

# MULTIPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E SOROTIPAGEM DE *Dengue virus* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO ESTADO DO PIAUÍ.

Vanessa de Sousa do Vale<sup>1</sup>, Gustavo Portela Ferreira<sup>2</sup>

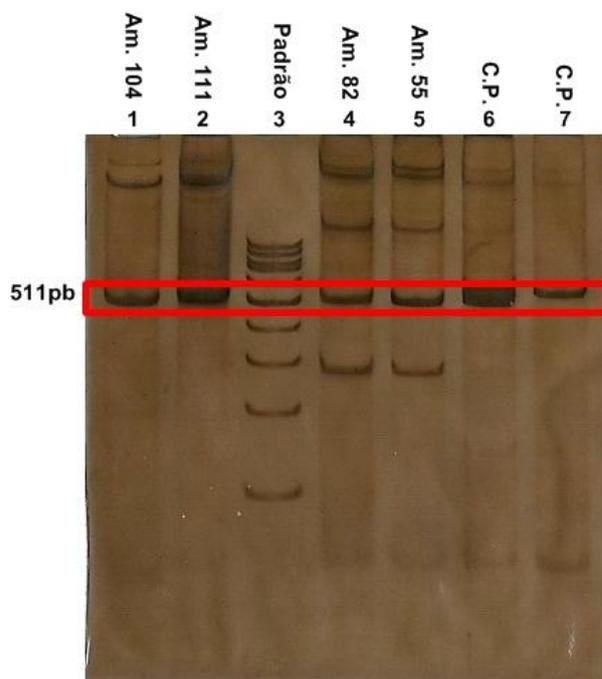
Bolsista do PIBIC/CNPq<sup>1</sup>, Orientador do Colegiado de Biomedicina da UFPI<sup>2</sup>

**INTRODUÇÃO:** O dengue é o arbovírus de maior prevalência em humanos no mundo (Deen *et al.*, 2006), seu agente etiológico é o *Dengue vírus* (DENV), pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, envelopado, icosaédrico (Gubler, D.J., 1998) e com medidas 40-60nm por AFM (Ferreira, G.P. *et al.*, 2008). A virose é um problema de saúde pública com ocorrência de aproximadamente 25 a 500 mil novos casos por ano (Das, S. *et al.*, 2008). Possui quatro sorotipos geneticamente distintos que produzem em caráter de reinfecção, exacerbação da resposta imunológica podendo ocasionar complicações hemorrágicas e levar a óbito. A dengue é considerada uma doença negligenciada, pois acomete populações pobres, de regiões desfavorecidas e politicamente pouco expressivas (Franco-Paredes *et al.*, 2007).

**METODOLOGIA:** Foram utilizadas amostras coletadas desde os anos de surtos da doença e cedidas juntamente com as fichas de notificação pelo Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN, PI) e pelo Instituto de Doenças Tropicais Dr. Nathan Portela (IDTNP). O RNA foi extraído das amostras conforme o protocolo do fabricante do Kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, EUA). Foram utilizados os iniciadores D1 e D2 capazes de amplificar qualquer um dos quatro sorotipos virais formando um produto de 511pb (Lanciotti *et al.*, 1992). Inicialmente o RNA alvo foi convertido em cDNA pela transcriptase reversa (RT), e este posteriormente amplificado pela Taq DNA polimerase, os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo (5µg/ml) ou em gel de poliacrilamida a 8% corado pelo método da prata.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Segundo método descrito por Lanciotti e colaboradores, 1992, as amostras sugestivas para o DENV foram submetidas às condições de amplificação para RT-PCR, utilizando iniciadores consenso capazes de amplificar todos os quatro sorotipos virais em um produto de tamanho molecular de 511pb, confirmando a presença do DENV. Na figura 01, observamos uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) onde foram analisados os produtos de amplificação das amostras 104, 111, 82, 55, estas quatro amostras geraram um produto de 511pb e foram positivas, detectando o vírus, no soro dos pacientes. A utilização do PAGE foi feita em virtude da maior sensibilidade desta ferramenta quando comparado a agarose, permitindo a separação de menores fragmentos e em baixa concentração do ácido nucléico investigado nas amostras clínicas. As bandas inespecíficas presentes nas amostras 82 e 55, podem ser resultado de ampliações de regiões genômicas semelhantes, quanto à composição das bases, as regiões alvo. Essa semelhança permite

que os iniciadores consigam ligar-se a essas regiões produzindo ampliações, ainda mais evidentes em PAGE, pela alta sensibilidade de detecção do método.



