



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO MENESES

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, MAYARO E OROPOUCHE EM
AMOSTRAS COM DENGUE NEGATIVO PELA TÉCNICA NS1 NO ESTADO DE
RORAIMA, NO ANO DE 2012**

Boa Vista, RR
2013

CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO MENESES

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, MAYARO E OROPOUCHE EM
AMOSTRAS COM DENGUE NEGATIVO PELA TÉCNICA NS1 NO ESTADO DE
RORAIMA, NO ANO DE 2012**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração Modelo de Atenção e Vigilância em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Pablo O. Amézaga Acosta.

Co-orientador: Dr. Felipe Naveca.

CÁTIA ALEXANDRA RIBEIRO MENESES

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, MAYARO E OROPOUCHE EM
AMOSTRAS COM DENGUE NEGATIVO PELA TÉCNICA NS1 NO ESTADO DE
RORAIMA, NO ANO DE 2012**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Modelo de Atenção e Vigilância em Saúde. Defendida em 1º de julho de 2013 e avaliada pela seguinte banca avaliadora:

Prof. Dr. Pablo Oscar Amezaga Acosta
Orientador / UFRR

Prof. Dr. Alexander Sibajev
Membro / UFRR

Prof. MSc. Ananias Noronha Filho
Membro / IFRR

DEDICATÓRIA

Aos meus amados filhos;
Victória, Gustavo e Verônica,
que são a razão da minha vida
e ao Rodrigo, meu amado marido.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pelas oportunidades que tem colocado no meu caminho.

Aos meus pais e irmãos que sempre acreditaram e me apoiaram em minhas decisões.

Ao meu marido que inúmeras vezes assumiu o lugar da “mamãe” para que eu pudesse me dedicar ao Mestrado, sempre me incentivando.

Aos meus filhos por, na sua imaturidade, tentarem entender que a mamãe precisava estudar e não podia sair com eles.

Ao meu querido e dedicado orientador, Dr. Pablo Oscar Amézaga Acosta por me apresentar ao mundo da Biologia Molecular e por acreditar que eu conseguiria realizar esta pesquisa.

Ao Dr. Felipe Naveca pelo apoio nesta pesquisa e por compartilhar, da forma mais humilde que já presenciei, o seu conhecimento.

A professora Dra. Fabiana Granja pelas suas maravilhosas aulas de Biologia Molecular.

À equipe do LaBMol sempre dispostos a me ajudar, mesmo que fosse nos finais-de-semana.

A minha amiga de coração Márcia Brazão que com sua alegria e sinceridade me cativaram e que comemora cada conquista minha como se fosse sua com a forma mais pura dos sentimentos.

A todos os meus amigos que desde o processo inicial da seleção do Mestrado me apoiaram, sempre acreditando que eu conseguiria e que no decorrer deste me ajudaram, e que afirmo com muita alegria que foram muitos.

Ao meu companheiro das madrugadas de estudo, Scooby, sempre presente, aninhado ao meu lado, mostrando toda a dedicação que ele tem a mim.

RESUMO

As arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por vetor artrópode (*artropod-born viruses*). A transmissão ocorre para os hospedeiros vertebrados susceptíveis no momento do repasto sanguíneo realizado pelos artrópodes hematófagos ou pode ocorrer entre artrópodes através da via transovariana e possivelmente venérea. A região Amazônica possui um grande número de artrópodes hematófagos (culicídeos, flebotomíneos, ceratopogonídeos) e vertebrados silvestres que juntamente com o clima tropical propiciam a manutenção dos arbovírus na natureza. O manejo inadequado da natureza através do desmatamento decorrente da abertura de estradas, construção de barragens, garimpo e mineração são alguns dos eventos responsáveis por surtos de arboviroses identificados na região Norte do Brasil. O Estado de Roraima está localizado no extremo norte do país, com fronteira internacional com a Venezuela e com a Guiana e ainda com o Estado do Amazonas e Pará. Estudos regulares a respeito da circulação de arbovírus no Estado são feitos apenas para dengue e febre amarela, nos quais foi identificada a circulação dos quatro sorotipos de dengue. O grande número de casos notificados para dengue cujo diagnóstico laboratorial é negativo para este arbovírus demonstrou a necessidade de se ampliar a pesquisa para outros vírus. Foram analisadas 150 amostras cujo teste NS1 apresentou-se negativo, provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima, pertencentes a pacientes que manifestaram síndrome febril no período agudo da doença (até 5 dias de início dos sintomas) e que possuíam outros sintomas como: artralgia, cefaleia, dor retroorbital, calafrio, mialgia, diarreia, vômito e exantema. Conhecendo-se a maior sensibilidade da técnica de qPCR por sonda as amostras(150) foram submetidas à técnica qPCR para DENV, das quais obtivemos 33 (22%) amostras positivas para DEN tendo identificado os sorotipos por RT-PCR convencional obtendo os seguintes resultados: DENV-1(1), DENV-2(4), DENV-3(2), DENV-4(21), além de obtermos amostras negativas(3) e inconclusivas(2). Posteriormente 72 amostras que permaneceram negativas no qPCR para DENV foram submetidas a qPCR para MAYV/ORO obtendo-se positividade para MAYV(7) e para OROV(13). A identificação de outros arbovírus circulantes no Estado de Roraima torna-se necessária para que se conheça a população viral presente e assim desenvolver mecanismos de monitoramento e detecção, em tempo oportuno, da entrada de um arbovírus emergente, responsável por um possível surto.

Palavras-chave: Arbovírus. Roraima. qPCR. Dengue. Mayaro. Oropouche.

ABSTRACT

The arboviruses are diseases caused by viruses transmitted by arthropod vector (arthropod-borne viruses). Transmission occurs for vertebrate hosts susceptible at the time of blood meal held by arthropod vectors or can occur between arthropods through transovarially and possibly venereal. The Amazon region has a large number of arthropod vectors (mosquitoes, sand flies, ceratopogonídeos) and wild vertebrates that coupled with the tropical climate favor the maintenance of arboviruses in nature. Inadequate management of nature through deforestation caused by the opening of roads, dams, mining and mining are some of the events responsible for outbreaks of arboviruses identified in northern Brazil. The State of Roraima is located in the extreme north of the country, with international border with Venezuela and Guyana and with the state of Amazonas and Pará. Regular studies regarding the circulation of arboviruses in the state are made just for dengue and yellow fever, which was identified in the circulation of four dengue serotypes. The large number of reported cases of dengue laboratory diagnosis which is negative for this arbovirus demonstrated the need to expand the research to other virus. We analyzed 150 samples with NS1 test appeared negative, from the Central Laboratory of Public Health of the State of Roraima, belonging to patients who manifested febrile syndrome in acute period of the disease (up to 5 days of onset of symptoms) and who possessed other symptoms such as arthralgia, headache, retroorbital, chills, myalgia, diarrhea, vomiting and rash. Knowing the greater sensitivity of the qPCR technique to probe the samples (150) were subjected to qPCR technique for DENV, which obtained 33 (22%) samples were positive for DEN serotypes and identified by conventional RT-PCR obtaining the following results : DENV-1 (1), DENV-2 (4), DENV-2 (3), DENV-4 (21), and obtain negative samples (3) and inconclusive (2). Subsequently 72 samples that remained negative for DENV in the qPCR were subjected to qPCR MAYV/OROV positive for obtaining MAYV (7) and OROV (13). Identification of other arboviruses circulating in the State of Roraima is necessary for knowing the viral population present and well developed mechanisms for monitoring and detection, timely entry of an emerging arbovirus responsible for a possible outbreak.

Key-words: Arbovirus. Roraima. qPCR. Dengue. Mayaro. Oropouche.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de transmissão e dispersão mantidos pelos arbovírus na área urbana e rural.....	15
Figura 2 -	Genoma <i>Alpha virus</i>	18
Figura 3 -	Genoma de DENV.....	20
Figura 4 -	Genoma de vírus Oropouche.....	22
Figura 5 -	Mapa do Brasil identificando os surtos de ORO que ocorreram no período de 2003 a 2004 com respectivos genótipos.....	23
Figura 6 -	Circulação dos genótipos I, II e III de OROV na América do Sul...	24
Figura 7 -	Esquema da técnica da ELISA para captura de antígeno NS1.....	29
Figura 8 -	Esquema da técnica de ELISA para IgM DENV.....	30
Figura 9 -	Curvas de amplificação da detecção do vírus dengue em RT-PCR em tempo real.....	39
Figura 10 -	Apresentação da eletroforese para os sorotipos de DENV.....	40
Figura 11 -	Curvas de amplificação da detecção do vírus Mayaro em RT-PCR em tempo real.....	45
Figura 12 -	Curvas de amplificação da detecção de OROV em RT-PCR em tempo real.....	45
Figura 13 -	Identificação de casos de MAYV na América do Sul.....	47
Figura 14 -	Mapa do estado de Roraima com a representação dos municípios.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Arbovírus e outros vírus transmitidos por roedores isolados no Brasil, associados com doença humana, de 1954- 2004.....	25
Tabela 2 -	Número de casos e sorotipos de DENV isolados em Roraima entre 1999–2012.....	27
Tabela 3 -	Número de casos notificados para dengue em Roraima, 2007 a 2012, com respectivo resultado.....	28
Tabela 4 -	Tabela de iniciadores (primers).....	38
Tabela 5 -	Número de amostras NS1 negativas testadas por qPCR para DENV com posterior identificação de sorotipo por RT-PCR convencional.....	40
Tabela 6 -	Número de dias de sintomas que o paciente apresentava no momento da coleta.....	42
Tabela 7 -	Sensibilidade do kit em função do número de dias do início dos sintomas no momento da coleta do sangue.....	43
Tabela 8 -	Comparação entre a sensibilidade das técnicas e resultados laboratoriais confirmados de DENV em períodos distintos de sintomas.....	44
Tabela 9 -	Número de amostras testadas por qPCR para MAYV/OROV.....	46
Tabela 10 -	Número de casos e porcentagem de sintomas apresentados pelos casos de Mayaro e Oropouche positivos.....	48
Tabela 11 -	Número de casos NS1 negativos para dengue, positivos por RT-qPCR para DENV, MAYV e OROV analisadas por município.....	49
Tabela 12 -	Número total de amostras testadas por município para pesquisa do vírus dengue pela técnica do antígeno NS1 nos anos de 2011 e 2012.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Percentual
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
AM	Amazonas
CARV	Caraparú vírus
CHIKV	Chikungunya vírus
CoEP/URFF	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima
CPCV	Cacipacore vírus
DENV	Dengue vírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEEV	Encefalite equina do leste vírus
FAV	Febre amarela vírus
FC	Fixação do complemento
FHD	Febre Hemorrágica do Dengue
g	Grama
GMAV	Guama vírus
GROV	Guaroa vírus
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência Indireta
IH	Inibição da Hemaglutinação
ILHV	Ilheus vírus
JEV	Encefalite japonesa vírus
Km ²	Quilômetro quadrado
LaBMol	Laboratório de Biologia Molecular
LACEN-RR	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima
MAYV	Mayaro vírus
mL	Mililitro
MUCV	Mucambo vírus
N	Neutralização

nm	Nanômetro
NS1	Proteína não estrutural 1
ONNV	O'Nyong-Nyong vírus
OROV	Oropouche vírus
PA	Pará
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCV	Rocio vírus
rpm	Rotação por minuto
RR	Roraima
RRV	Ross River vírus
RT	Transcriptase reversa
RT-PCR	Transcriptase reversa-Reação em Cadeia da Polimerase
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SLEV	Encefalite de Saint Louis vírus
TCMV	Tacaiuma vírus
UFRR	Universidade Federal de Roraima
VEEV	Encefalite equina venezuelana vírus
WEEV	Encefalite equina do oeste vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	APRESENTAÇÃO.....	12
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
1.2.1	Arbovírus	14
1.2.1.1	Gênero <i>Alphavirus</i>	17
1.2.1.1.1	Vírus Mayaro	17
1.2.1.2	Gênero <i>Flavivirus</i>	19
1.2.1.2.1	Vírus Dengue	20
1.2.1.3	Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	21
1.2.1.3.1	Vírus Oropouche	22
1.2.2	Arboviroses no Brasil	24
1.2.3	Arbovírus isolados em Roraima	27
1.2.4	Diagnóstico Laboratorial de DEN usado no LACEN-RR	29
1.2.4.1	Exame imunoenzimático ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) para captura de Antígeno NS1	29
1.2.4.2	Exame imunoenzimático ELISA Anticorpo IgM para DENV	30
1.2.4.3	Isolamento viral	30
2	OBJETIVOS	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	32
3.2	MATERIAL.....	32
3.3	FLUXOGRAMA DA PESQUISA PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	33
3.4	EXTRAÇÃO DE RNA.....	33
3.5	RT-PCR EM TEMPO REAL (qPCR).....	34
3.5.1	RT- PCR em tempo real como etapa única para identificação dos DENV, MAYV e OROV	35
3.6	IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DOS DENVs POR RT-PCR CONVENCIONAL.....	36
3.7	ISOLAMENTO VIRAL EM CÉLULAS C6/36.....	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	PESQUISA DO DENV POR RT- PCR EM TEMPO REAL E CONVENCIONAL.....	40
4.2	RT- PCR EM TEMPO REAL PARA MAYV/OROV.....	44
4.3	APRESENTAÇÃO DOS SINTOMAS.....	47
4.4	PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DO ESTUDO.....	48
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

Em 1942 surge o termo arbovírus cuja definição origina-se das primeiras letras das palavras inglesas *arthropod-borne* seguido da palavra vírus, desta forma, se definem como arboviroses as doenças de etiologia viral causada por um grupo de vírus transmitidos a hospedeiros vertebrados através de artrópodes hematófagos.

Os arbovírus estão divididos em famílias distintas sendo que apenas a *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* provocam doenças em seres humanos, estando registradas, até o ano de 2001, no Catálogo Internacional de Arbovírus mais de 500 espécies diferentes de vírus.

O Brasil é um país tropical que possui mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais com períodos chuvosos e áreas cobertas por vegetação ainda preservada contribuindo para que aproximadamente 190 espécies de arbovírus fossem identificadas até 2001(KARABATSOS, 2001), fato este que se deve à manutenção do ciclo vetor e hospedeiro vertebrado susceptível durante todo o ano, ao passo que nos países de clima temperado o ciclo é interrompido no inverno devido às baixas temperaturas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997a).

As alterações provocadas pelo homem no ecossistema podem provocar a dispersão de arbovírus e a sua adaptação a novos vetores e a novos hospedeiros. Esses vírus possuem uma variação muito grande de hospedeiros, incluindo entre os vertebrados: mamíferos, aves, anfíbios e répteis e entre invertebrados: mosquitos e carrapatos (MURRAY, 2006), favorecendo a manutenção dos arbovírus no ambiente. Também se destaca o alto índice de infestação por mosquitos *Culex* e *Aedes aegypti* encontrados nas cidades com alta densidade populacional que corresponde a um fator de risco para o aumento da emergência de novos arbovírus na população (FIGUEIREDO, 2007).

Entre as arboviroses de interesse em saúde pública destacam-se o Dengue (DEN), a Febre Amarela (FA), o Mayaro (MAY) e o Oropouche (ORO) os quais acometem a população ocasionando surtos e epidemias anualmente no país e estão presentes em casos na região Amazônica.

O Estado de Roraima (RR) possui uma área de 225.116,1km² sendo a maior parte deste território ocupado pela Floresta Amazônica, apresentando clima equatorial ao Norte, Sul e Oeste e clima tropical a leste (IBGE, 2010). Estas condições geográficas somadas à falta de condições sanitárias, desmatamento de áreas de mata, ocorrência de queimadas constantes e ainda o constante deslocamento populacional entre as áreas entre Roraima (RR), República Bolivariana da Venezuela e República Cooperativa da Guiana propiciam a possibilidade da emergência e reemergência de diversas arboviroses o que justifica a necessidade de estudos sobre estas doenças que podem estar acometendo a população do estado de RR, além do Dengue e Febre Amarela.

Outro motivo que se destaca é que entre os anos de 2007 a 2011 tivemos mais de 14000 de casos de síndromes febris notificados com sintomatologia de Dengue e, que após análise laboratorial pela metodologia de NS1 tiveram resultado negativo. No mesmo período houve a confirmação laboratorial de 17.705 casos de dengue.

O elevado número de casos de síndromes febris não diagnosticados representa riscos à população principalmente em termos de morbidade. Isolar e identificar os agentes etiológicos representa valiosa informação para uma vigilância epidemiológica eficiente.

Como consequência da presença de arbovírus menos conhecidos na população do Estado de Roraima, a emergência ou reemergência destes torna-se um problema de saúde pública.

Sabendo-se dos fatores limitantes da técnica de detecção do antígeno NS1 para a pesquisa de infecção por dengue, realizou-se um primeiro passo testando as amostras NS1 negativas para dengue pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) desenvolvida por Gurukumar *et al* 2009, técnica que apresenta uma maior sensibilidade que NS1. A utilização de sonda aumenta a especificidade e sensibilidade da técnica uma vez que a sonda se ligará a um alvo específico localizado no genoma do vírus pesquisado.

Desta forma idealizou-se este estudo para conhecer a possível infecção pelos arbovírus MAY e ORO, entre indivíduos com diagnóstico presuntivo de DEN e que foram descartados laboratorialmente desta doença por ter o exame NS1 negativo, principal exame realizado no estado para o diagnóstico do DEN na fase aguda da doença.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Arbovírus

A terminologia arbovírus descende da expressão inglesa *arthropod-borne viruses*, ou seja, vírus transmitidos por artrópodes (FORRATTINI, 1965).

Segundo a OMS, 1985:

“considera-se como arbovírus, os vírus que são transmitidos em natureza principalmente ou de modo importante, mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis, por intermédio de artrópodes hematófagos, ou através da transmissão transovariana, e possivelmente por via venérea; multiplicando-se nos tecidos dos artrópodes, e passados a novos hospedeiros vertebrados através da picada desses insetos, após um período de incubação extrínseca”.

Dessa forma os arbovírus são mantidos no ambiente através de ciclos envolvendo a transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis e vetores invertebrados portadores de arbovírus durante o repasto sanguíneo. Quando outro vetor invertebrado pica este hospedeiro no período virêmico pode se infectar, passando para o estado infectante, que é o período que os vírus passam a estar presentes nas suas glândulas salivares e posteriormente iniciar a transmissão do arbovírus a outro hospedeiro vertebrado que for picado ou a outro artrópode através da via transovariana (WHO,1985).

A continuidade dos arbovírus na natureza dá-se devido à capacidade de replicação viral que ocorre tanto nas células do vetor artrópode quanto nas células do vertebrado (RACZ, 2005). Outro fator importante para a manutenção desses vírus é a variabilidade muito grande de hospedeiros, incluindo vertebrados como mamíferos, aves, anfíbios e répteis e invertebrados como mosquitos e carrapatos (MURRAY, 2006).

As arboviroses predominantemente são zoonoses mantidas em ambiente silvestre. Desta forma as pessoas que mantêm contato com os arbovírus nas áreas silvestres são as que correm maior risco de adquirir a infecção. No entanto, certas arboviroses têm surgido periodicamente em áreas urbanas, sob forma epidêmica, tais como o DEN, ORO, MAY e Rocio (ROC) (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997b) devido, principalmente, à presença de altos índices de infestação por mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* e *Aedes aegypti*, em áreas urbanas altamente populosas (FIGUEIREDO, 2007).

Fatores que estejam relacionados com a alteração do meio ambiente como consequência, por exemplo, da construção de usinas hidrelétricas, desmatamento para o desenvolvimento da agricultura, abertura de estradas e urbanização de áreas estão intimamente ligados com arboviroses emergentes como apresentado por Pinheiro et al.,1977 e Dégallier et al., 1992, que apresentam dados referentes aos anos 70 e 80 durante e depois da criação das cidades de Altamira e Tucuruí originadas em consequência da construção da represa de Tucuruí no Estado do Pará. Durante essa construção milhões de insetos hematófagos foram obtidos em poucos dias e um vírus pertencente à família *Bunyaviridae*, o vírus Gamboa foi identificado além do isolamento de 27 novos vírus pertencentes à família *Reoviridae* em Tucuruí, 4 em Carajás (associados a mineração) e 8 em Altamira (associado ao desmatamento intensivo) (VASCONCELOS et al., 2001).

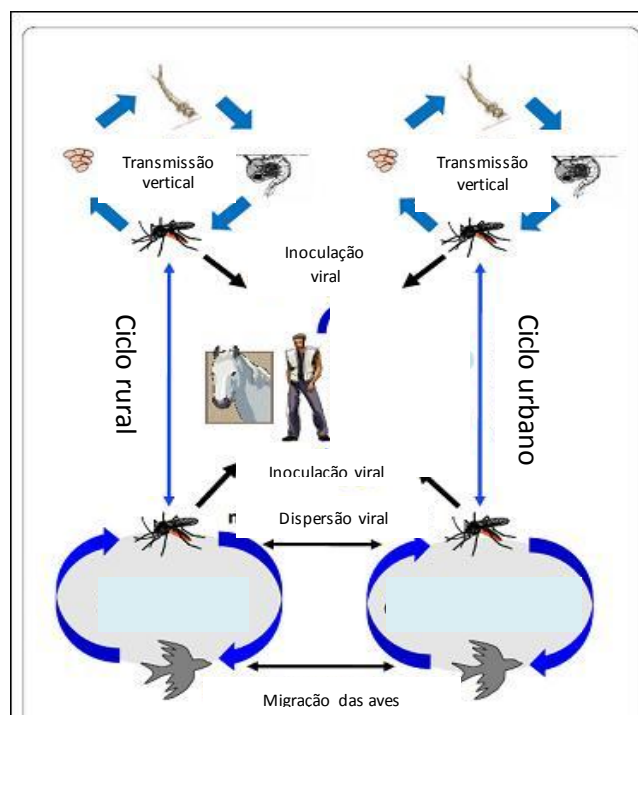


Figura 1 - Ciclo de transmissão e dispersão mantido pelos arbovírus na área urbana e rural. Fonte: <http://cedicpy.wordpress.com/2012/06/17/el-surgimiento-de-arboviro-sis-zoonoticas> (adaptado).

Os arbovírus foram classificados inicialmente pelas suas características antigênicas ou segundo suas características físico-químicas de sensibilidade ao éter, desoxicolato de sódio e ao pH e através de critérios sorológicos estabelecidos

por Casals (1957), nos quais cada grupo era constituído de dois ou mais vírus que apresentam relações antigênicas entre si demonstrados pelos testes de inibição de hemaglutinação (IH), fixação de complemento (FC) e neutralização (N). Os três primeiros grupos estabelecidos foram designados pelas letras A, B e C, e os demais receberam nomes do primeiro vírus isolado no respectivo grupo.

As principais famílias que compõem os arbovírus são a *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Asfarviridae*, sendo apenas as três primeiras responsáveis por doenças que acometem humanos com interesse em saúde pública (BEDIN, 2007) tendo sido registrados no *Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World*, até o ano de 2001, 534 vírus, dos quais 134 responsáveis por causar doenças em humanos (KARABATSOS, 2001), sendo que no Brasil, até o ano de 2007, foram isolados e identificados 200 espécies de arbovírus (FIGUEIREDO, 2007) correspondendo a cerca de 38% do total de arbovírus registrados no mundo.

Os membros dessas famílias são vírus que possuem genoma constituído por ácido ribonucleico (RNA) que pode ser segmentado ou não, com fita simples ou fita dupla e polaridade positiva e/ou negativa. Dentre os arbovírus com genoma não segmentado temos o gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*, o gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Rhabdovirus* pertencente à família *Rhabdoviridae*. Com genoma segmentado incluem o gênero *Bunyavirus* pertencente à família *Bunyaviridae* e o gênero *Orbivirus* da família *Reoviridae*. Como exceção temos o vírus da Febre Suína Africana, pertencente à família *Asfarviridae*, que possui o seu genoma constituído por ácido desoxirribonucleico (DNA) mesmo sendo um arbovírus, como pode se verificar na catalogação internacional dos arbovírus (MONATH et al., 1988).

Os arbovírus são responsáveis por manifestações clínicas inicialmente indiferenciadas provocando um quadro febril inespecífico, autolimitado de duração média de 5 (cinco) dias, podendo estar acompanhado de um ou mais dos seguintes sintomas: dor de cabeça, mialgia, artralgia, dor retroorbital, exantema, náuseas e vômitos, podendo evoluir para quadros graves como hemorragia, no caso do DEN, e encefalites no caso de encefalite de Saint Louis (SLE), encefalite California (CE), encefalite equina do leste (EEE), encefalite equina do oeste (WEE), encefalite equina Venezuelana (VEE), ROC e Powassan (PO) (VASCONCELOS et al., 1991).

1.2.1.1 Gênero *Alphavirus*

Pertence à família *Togaviridae* juntamente com o gênero *Rubivirus* segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2011.

O gênero *Alphavirus* corresponde ao grupo A dos arbovírus agrupando aproximadamente 27 espécies (BRONZONI et al., 2004) isolados em todos os continentes com exceção da Antártida (STRAUSS et al., 1994).

Onze tipos já foram associados com a doença humana, e destes pelo menos sete têm estado presentes em epidemias: Chikungunya (CHIKV), EEE, WEE, MAYV, O'nyong-nyong (ONNV), Ross River (RRV), VEE e Mucambo (MUCV).

1.2.1.1.1 Vírus Mayaro (MAYV)

O MAYV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*.

Como a maioria das arboviroses o MAYV provoca uma doença febril com sintomas inespecíficos, com duração média de 3-5 dias, que pode se confundir com DEN ou ORO, provocando ainda exantema, tontura, vômito, dor retrocular e artralgia intensa que pode ter duração de meses causando incapacidade de execução de atividades laborais, atingindo principalmente as articulações dos punhos, tornozelos, joelhos e dedos (PINHEIRO, 1988; TAYLOR, 2005).

Possuem genoma RNA com fita simples, com aproximadamente 11Kb, com polaridade positiva e com vírion medindo entre 60 a 70nm de diâmetro, simetria cúbica e um envoltório de natureza lipoproteica onde se localiza a hemaglutinina. Na extremidade 5' temos a presença de quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Na terminação 3' temos a presença das proteínas estruturais de capsídeo (C) a qual é comum a todos os membros do grupo, responsável pela reação no teste de fixação do complemento e as glicoproteínas situadas no envoltório da partícula viral (E1 e E2) sendo responsáveis pelas respostas aos testes de hemaglutinação e neutralização. Como exceção do gênero tem o vírus da Floresta de Semliki o qual apresenta como glicoproteínas estruturais do envelope além da E1, E2 a E3 (STRAUSS et al., 1994; MURRAY, 2006).

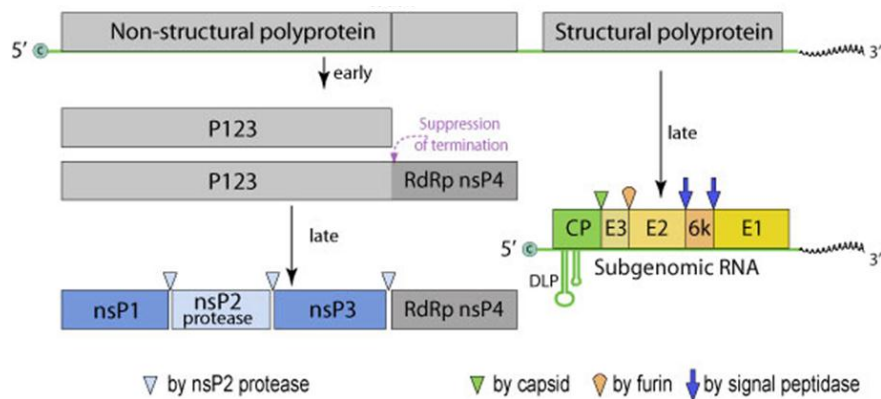


Figura 2 - Genoma do vírus Mayaro.

Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html.

Através de estudos filogenéticos, Powers et al. (2006) identificaram dois genótipos do vírus com localização geográfica distinta, classificados em D e L, através da utilização de sequências nucleotídicas da região responsável pela codificação das glicoproteínas E1 e E2. O genótipo D foi isolado em amostras de Trinidad e Tobago e na porção centro-norte da América do Sul (Peru, Guiana Francesa, Suriname, Brasil e Bolívia). O genótipo L foi isolado apenas em amostras do Brasil, sendo que ambos genótipos estão presentes em Belterra, Brasil.

A entrada do vírus no organismo do hospedeiro ocorre após o ato de hematofagia praticado pelo vetor. A célula do hospedeiro internaliza o vírus formando uma vesícula através do mecanismo de endocitose. Para que este processo ocorra há a ligação da partícula viral, mais especificamente a glicoproteína E2, com a superfície da célula. A vesícula formada funde-se à membrana do endossomo sendo este processo mediado por E1. Posteriormente ocorrerá o processo de acidificação da vesícula com a alteração de pH que favorece o mecanismo de replicação viral, causando a morte da célula do hospedeiro (STRAUSS, 1994).

Este arbovírus apresenta como vetores os mosquitos da família *Culicidae* destacando-se os do gênero *Haemagogus* (STRAUSS, 1994), o qual apresenta hábitos silvestres, diurnos e sua principal fonte de alimento são os macacos, possuindo baixa afinidade antropofílica (PINHEIRO, 1988). Este quadro sobre alteração quando o *Haemagogus* tem necessidade de se adaptar a novas fontes de alimento para manter o seu ciclo biológico e desta forma passa a se alimentar de outros animais silvestres e do homem quando este invade o seu habitat. Pode

ocorrer também o deslocamento destes mosquitos quando seu habitat sofre alterações, através de desmatamento e da exploração de terras em atividades agrícolas tendo este uma capacidade de voo de 11Km para procurar alimento (PINHEIRO et al.,1988) e podendo assim provocar surtos na área urbana.

Além do *Haemagogus*, o MAYV foi isolado em outros gêneros de mosquitos, incluindo o *Culex*, *Mansonia*, *Psorophora* e *Sabethes* (PINHEIRO et al.,1981a). Estudos experimentais mostraram que o vírus pode infectar o *Aedes aegypti* podendo se tornar o responsável por epidemias na área urbana de MAY uma vez que existem altas taxas de infestação predial nas cidades por este mosquito (LONG et al., 2011).

A primeira epidemia registrada no Brasil, havendo o isolamento de seis amostras virais, ocorreu em 1955, em uma comunidade localizada às margens do rio Guamá, Belém, Pará. A segunda epidemia ocorreu em 1978, na vila de Belterra, a qual se tratava de uma antiga plantação de seringueiras situando-se próximo à confluência dos rios Tapajós e Amazonas (IEC, 1986).

Após este período casos foram reportados por toda a região Amazônica, predominando nas áreas rurais ou periurbanas das cidades. Outros casos, nos últimos anos, tem sido identificados no Estado do Pará como o que ocorreu em Pau D'Arco, em 2008, afetando uma comunidade rural (AZEVEDO et al., 2009), na cidade de Manaus no período de 2007 a 2008 (MOURÃO et al., 2012). O MAYV também tem sido responsável por ocasionar surtos em outras comunidades rurais da América do Sul incluindo Guiana Francesa e Venezuela (TALARMIN et al., 1998; MUÑOZ, 2012).

1.2.1.2 Gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* corresponde ao grupo B dos arbovírus e é composta por três gêneros: *Pestivirus* que apresenta 4 espécies, *Hepacivirus* com 1 espécie e os *Flavivirus* que apresentam 53 espécies (ICTV, 2011).

No Brasil, já foram descritas doze espécies de *Flavivirus* (FIGUEIREDO, 2000).

Dentre os principais representantes destacam-se o vírus da febre amarela (FAV) causador de grave hepatite com febre hemorrágica em cerca de 10% dos

indivíduos que com ele se infectam (VASCONCELOS, 2003). Temos também os DENV, Cacipacore (CPCV), Ilheus (ILHV) e SLEV.

1.2.1.2.1 Vírus Dengue (DENV)

O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*.

Seus sintomas evoluem após um período de incubação que pode variar de 2-8 dias após a inoculação do vírus. Inicia-se o quadro de febre alta, cefaleia, mialgia, dor retroorbital, artralgia e exantema (BRASIL, 2008).

Possui quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) induzindo imunidade específica a cada um deles.

O DENV apresenta formato esférico, com vírions que possuem diâmetro de 40 a 60nm são envelopados e com projeções na superfície (espículas). O genoma é constituído por RNA de fita simples, com polaridade positiva, linear, com aproximadamente 11KB de tamanho. O seu genoma codifica 3 proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína préM/M relacionada à membrana e a proteína E do envelope, além de possuir as proteínas não estruturais (NS) NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (LINDENBACH, 2007), todas apresentadas abaixo na figura 3 das quais a NS5 apresenta sequências nucleotídicas mais conservadas entre as várias espécies do gênero (LINDENBACH, 2007).

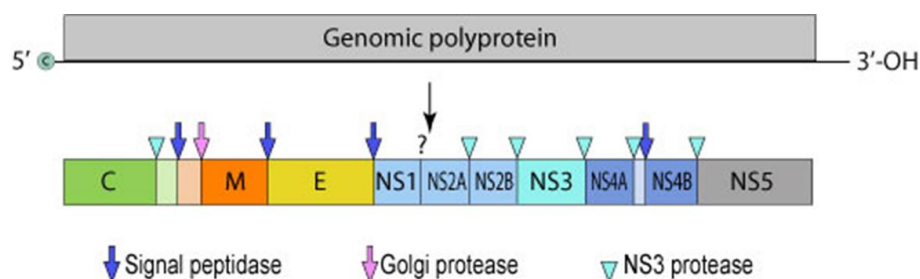


Figura 3 - Genoma de DENV.

Fonte: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s1315-25562001000100007&script=sci_arttext.

Após ser inoculado o DENV inicia a sua replicação nas células musculares estriadas, lisas, fibroblastos e linfonodos locais iniciando o viremia primária disseminando os vírus por todo o organismo na forma livre ou no interior de monócitos/macrófagos, sendo as células fagocitárias os maiores sítios de replicação viral devido ao tropismo apresentado pelo DENV (FIGUEIREDO, 1999).

A replicação viral inicia-se com a adsorção do vírus à célula alvo através da ligação da proteína estrutural E ao receptor presente na célula provocando a internalização da partícula por endocitose. A alteração do pH é a responsável, na próxima etapa, por mudanças que ocorrem na proteína E ocasionando a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo favorecendo o mecanismo de replicação viral causando a liberação dos novos vírus pela via exocítica (LINDENBACH, 2007).

Como vetor, o DENV apresenta o *Aedes aegypti* espécie antropofílica, hematófaga, com atividade diurna, mas outras espécies como o *A. albopictus* são consideradas vetores mas com importância secundária na transmissão em áreas rurais ou periurbanas na Ásia (HUBER et al., 2000).

Na atualidade, esta arbovirose é considerada a mais importante do mundo com mais de 50 milhões de infecções anuais ocasionando 500.000 casos de quadros hemorrágicos e 22.000 mortes (WHO, 2008).

A primeira epidemia de dengue no Brasil com isolamento dos sorotipos virais ocorreu em 1981 em RR, sendo isolados DENV-1 e DENV-4 (TRAVASSOS et al., 1998).

1.2.1.3 Gênero *Orthobunyavirus*

A família *Bunyaviridae* apresenta cerca de 100 representantes divididos em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, composto por 48 espécies virais, *Hantavirus*, composto por 23 espécies, *Nairovirus*, composto por 7 espécies, *Phlebovirus*, composto por 9 espécies e *Tospovirus*, este último incluindo vírus vegetais, composto por 8 espécies de vírus (ICTV, 2011).

Na família *Bunyaviridae* estão incluídos patógenos virais de significativa importância humana e veterinária, tais como, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV), *Rift Valley fever virus* (RVFV), *Akabane virus* (AKAV), *Nairobi sheep disease virus* (NSDV), *Aino virus* (AINV) e *Peaton vírus* (PEAV) (KARABATSOS, 1985), assim como vírus já isolados na Amazônia Brasileira como: vírus Guaroa (GROV), vírus Maguari (MAGV), vírus Tacaiuma (TCMV), vírus Guama (GMAV), vírus Caraparu (CARV), vírus Oropouche (OROV), vírus Catu (CATUV), vírus Icoaraci (ICOV) e vírus Belém (BLMV) (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997a).

1.2.1.3.1 Vírus Oropouche (OROV)

Pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Bunyavirus*.

O OROV é superado apenas pelo dengue em número de casos que provoca anualmente na região Amazônica (FIGUEIREDO, 2007) e é responsável por causar epidemias extensas na mesma região (VASCONCELOS et al., 1992).

Os sintomas causados pelo vírus não são distinguíveis da maioria dos arbovírus que acometem os seres humanos caracterizando-se com febre, cefaleia, mialgias e artralgias, anorexia, tonturas, calafrios e fotofobia. Em apenas 5% casos apresentam exantema (PINHEIRO et al., 1981b).

Como componente da família *Bunyaviridae* são vírus com RNA de fita simples, polaridade negativa, envelopados e esféricos, medindo de 80 a 120 nm, com genoma trissegmentado denominado de L (grande) constituído por 6.846 nucleotídeos (nt), M (médio) constituído por 4.385 nt e S (pequeno) com 745 nt (MERTZ, 1997).

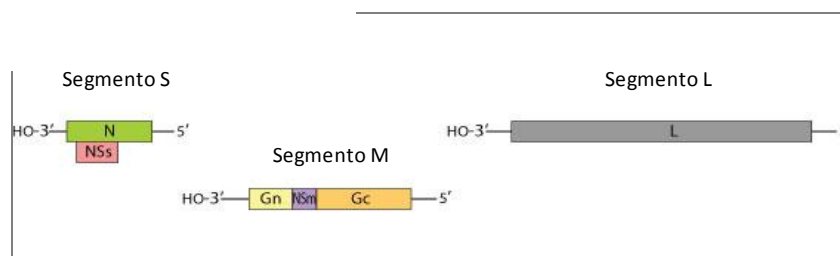


Figura 4 - Genoma de vírus Oropouche.
Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/82.html.

O segmento grande apresenta a proteína L, possivelmente uma RNA polimerase. Relacionado ao segmento M, o mesmo codifica uma poliproteína que se divide em duas glicoproteínas estruturais denominadas de Gn e Gc e uma proteína não estrutural denominada de NSm. Já o segmento S codifica duas proteínas sendo uma estrutural de nucleocapsídeo (N) e uma proteína não estrutural denominada de NSs.

Estudos filogenéticos dos genes do nucleocapsídeo (N) identificaram 3 genótipos do OROV (SAEED et al., 2000). São eles genótipo I, II, que tem sido identificados na Amazônia brasileira e III que foi isolado em Arinos, Minas Gerais (NUNES et al., 2005) estando demonstrados na figura abaixo.

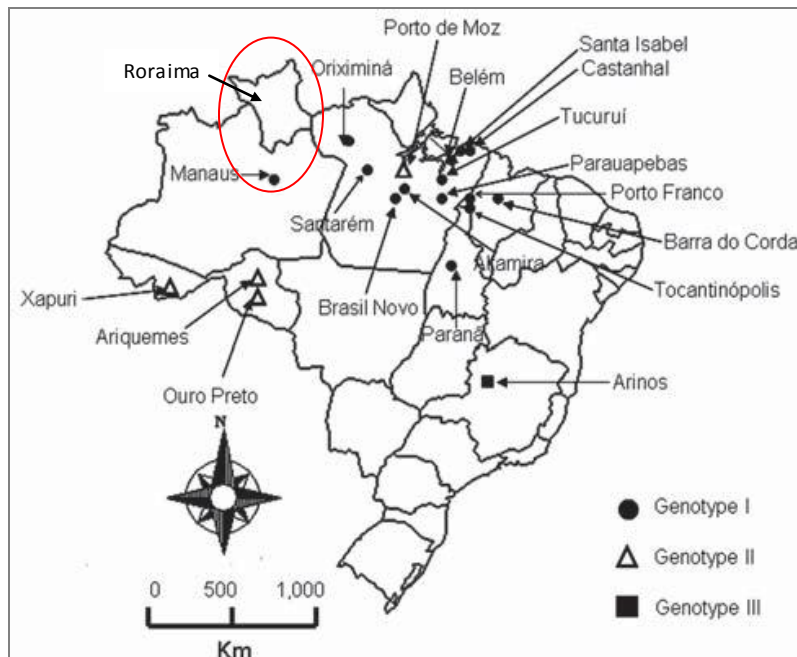


Figura 5 - Mapa do Brasil identificando os surtos de ORO que ocorreram no período de 2003 a 2004 com os respectivos genótipos.
 Fonte: Azevedo et al., 2007.

Nos estudos realizados por Saeed et al. (2000) verificou-se que em Trinidad e Tobago apenas o genótipo I foi isolado e este predomina no leste da Amazônia (circulação identificada no mapa com coloração vermelha), enquanto que no Peru identificou-se o genótipo II (identificado no mapa com a coloração azul), predominante no oeste da Amazônia e no Panamá (circulação identificada no mapa com coloração verde) o genótipo III isolado no hospedeiro vertebrado *Callithrix sp* no Estado de Minas Gerais indicando uma possível dispersão do vírus para áreas populosas.

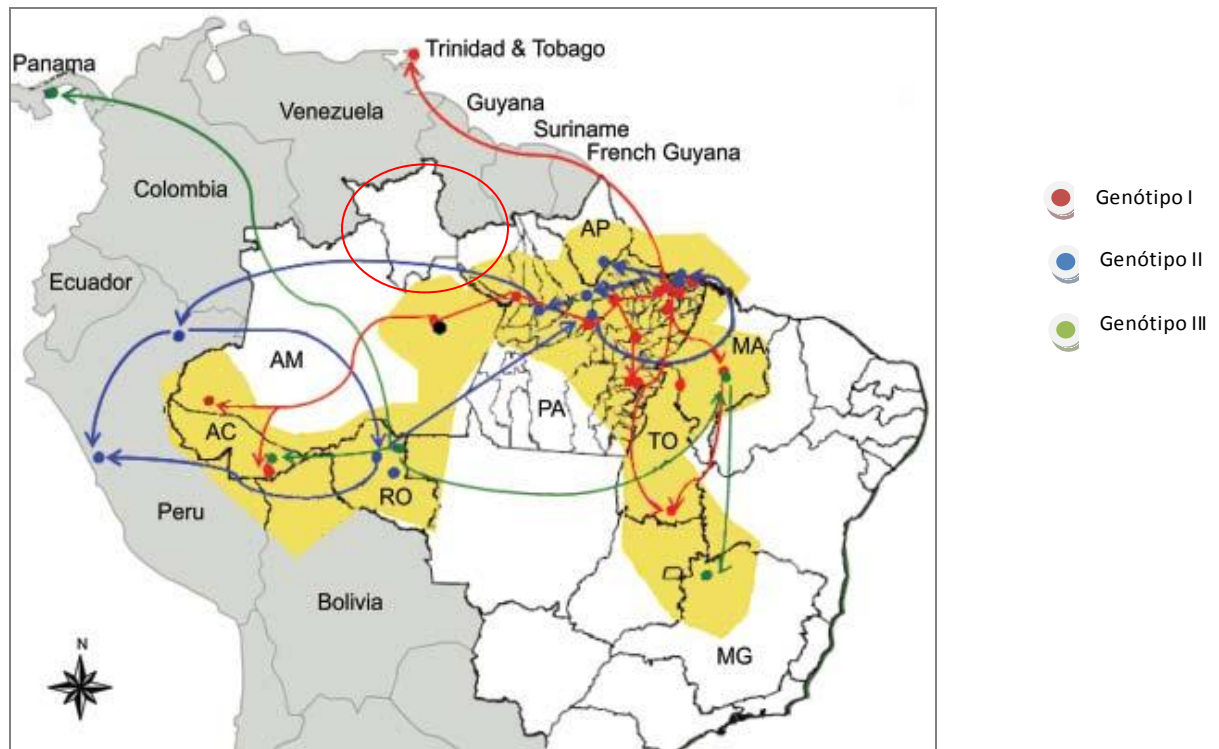


Figura 6 - Circulação dos genótipos I,II e III do OROV na América do Sul.
 Fonte: Adaptado de Vasconcelos et al., 2011.

