

MULTIPLICAÇÃO, ISOLAMENTO E SOROTIPAGEM DE *DENGUE VÍRUS* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DO ESTADO DO PIAUÍ.

Vanessa de Sousa do Vale (Bolsista do PIBIC/UFPI), Laís Sousa Santos (Mestranda do PPGB Biotec-UFPI), Gustavo Portela Ferreira (Orientador do Colegiado de Biomedicina da UFPI)

INTRODUÇÃO: A dengue é a arbovirose mais prevalente no mundo (DEEN et al, 2006) e um grave problema de saúde pública com ocorrência de 25 a 500 mil novos casos por ano (GUZMÁN et al, 2010). O *Dengue vírus* (DENV) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (GUBLER, 1998), possui quatro sorotipos (DENV1-4) epidemiologicamente relacionados, mas imuno e geneticamente distintos (DAS et al, 2008). Podem causar síndromes que vão de assintomáticas a letais, a Febre do Dengue (FD), mais comum, caracteriza-se por febre e cefaléia; a Febre Hemorrágica (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD) caracterizam-se por hemorragia, extravasamento plasmático e plaquetopenia (WHO, 2009). O diagnóstico precoce é de fundamental importância para a implementação terapêutica e o monitoramento viral. Diante da problemática o presente estudo objetiva identificar DENV em amostras sugestivas de dengue do Estado do Piauí, através da técnica molecular de RT-PCR e verificar a sensibilidade da técnica quando comparada as metodologias convencionais utilizadas pelos centros de diagnóstico.

METODOLOGIA: Foram analisadas 84 amostras de soro sugestivas para o DENV representativas do Estado do Piauí de 2011 a junho de 2012, As amostras analisadas, haviam sido testadas previamente no LACEN-PI pelo método de ELISA para detecção da proteína NS1 e/ou ELISA para detecção de IgM, duas não haviam sido testadas anteriormente. O RNA viral foi extraído utilizando kit Invisorb® de acordo com o protocolo do fabricante. A conversão do RNA em cDNA e amplificação dos produtos ocorreu pela técnica de RT-PCR realizada conforme o método descrito por Lanciotti e colaboradores (1992) e os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO: As amostras foram coletadas, em média, no 2º dia após o início dos sintomas, correspondendo ao período de viremia. Das amostras analisadas 11,9% foram positivas por RT-PCR, resultado semelhante ao obtido por Gurukumar (2009) que obteve 16,9%. Desse total quatro eram NS1 positivas, três NS1 negativas, uma IgM positiva, uma IgM negativa e uma amostra não previamente testada. As amostras positivas amplificaram um tamanho molecular de 511 pb, correspondente a região de interesse junto aos genes C/prM. Para detecção foram utilizados iniciadores capazes de se ligar a qualquer dos sorotipos virais e amplificar, portanto o amplificado indica amostra positiva para o DENV independentemente do sorotipo. Trata-se de uma metodologia rápida, sensível e específica que permite a detecção do RNA viral em soros virêmicos (LANCIOTTI et al, 1992) e conjugado a outros métodos são conclusivos em diferentes fases de viremia (LAUGHLIN et al, 2012). Embora não tendo estabelecido as reações para os sorotipos virais e, por conseguinte, ainda não amplificado os tamanhos moleculares referentes a cada um destes, sugere-se os sorotipos DENV 1 e 2 por serem os de maior prevalência no Estado em epidemias no período analisado. Pode

ainda relacionar-se com o DENV 4 que ressurgiu no Brasil em 2010 e foi detectado no Piauí em março de 2011.

CONCLUSÃO: Segundo Lanciotti (1992) a RT-PCR é uma metodologia rápida, sensível e específica que permite a detecção do RNA viral em soros virêmicos, assim como Gúzman (2010) comprovamos sua elevada sensibilidade em relação os testes convencionais, o método foi capaz de detectar amostras positivas, mesmo quando estas apresentaram-se negativas por outros métodos. Como cita Laughlin (2012) o estabelecimento da RT-PCR em conjunto com as demais técnicas convencionais utilizadas na rotina laboratorial tende a aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, uma vez que a combinação das mesmas minimiza falhas individuais de cada técnica. O DENV causa uma infecção em surtos recorrentes com altos índices de morbidade, por suas características de reemergência, a aplicação dos estudos de genotipagem tem contribuído para o conhecimento a respeito da co-circulação de novos e múltiplos vírus. Segundo Figueiredo e colaboradores (2008) o monitoramento da inserção dessas variantes contribuirão para que medidas preventivas sejam implementadas junto à vigilância epidemiológica.

Palavras-chaves: *Dengue* vírus. RT-PCR. Diagnóstico molecular.

APOIO FINANCEIRO:



REFERÊNCIAS:

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**, v.46, n.10, p.3276-3284, 2008.
2. DEEN, J.L. et al. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. **Lancet**, v.368, p.170-73, 2006.
3. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, 2009.
4. FIGUEIREDO, L.B. et al. *Dengue virus* 3 genotype 1 associated with Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever, Brazil. **Emerg Infectious Disease** v.14, p.314-316, 2008.
5. GUBLER, D.J. et al. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.480-496, 1998
6. GUZMÁN, M. G. et al. Dengue: a continuing global treat. **Nature Reviews/ Microbiology**, 2010.
7. GUZMÁN, M.G. et al. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.8, 2010.

8. 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**, v.30, n.3, p. 545-551, 1992.
9. LAUGHLIN, C.A. et al. Dengue research opportunities in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**. 2012.