**Figura 01.** . Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), após amplificação de amostras clínicas sugestivas de DENV. As amostras 104, 111, 82 e 55 (caixa vermelha) foram positivas para o DENV, resultando, assim como os controles positivos 6 e 7, em um produto de 511pb, a partir dos ciclos de amplificação por RT-PCR. Foram utilizados iniciadores externos para seqüência e capazes de parear a qualquer um dos quatro sorotipos virais, indicando a presença do vírus.

Para as amostras positivas, embora na impossibilidade de realização da tipagem viral, sugere-se os sorotipos DENV 1 e DENV 2 por relacionarem-se com os sorotipos prevalentes no Estado no surto da época, como também por estudos realizados por colaboradores institucionais no ICB-UFMG. Contudo, existem menores possibilidades de tratar-se de DENV 3, pouco descrito pela vigilância, ou de DENV 4, detectado no Estado durante a epidemia 2010-2011, em março do ano corrente. Para tanto são necessárias maiores pesquisas a cerca das amostras desse período, incluindo a sorotipagem para investigação a cerca da co-circulação dos sorotipos, e do perfil de circulação de DENV 4, a partir de sua inserção no Piauí. Estas atividades de investigação deverão ser realizadas durante o ano de 2011, como proposto na renovação do PIBIC 2011-2012.

**CONCLUSÃO:** O método molecular fornece sensibilidade e especificidade desejáveis, que permite a identificação de DENV em amostras clínicas, confirmando a infecção e diferenciando-a de outras síndromes com sintomatologia semelhante. Esta análise fornece uma maior fidelidade número real de casos e permite avaliar o grau de incidência da doença e a ocorrência de epidemias. Por tratar-se de uma infecção em surtos recorrentes, com altos índices de morbidade que incapacitam um grande número de pessoas em idade produtiva, e por suas características de reemergência, a aplicação de estudos de genotipagem e sorotipagem contribui para o conhecimento a respeito da co-circulação de novos e múltiplos vírus (hiperendemicidade). Segundo, Figueiredo *et al.*, 2008 o monitoramento da introdução de novos genótipos emergentes, ou seja, variantes intra-sorotipo que poderão levar mais facilmente ao desenvolvimento da FHD com características de maior virulência e patogenicidade

(Leitmayer *et al.*, 1999; Cologna *et al.*, 2005; Ferreira, G.P *et al.*, 2010) contribuirão para que medidas preventivas possam ser implementadas.

Palavras-Chave: *Dengue virus*. Amostras clínicas. Eletroforese

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. DAS, S. *et al.* **Detection and serotyping of *Dengue Virus* in serum samples by multiplex reverse transcriptase PCR-ligase detection reaction assay.** Journal of Clinical Microbiology, 2008.
2. DEEN, J.L. *et al.* **The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment.** Lancet, 368: 170-73, 2006.
3. FERREIRA, G.P. *et al.* **Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of *Dengue virus* particles.** Journal of Microscopy, V 231, p 180-185, 2008.
4. FERREIRA, G.P. *et al.* ***Dengue virus* 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection.** Microbes and Infection, V 12(7), p 546-554, 2010.
5. FIGUEIREDO, L.B; *et al.* ***Dengue virus* 3 genotype 1 associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil.** Emerg Infections Disease 14, 314-316, 2008.
6. FIGUEIREDO, L.T.M., *et al.* **A Simple Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for *Dengue Type 2 Virus* Identification.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 92(3): 395-398, 1997.
7. FRANCO-PAREDES C. *et al.* **Commentary: improving the health of neglected populations in Latin America.** BMC Public Health v.7, p. 11, 2007.
8. GUBLER, D.J. *et al.* **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** Clinical Microbiology Reviews, 1998
9. GUZMÁN M.G., Kourí, G. **Dengue: an update.** The Lancet Infectious Diseases Vol 2. , January 2002
10. LANCIOTTI, R.S; *et al.* **Rapid Detection and Typing of *Dengue Viruses* from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.** J. Clin. Microbiol, Mar. p. 545-551; 1992.
11. RICO-HESSE. **Molecular evolution and distribution of dengueviruses type 1 and 2 in nature.** Virology 174, 479–493; 1990.
12. ROMANO, C.M. *et al.* **Characterization of *Dengue virus* type 2: New insights on the 2010 brazilian epidemic.** PLoS ONE, 2010.

APOIO:

