivos foi obtida com a *nested* PCR feita após passagem dos soros em cultura. Já para as amostras coletadas após o dia sete, a maior quantidade de casos positivos foi detectada pelo teste de MAC-ELISA.

TABELA 9 - Comparação entre diagnóstico sorológico e molecular de dengue

dias ^a	n ^o de amostras positivas		
	sorologia cultura ^b	<i>nested</i> soro ^c	<i>nested</i> cultura ^d
0-3 (n=23)	5	4	23
4-6 (n=13)	3	1	13
≥7 (n=14)	6	0	4
total (n=50)	14	5	40

^a número de dias após o início dos sintomas, que antecederam a coleta de sangue

^b teste sorológico (MAC-ELISA) feito com antígeno produzido em cultura celular

^c *nested* PCR feita com RNAs extraídos diretamente do soro dos pacientes

^d *nested* PCR feita com RNAs extraídos de cultura de células incubadas com soro de paciente

5. DISCUSSÃO

Nos últimos 60 anos, a incidência, distribuição e severidade da dengue aumentaram drasticamente, sendo, hoje, considerada a mais importante arbovirose em termos de morbidade e mortalidade mundiais (GIBBONS; VAUGHN, 2002). A co-circulação de diferentes sorotipos do vírus em várias partes do mundo aumentou a preocupação com relação à ocorrência de formas mais severas da doença e estratégias eficientes de detecção em seu estágio inicial tornaram-se imprescindíveis para o diagnóstico precoce e controle dessa patogenia (WANG *et al.*, 2000).

Devido a sua simplicidade e rapidez, a detecção de anticorpos IgM contra o vírus da dengue através de ELISA tornou-se, atualmente, um dos métodos diagnósticos mais utilizados (GUBLER, 1998). Ao contrário da maioria dos testes sorológicos, o MAC-ELISA não necessita de amostras pareadas e pode ser feito com uma única diluição de soro, sem nenhum tratamento prévio. Níveis detectáveis de IgM já se encontram presentes, para a maioria dos pacientes, a partir do quinto dia da doença e persistem por 2 ou 3 meses (GUZMÁN; KOURI, 1996), possibilitando a utilização do teste com amostras coletas durante vários dias após a início dos sintomas.

Apesar de suas facilidades e vantagens, a performance do ensaio pode ser severamente afetada pela qualidade dos reagentes utilizados (VORNDAM; KUNO, 1997). A dificuldade de obtenção de reagentes de alta qualidade faz com que muitos pequenos laboratórios e unidades de saúde dependam dos insumos produzidos por poucos centros com recursos e tecnologia para tal.

Nesse trabalho, um método de obtenção de antígenos virais em cultura celular foi desenvolvido e padronizado. A performance desses antígenos, em um teste de MAC-ELISA produzido por Bio-Manguinhos, foi comparável à do antígeno originalmente utilizado no teste (macerado de cérebro de camundongo infectado). Apenas duas amostras, das 50 analisadas, apresentaram resultados discordantes. Ambas foram testadas em um ensaio de *dot-blot* para detecção de IgG (dado não apresentado), o qual confirmou os resultados do teste feito com os antígenos produzidos em cultura, sugerindo que o teste feito com macerado de cérebro de camundongo forneceu um resultado falso-positivo e um falso-negativo. Portanto, a técnica de produção de antígenos desenvolvida nesse trabalho, além de ser mais segura e simples e de estar livre dos aspectos éticos inerentes à utilização de animais em laboratório, parece ser, também, um método de obtenção de antígenos de melhor qualidade, resultando em um teste mais sensível e específico. A tecnologia de obtenção de antígenos em cultura poderá ser facilmente empregada em larga escala, a fim de substituir, efetivamente, a técnica de produção envolvendo a inoculação intracerebral de camundongos. Apesar dessa substituição já representar um avanço para o diagnóstico da dengue no país, outras modificações, como a utilização de anticorpos e antígenos recombinantes, que seriam mais facilmente disponibilizados e tornariam o teste ainda mais sensível, específico e reprodutível, já estão sendo pesquisadas no Instituto de Biologia Molecular do Paraná e, acredita-se, serão, em breve, introduzidas.

A detecção do RNA do vírus da dengue através de RT-PCR vem sendo cada vez mais utilizada como um método diagnóstico (PAULA *et al.* 2002a). Essa técnica é menos influenciada por problemas de armazenamento e manipulação do soro e pela presença de anticorpos neutralizantes do que o isolamento viral, além de ser

capaz de fornecer resultados em um período de tempo consideravelmente mais curto (GUBLER, 1998). Com relação aos métodos sorológicos, a vantagem da RT-PCR reside no fato da técnica possibilitar a sorotipagem do vírus infectante e permitir o diagnóstico da doença em sua fase inicial, antes mesmo dos anticorpos atingirem níveis detectáveis (DEUBEL, 1992). Recentemente, o desenvolvimento da tecnologia de PCR em tempo real possibilitou uma maior automação do processo, conferindo ainda maior rapidez e reprodutibilidade à tradicional técnica de PCR (MACKAY *et al.*, 2002). Alguns protocolos utilizando essa metodologia para o diagnóstico da dengue ou para a quantificação do RNA viral já foram descritos (CALLAHAN *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2001; DROSTEN *et al.*, 2002; HOUNG *et al.*, 2000; LAUE *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003).

No presente estudo, um protocolo de PCR em tempo real para a detecção do vírus da dengue do tipo 1 em amostras clínicas passadas ou não em cultura celular foi desenvolvido e comparado com um teste para detecção e tipagem, baseado em *nested* PCR, descrito por LANCIOTTI *et al.* (1992).

O maior número de resultados positivos entre as amostras que foram passadas em cultura, nos dois testes, indica que vários dos soros testados apresentavam carga viral inferior aos limites de detecção de ambas as técnicas. No entanto, a alta sensibilidade do método de PCR em tempo real mostrou compensar, em parte, esse problema, pois uma menor discrepância entre os resultados positivos pôde ser observada para este ensaio, principalmente para as amostras coletadas entre os dias 4 e 6. Apesar da amplificação do vírus em cultura representar um aumento na taxa de detecção de ambas as técnicas, seu uso é limitante, uma vez que torna o diagnóstico lento e introduz mais uma etapa passível de contaminação. Uma abordagem alternativa à passagem do soro em cultura seria o uso da PCR em

tempo real com amostras coletadas, preferencialmente, entre o quarto e o sexto dia após o início dos sintomas.

O fato de que três amostras foram consideradas positivas para DEN1 segundo a PCR em tempo real feita com os RNAs extraídos do soro e negativas quando esse mesmo ensaio foi feito com os RNAs isolados de células de cultura, sugere uma possível contaminação no primeiro caso, ou falha na amplificação, gerada por erro de manipulação ou por degradação do RNA, no segundo caso. Como todas as amplificações por PCR em tempo real foram feitas pelo menos em duplicata e os resultados entre as replicas permaneceu igual, a chance de que as diferenças tenham sido ocasionadas por erros de manipulação pode ser considerada baixa. Como os RNAs obtidos a partir de células C6/36 haviam sido isolados já há certo tempo e alguns deles haviam sido submetidos a mais de um ciclo de congelamento e descongelamento, a possibilidade de degradação dos mesmos não pode ser descartada. Problemas de contaminação na *nested* PCR e de falta de estabilidade do RNA poderiam, também, explicar o fato de que sete amostras, que tiveram seus RNAs extraídos de cultura, foram tipadas como DEN1 apenas pela *nested* PCR, que foi feita imediatamente após a extração do RNA, e não pela PCR em tempo real. Já a tipagem de dez dessas amostras como DEN1 pela PCR em tempo real e como DEN2, DEN3 ou negativas pela *nested* PCR, pode ser atribuída a maior sensibilidade do primeiro método em relação ao segundo, ou a problemas de contaminação nos dois testes.

Um estudo comparativo entre quatro métodos diagnósticos para dengue baseados em PCR, revelou que a técnica de *nested* PCR descrita por LANCIOTTI *et al.* (1992) falhou em detectar 30% dos vírus da dengue do tipo 1 (RAENGSAKULRACH *et al.*, 2002). Apesar do iniciador específico para DEN1 (TS1)

utilizado no presente trabalho ter sido modificado com relação ao originalmente proposto por LANCIOTTI *et al.* (1992), a comparação das seqüências dos iniciadores não específicos (D1 e D2) com as seqüências das cepas brasileiras de vírus da dengue do tipo 1 depositadas nos bancos de dados, revelou a existência de quatro bases divergentes entre o iniciador D2 e essas seqüências, o que poderia estar contribuindo para a ineficiência desse método. De fato, um grande número de resultados falso-negativos pode ser obtido caso a seqüência de várias cepas não sejam consideradas para a escolha inicial dos oligonucleotídeos (CALLAHAN *et al.*, 2001). Tal cuidado foi tomado na escolha dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real, sendo que os três apresentaram similaridade de 100% com as seqüências de todas as cepas brasileiras.

As contaminações, por sua vez, apesar de não poderem ser descartadas, são muito menos prováveis de acontecer em ensaios de PCR em tempo real do que em uma *nested* PCR, onde as várias etapas envolvidas aumentam consideravelmente a chance de sua ocorrência (DROSTEN *et al.*, 2002). O grande número de resultados positivos obtidos através da metodologia de *nested* PCR com as amostras passadas em cultura pode ser um indício da existência de contaminação nesses ensaios, apesar de terem sido utilizados controles negativos em todos eles.

As bandas de baixa massa molecular amplificadas não especificamente, que apresentavam tamanho próximo ao esperado para a banda específica de DEN2, geraram resultados duvidosos quando os produtos das ampliações foram analisados em gel de agarose. A presença dessas bandas foi fortemente evidenciada quando os RNAs isolados diretamente do soro foram utilizados, sugerindo que ela poderia estar relacionada ao método de extração do RNA. No

entanto, esse fenômeno pode, também, ter ocorrido, ainda que em menor frequência, quando a amplificação foi feita com os RNAs extraídos das células de cultura, levando à interpretação incorreta dos dados obtidos com essas reações. Mesmo após a análise das amplificações feitas com os RNAs extraídos do soro em gel de poliacrilamida 8%, algumas interpretações podem, ainda, estar erradas devido à grande proximidade de certas bandas com a banda controle de DEN2. A subjetividade requerida na interpretação dos resultados obtidos com a *nested* PCR pode explicar várias das discrepâncias observadas. Além disso, RAENGSAKULRACH *et al.* (2002) sugeriram que as diferenças nas tipagens, obtidas quando quatro protocolos de PCR para detecção do vírus da dengue foram comparados, poderiam ser explicadas tanto pela infecção simultânea de um mesmo paciente por diferentes sorotipos do vírus, fenômeno não raro em áreas onde vários sorotipos co-circulam (GUBLER *et al.*, 1985; LORONO-PINO *et al.*, 1999), como pela presença de um único vírus com genoma recombinante, fato também comumente observado em populações naturais do vírus (CRAIG *et al.*, 2003; TOLOU *et al.*, 2001; TWIDDY; HOLMES, 2003; WOROBEY *et al.*, 1999).

Apesar dos oligonucleotídeos utilizados na PCR em tempo real de DEN1 não apresentarem similaridade com seqüências de outros flavivírus, sendo, inclusive, incapazes de amplificar o cDNA do vírus da dengue do tipo 2, duas das amostras de febre amarela foram amplificadas por esse ensaio. Mudanças nas condições da PCR, como, por exemplo, aumento na temperatura de anelamento dos iniciadores, podem ser feitas na tentativa de eliminar essas amplificações inespecíficas. Porém, cuidados devem ser tomados para que essas alterações não reduzam a sensibilidade do método.

Embora pequenas modificações pareçam ser suficientes para validar a técnica de PCR em tempo real como um eficiente método diagnóstico, o desenvolvimento de um teste quantitativo confiável depende, ainda, de estudos mais cuidadosos com relação à estabilidade dos padrões e à eficiência da extração do RNA e das reações de transcrição reversa e de PCR. A determinação da carga viral, apesar de não ser imprescindível para o diagnóstico da dengue, pode ser útil em estudos de interação parasita-hospedeiro, na melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com a patogênese da doença, no monitoramento do efeito de possíveis vacinas e no prognóstico da infecção, uma vez que associações entre título da viremia e severidade da doença já foram sugeridas (GUBLER, 1997; HALSTEAD, 1988; VAUGHN *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2003).

Apenas uma das amostras detectadas como positivas através da *nested* PCR e da PCR em tempo real feitas com os RNAs isolados diretamente do soro foi também positiva para IgM. Essa observação, juntamente com o fato de que o teste de MAC-ELISA detectou um maior número de amostras positivas entre os soros coletados após o sétimo dia da doença e as PCRs entre os soros coletados antes do sétimo dia, confirma a existência de uma relação inversa entre detecção do vírus e aumento do título de anticorpos específicos no soro de pacientes infectados (CHAN *et al.*, 1994; PAULA *et al.*, 2002b; INNIS *et al.*, 1989). Conforme sugerido pela literatura, a coleta de amostras para detecção de vírus deve ser feita, preferencialmente, antes do quinto dia após o início dos sintomas (GUZMÁN; KOURI, 1996). A maior sensibilidade da PCR em tempo real, no entanto, parece ter aumentado o período de detecção do vírus do tipo 1, já que enquanto apenas uma amostra, coletada entre os dias 4 e 6, foi positiva para dengue 1 na *nested* PCR, cinco foram positivas na PCR em tempo real, utilizando os RNAs extraídos do soro.

6. CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho indicam que antígenos virais produzidos em cultura de células podem substituir, com vantagens, antígenos produzidos em cérebro de camundongo em um teste de captura de IgM para o diagnóstico da dengue. A utilização da cultura celular permite a rápida obtenção de uma grande quantidade de antígenos de boa qualidade, sem que haja a necessidade de se recorrer à manipulação e ao sacrifício de animais.

A baixa taxa de detecção da *nested* PCR feita com os RNAs isolados diretamente dos soros, sugere que a amplificação dos vírus em cultura celular, antes da extração do RNA, é um procedimento indispensável para essa técnica. Essa exigência faz com que o método torne-se consideravelmente mais lento e ainda mais sujeito a contaminações. Além disso, a dificuldade de interpretação dos resultados faz com que essa abordagem não seja considerada a mais adequada para o diagnóstico da dengue.

A metodologia de PCR em tempo real revelou ser uma boa ferramenta para o diagnóstico, com as vantagens de ser mais rápida, mais sensível e menos sujeita a contaminações do que a *nested* PCR. Pequenos ajustes nas condições da reação parecem ser suficientes para a otimização do método. No entanto, sua completa validação só será possível quando o mesmo painel de soros for também submetido aos ensaios de PCR em tempo real para a detecção dos vírus da dengue dos tipos 2 e 3 e quando amostras confirmadas como positivas através de isolamento viral forem usadas. A baixa carga viral e a curta viremia características da infecção por dengue e a existência de múltiplas cepas circulando em um mesmo local, porém,

dificultam o estabelecimento de um método totalmente eficiente para a detecção do RNA viral.

O fato de que um maior número de amostras coletadas após o sétimo dia foi considerado positivo pelo MAC-ELISA, enquanto mais amostras coletadas antes do sétimo dia foram positivas para as PCRs, sugere que, isoladamente, nenhuma dessas técnicas é completamente eficiente no diagnóstico da dengue e que um diagnóstico mais correto só poderá ser obtido se os métodos sorológico e molecular forem utilizados em conjunto.

REFERÊNCIAS

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376-381, 2002.

BRINTON, M. A.; KURANE, I.; MATHEW, A.; ZENG, L.; SHI, P. Y.; ROTHMAN, A.; ENNIS, F. A. Immune mediated and inherited defenses against flaviviruses. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 10, p. 129-139, 1998.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.

CALLAHAN, J. D.; WU, S-J. L.; DION-SHULTZ, A.; MANGOLD, B. E.; PERUSKI, L. F.; WATTS, D. M.; PORTER, K. R.; MURPHY, G. R.; SUHARYONO, W.; KING, C-C.; HAYES, C. G.; TEMENAK, J. J. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4119-4124, 2001.

CARDOSA, M. J.; BAHARUDIN, F.; HAMILD, S.; HOOL, T. P.; NIMMANNITYA, S. A nitrocellulose membrane based IgM capture enzyme immunoassay for etiological diagnosis of dengue virus infections. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 3, p. 343-350, 1995.

CHAN, Y. C.; KAUTNER, I. M.; LAM, S. K. The influence of antibody levels in dengue diagnosis by polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 49, p. 315-322, 1994.

CHEN, R-F.; YEH, W-T.; YANG, M-Y.; YANG, K. D. A model of the real-time correlation of viral titers with immune reactions in antibody-dependent enhancement of dengue-2 infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 30, p. 1-7, 2001.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; ESKO, J. D.; LINHARDT, R. J.; MARKS, R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nature Medicine**, v. 3, p. 866-871, 1997.

CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; MARKS, R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. **Journal of Virology**, v. 70, n. 12, p. 8765-8772, 1996.

CRAIG, S.; THU, H. M.; LOWRY, K.; WANG, X. F.; HOLMES, E. C.; AASKOV, J. Diverse dengue type 2 virus populations contain recombinant and both parental viruses in a single mosquito host. **Journal of Virology**, v. 77, n. 7, p. 4463-4467, 2003.

CUZZUBBO, A. J.; ENDY, T. P.; NISALAK, A.; KALAYANAROOJ, S.; VAUGHN, D. W.; OGATA, S. A.; CLEMENTS, D. E.; DEVINE, P. L. Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of dengue virus infection in an immunocromatographic assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1150-1155, 2001.

DEUBEL, V. Recent advances and prospective researches on molecular epidemiology of dengue viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87, n. 5, p. 133-136, 1992.

DROSTEN, C.; GÖTTING, S.; SCHILLING, S.; ASPER, M.; PANNING, M.; SCHMITZ, H.; GÜNTHER, S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2323-2330, 2002.

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

GERMI, R.; CRANCE, J-M.; GARIN, D.; GUIMET, J.; LORTAT-JACOB, H.; RUIGROK, R. W. H.; ZARSKI, J-P.; DROUET, E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, p. 162-168, 2002.

GIBBONS, R.; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **BMJ**, v. 324, p. 1563-1566, 2002.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, 1995.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; WATERMAN, S. H. A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 1, p. 170-173, 1985.

GUBLER, D. J.; SATHER, G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. **Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue**, Rio de Janeiro, Brazil, 1988.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621-627, 1996.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p. 476-481, 1988.

HARRIS, E.; ROBERTS, T. G.; SMITH, L.; SELLE, J.; KRAMER, L. D.; VALLE, S.; SANDOVAL, E.; BALMASEDA, A. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2634-2639, 1998.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HENCHAL, E. A.; POLO, S. L.; VORNDAM, V.; YAEMSIRI, C.; INNIS, B. L.; HOKE, C. H. Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 4, p. 418-428, 1991.

HOUNG, H. H.; HRITZ, D.; KANESA-THASAN, N. Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic 3'-noncoding sequence. **Journal of Virological Methods**, v. 86, n. 1, p. 1-11, 2000.

INNIS, B. L.; NISALAK, A.; NIMMANNITYA, S.; KUSALERDCHARIYA, S.; CHONGSWASDI, V.; SUNTAYAKORN, S.; PUTTISRI, P.; HOKE, H. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and japanese encephalitis co-circulate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 4, p. 418-427, 1989.

KUNO, G.; BAILY, R. E. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 179-182, 1994.

KURANE, I.; ENNIS, F. A. Cytokines in dengue virus infections: role of cytokines in pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Seminars in Virology**, v. 5, p. 443-448, 1994.

KURANE, I.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; NISALAK, A.; MEAGER, A.; JANNUS, J.; ENNIS, F. A. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections: high levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2 and interferon gamma in sera of children with dengue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1473-1480, 1991.

LAM, S. K.; EW, C. L.; MITCHELL, J. L.; CUZZUBBO, A. J.; DEVINE, P. L. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 5, p. 850-852, 2000.

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

LAUE, T.; EMMERICH, P.; SCHMITZ, H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2543-2547, 1999.

LEITMEYER, K. C.; VAUGHN, D. W.; WATTS, D. M.; SALAS, R.; CHACON, I. V.; RAMOS, C.; RICO-HESS, R. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, 1999.

LORONO-PINO, M. A.; CROPP, C. B.; FARFAN, J. A.; VORNDAM, A. V.; RODRIGUEZ-ANGULO, E. M.; ROSADO-PAREDES, E. P.; FLORES-FLORES, L. F.; BEATY, B. J.; GUBLER, D. J. Common occurrence of concurrent infections by multiple dengue virus serotypes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 5, p. 725-730, 1999.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCH, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MIAGOSTOVICH, M. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; dos SANTOS, F. B.; SCHATZMAYR, H. G.; ARAÚJO, E. S. M.; VORNDAM, V. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, v. 14, p. 183-189, 1999.

PALMER, C. J.; KING, S. D.; CUADRADO, R. R.; PEREZ, E.; BAUM, M.; AGER, A. L. Evaluation of the MRL diagnostics dengue fever virus IgM capture ELISA and the PanBio rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1600-1601, 1999.

PAULA, S. O.; LIMA, D. M.; FONSECA, B. A. L. Detection and identification of dengue-1 virus in clinical samples by a nested-PCR followed by restriction enzyme digestion of amplicons. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 529-534, 2002(a).

PAULA, S. O.; NETO, R. J. P.; CORRÊA, J. A. C. T.; ASSUMPÇÃO, S. R.; COSTA, M. L. S.; LIMA, D. M.; FONSECA, B. A. L. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and identification of dengue virus in an endemic region: a validation study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 266-269, 2002(b).

RAENGSAKULRACH, B.; NISALAK, A.; MANEEKARN, N.; YENCHITSOMANUS, P.-T.; LIMSOMWONG, C.; JAIRUNGSRI, A.; THIRAWUTH, V.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P.; VAUGHN, D. W. Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 219-232, 2002.

RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.

RICO-HESSE, R.; HARRISON, L. M.; SALAS, R. A.; TOVAR, D.; NISALAK, A.; RAMOS, C.; BOSHELL, J.; MESA, M. T. R.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. T. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, p. 244-251, 1997.

ROEHRIG, J. T. Immunochemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

ROTHMAN, A. L.; Viral pathogenesis of dengue infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Virology**, v. 257, p. 1-6, 1999.

SANTOS, C. N. D.; ROCHA, C. F. S.; CORDEIRO, M.; FRAGOSO, S. P.; REY, F.; DEUBEL, V.; DESPRÈS, P. Genome analysis of dengue type-1 virus isolated between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. **Virus Research**, v. 90, p. 197-205, 2002.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and other emerging flaviviruses. **Journal of Infection**, v. 42, p. 104-115, 2001.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

THULLIER, P.; DEMANGEL, C.; BEDOUELLE, H.; MÉGRET, F.; JOUAN, A.; DEUBEL, V.; MAZIÉ, J-C.; LAFAYE, P. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1885-1892, 2001.

TOLOU, H. J. G.; COUISSINIER-PARIS, P.; DURAND, J-P.; MERCIER, V.; PINA, J-J.; MICCO, P.; BILLOIR, F.; CHARREL, R. N.; LAMBALLERIE, X. Evidence for recombination in the natural populations of dengue virus type 1 based on the analysis of complete genome sequences. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1283-1290, 2001.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 429-440, 2003.

VALDÉS, K.; ALVAREZ, M.; PUPO, M.; VÁSQUEZ, S.; RODRÍGUEZ, R.; GUZMÁN, M. G. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 5, p. 856-857, 2000.

VAUGHN, D. W.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; INNIS, B. L.; NIMMANNITYA, S.; SUNTAYAKORN, S.; ENDY, T. P.; RAENGSAKULRACH, B.; ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F.; NISALAK, A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2-9, 2000.

VAUGHN, D. W.; NISALAK, A.; SOLOMON, T.; KALAYANAROOJ, S.; DUNG, N. M.; KNEEN, R.; CUZZUBBO, A.; DEVINE, P. Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 4, p. 693-698, 1999.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

WANG, H. L.; LIN, K. H.; YUEH, Y. Y.; CHOW, L.; WU, Y. C.; CHEN, H. Y.; SHEU, M. M.; CHEN, W. J. Efficient diagnosis of dengue infections using patients' peripheral blood leukocytes and serum/plasma. **Intervirology**, v. 43, p. 107-111, 2000.

WANG, W. K.; CHAO, D. Y.; KAO, C. L.; WU, H. C.; LIU, Y. C.; LI, C. M.; LIN, S. C.; HO, S. T.; HUANG, J. H.; KING, C. C. High levels of plasma dengue viral load during defervescence in patients with dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **Virology**, v. 305, n. 2, p. 330-338, 2003.

WANG, W. K.; SUNG, T. L.; TSAI, Y. C.; KAO, C. L.; CHANG, S. M.; KING, C. C. Detection of dengue virus replication in peripheral blood mononuclear cells from dengue virus type 2-infected patients by a reverse transcription-real-time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4472-4478, 2002.

WATTS, D. M.; PORTER, K. R.; PUTVATANA, P.; VASQUEZ, B.; CALAMPA, C.; HAYES, C. G.; HALSTEAD, S. B. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue hemorrhagic fever. **The Lancet**, v. 354, p. 1431-1434, 1999.

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

WOROBAY, M.; RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C. Widespread intra-serotype recombination in natural populations of dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, p. 7352-7357, 1999.

WU, S-J. L.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J. R.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOUDER, M. K.; FILGUEIRA, L.; MAROVICH, M. A.; WONG, H. K.; BLAUVELT, A.; MURPHY, G. S.; ROBB, M. L.; INNES, B. L.; BIRX, D. L.; HAYES, C. G.; FRANKEL, S. S. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816-820, 2000.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Composição do gel de poliacrilamida 8%.....	58
APÊNDICE 2 – Resultados obtidos através dos diferentes métodos diagnósticos testados.....	60

APÊNDICE 1 – Composição do gel de poliacrilamida 8%

APÊNDICE 1 - Composição do gel de poliacrilamida 8%

Água.....	62,7 ml
Acrilamida:bisacrilamida (29:1).....	26,6 ml
TBE 10X.....	10 ml
APS (persulfato de amônio) 10%.....	0,7 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-1,2-diaminometano).....	35 µl

TBE 10X

Tris-base.....	890 mM
Ácido bórico.....	890 mM
EDTA (ácido etileno-diamino tetracético) pH 8,0.....	20 mM

APS 10%

Persulfato de amônio.....	1 g
Água para um volume final de 10 ml	

**APÊNDICE 2 - Resultados obtidos através dos diferentes
métodos diagnósticos testados**

**APÊNDICE 2 - Resultados obtidos através dos diferentes métodos diagnósticos
testados**

soros coletados entre 0 e 6 dias após o início dos sintomas						
resultados						
0 a 3 dias						
amostras testadas	ELISA camundongo¹	ELISA cultura²	tempo real soro (DEN1)³	nested soro⁴	tempo real cultura (DEN1)⁵	nested cultura⁶
090702	-	-	-	-	-	DEN2
7711	-	-	DEN1	-	-	DEN2
160	-	-	-	-	-	DEN3
02.00873	-	-	-	-	-	DEN3
4370	+	+	-	-	DEN1	DEN3
4290	-	-	-	-	-	DEN3
4413	-	-	-	-	-	DEN3
02.00843	-	-	-	-	DEN1	DEN2
78	-	-	-	-	-	DEN3
82	-	-	-	-	-	DEN1
02.00856	-	-	-	DEN2	-	DEN2
1080	-	-	-	-	DEN1	DEN1
369	+	+	-	-	-	DEN1
4329	-	-	-	-	-	DEN3
333	-	-	-	DEN3	-	DEN3
290	-	-	-	DEN2	-	DEN3
98	-	-	-	-	-	DEN3
IBMP4	+	+	-	-	DEN1	DEN3
4306	-	-	-	-	-	DEN2
433	+	+	-	-	-	DEN2
4247	-	-	-	-	-	DEN1
405	-	+	-	-	DEN1	DEN1
431	-	-	-	DEN2	-	DEN1
4 a 6 dias						
360	-	-	DEN1	-	-	DEN3
260	-	-	-	-	-	DEN3
145	+	+	-	-	-	DEN3
191	-	-	DEN1	-	DEN1	DEN3
IBMP22	-	-	-	-	-	DEN2
IBMP8	-	-	DEN1	-	DEN1	DEN3
609	-	-	-	-	-	DEN2
208	-	-	-	-	DEN1	DEN2
209	-	-	DEN1	DEN1	-	DEN1
4208	-	-	-	-	-	DEN1
3649	+	+	-	-	-	DEN2
198	-	-	-	-	-	DEN3
4223	+	+	DEN1	-	DEN1	DEN2

soros coletados 7 ou mais dias após o início dos sintomas						
resultados						
	ELISA camundongo ¹	ELISA cultura ²	tempo real soro (DEN1) ³	<i>nested</i> soro ⁴	tempo real cultura (DEN1) ⁵	<i>nested</i> cultura ⁶
02.00915	-	-	-	-	-	DEN2
3845	+	+	-	-	-	DEN2
IBMP18	-	NA ^{&}	-	-	-	DEN3
IBMP14	-	-	-	-	-	DEN1
4454	+	+	-	-	-	-
3650	-	-	-	-	DEN1	-
4395	-	-	-	-	DEN1	-
IBMP23	-	-	-	-	-	-
4420	-	-	-	-	-	-
02.00926	+	+	-	-	-	-
3838	+	+	-	-	-	-
3893	+	+	-	-	DEN1	-
02.00847	+	+	-	-	-	-
CON01	+	-	-	-	-	-
soros negativos						
resultados						
	ELISA camundongo ¹	ELISA cultura ²	tempo real soro (DEN1) ³	<i>nested</i> soro ⁴	tempo real cultura (DEN1) ⁵	<i>nested</i> cultura ⁶
YF01 [#]	-	-	-	-	NA	NA
YF02 [#]	-	-	DEN1	-	NA	NA
YF03 [#]	-	-	DEN1	-	NA	NA
N01	-	-	-	-	NA	NA
N02	-	-	-	-	NA	NA
N03	-	-	-	-	NA	NA
N04	-	-	-	-	NA	NA

¹ MAC-ELISA feito com o antígeno produzido em cérebro de camundongo

² MAC-ELISA feito com o antígeno produzido em cultura celular

³ PCR em tempo real de DEN1 feita com os RNAs extraídos diretamente dos soros

⁴ *nested* PCR feita com os RNAs extraídos diretamente dos soros

⁵ PCR em tempo real de DEN1 feita com os RNAs extraídos de células de cultura

⁶ *nested* PCR feita com os RNAs extraídos de células de cultura

[&] amostras não analisadas

[#] indivíduos vacinados contra febre amarela até sete dias antes da coleta do soro