Apresenta dois ciclos distintos que o tornam capaz de sobreviver na natureza. Possui um ciclo silvestre onde o OROV apresenta como reservatórios preguiças, marsupiais, primatas e aves tendo como principal vetor o mosquito *Aedes serratus* e um ciclo urbano possuindo o homem como reservatório e seu vetor o mosquito *Culicoides paraenses*, conhecido como maruin (PINHEIRO, 1981b) fator que está diretamente relacionado com o aumento de casos de ORO na área urbana, uma vez que a população destes mosquitos está em constante crescimento devido à não existir uma prática constante de combate ao vetor.

Fora do Brasil, epidemias têm sido documentadas no Panamá e no Peru (PINHEIRO, 2004).

1.2.2 Arboviroses no Brasil

O Brasil é um país tropical que possui mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais, cujo risco da emergência de arbovírus no país relaciona-se à existência de cidades grandes, populosas e infestadas por mosquitos *Culex* e

Aedes aegypti (FIGUEIREDO, 2007) sendo este último com característica antropofílica.

Estudos para identificação de arboviroses no Brasil iniciaram-se a partir de 1954 quando um programa que visava à coleção de dados virológicos e sorológicos surgiu através de um convênio entre a Fundação Rockefeller e o Serviço Especial de Saúde Pública sendo desenvolvido no Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará.

Os resultados dessas investigações levaram ao isolamento de mais de 10.000 amostras virais e desse total 157 arbovírus foram isolados pela primeira vez no Brasil e 87 novos no mundo (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1997a).

Através destas investigações foi possível associar o gênero de arbovírus ao tipo de doença que o caracteriza direcionando as pesquisas futuras baseando-se no quadro clínico apresentado pelo paciente.

A associação do gênero de arbovírus com o tipo de doença apresentada está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Arbovírus e outros vírus transmitidos por roedores isolados no Brasil, associados com doença humana, de 1954-2004.

Tipo de Doença	Gênero	Vírus:
Hemorrágica	<i>Flavivirus</i>	Febre Amarela, Dengue 2, Dengue 3
	<i>Arenavirus</i>	Sabiá
Doença febril	<i>Alphavirus</i>	Mucambo, Pixuna
	<i>Arenavirus</i>	Flexal
	<i>Orthobunyavirus</i>	Tacaiúma, Xingu, Apeu, Caraparu, Itaqui, Marituba, Murutucu, Nepuyo, Oriboca, Guaroa, Catu, Guamá, Oropouche
	<i>Flavivirus</i>	Bussuquara, Ilhéus
	<i>Phlebovirus</i>	Alenquer, Candiru, Morumbi, Serra Norte
	<i>Vesiculovirus</i>	Jurona, Piry
Febre	<i>Alphavirus</i>	Mayaro
Exantemática	<i>Flavivirus</i>	Dengue 1, Dengue 4
Encefalite	<i>Alphavirus</i>	Encefalomielite equina leste, Encefalomielite equina oeste, Encefalomielite equina venezuelana
	<i>Orthobunyavirus</i>	Tucunduba
	<i>Flavivirus</i>	Rocio, Encefalomielite de St. Louis

Fonte: Adaptado de Vasconcelos et al., 1998.

Após a análise dos dados apresentados na tabela acima podemos verificar que vários gêneros apresentam o mesmo quadro clínico e que o mesmo gênero é responsável por quadros clínicos diferentes como o caso dos *Alphavirus* e *Flavivirus*. A forma que o indivíduo desenvolverá da doença, após o contágio, não é possível de ser identificada uma vez que esta pode evoluir desde uma forma branda, até um quadro hemorrágico ou de encefalite.

Fatores relacionados ao hospedeiro como presença de doenças crônicas, idade, susceptibilidade genética e infecção secundária estão relacionados às formas graves, como também a circulação de vários sorotipos de vírus.

No caso do DENV, Halstead (1989) apontou como possíveis responsáveis ao surgimento do quadro hemorrágico uma infecção secundária por um sorotipo diferente uma vez que os anticorpos preexistentes ao tipo inicial da infecção amplificam a infecção, não neutralizando o segundo tipo viral, facilitando a sua penetração nos macrófagos através da opsonização do vírus, ocasionando exacerbação da replicação viral.

Mundialmente cerca de 2,5 bilhões de indivíduos, em aproximadamente 100 países, estão em risco de contrair dengue e estima-se que ocorram anualmente cerca de 100 milhões de casos de dengue clássico e mais de 500 mil casos de dengue hemorrágico, com letalidade de até 10% (GUBLER, 1984).

A principal arbovirose que acomete a população brasileira é o DEN sendo responsável por várias epidemias no país. O Dengue encontra-se hoje presente em todos os 27 estados da Federação (BRASIL, 2008), distribuída por 3.794 municípios, sendo responsável por cerca de 60% das notificações nas Américas. No Brasil durante o ano de 2012 foram notificados 585.857 casos de Dengue no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

Surtos de outros arbovírus têm sido confirmados laboratorialmente por todo o país. Cito o Oropouche que é a segunda arbovirose com o maior número de casos no Brasil ficando atrás apenas do Dengue. O Mayaro fica com a colocação de quarto lugar em arbovirose de importância em saúde pública, responsável por epidemias nas áreas rurais da Amazônia e do Planalto Central (FIGUEIREDO, 2007).

1.2.3 Arbovírus isolados em Roraima

O Estado de Roraima está localizado no extremo norte do país, fazendo fronteira internacional ao Norte e Nordeste com a Venezuela e a Leste com a Guiana. Possui uma área de 225.116,1km² sendo a maior parte deste território ocupado pela Floresta Amazônica, porção ocidental e meridional, restando uma faixa estreita na região centro oriental caracterizada por campinas e cerrados. O Estado apresenta clima equatorial ao Norte, Sul e Oeste e clima tropical a leste (IBGE, 2010).

O primeiro surto confirmado laboratorialmente de DEN ocorreu em Roraima entre os anos de 1981 e 1982 quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 com 11.000 casos estimados de pessoas infectadas (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1998). Após este período não foram reportados casos de DEN até o final da década de 90, com epidemias a partir de 1999. O Estado apresentou variação dos sorotipos virais conforme apresentado na Tabela 2 cujos dados foram obtidos através de dados da Secretaria de Saúde do Estado de Roraima e do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima, estando presentes no ano de 2010 os quatro sorotipos virais circulando entre a população caracterizando o Estado de Roraima como hiperendêmico para DEN.

Tabela 2 - Número de casos e sorotipos de DENV isolados em Roraima entre 1999–2012.

Ano	Número de casos de DENV	Sorotipos isolados
1999	1920	DENV-2
2000	4107	DENV-1, DENV-2
2001	3345	DENV-1, DENV-3
2002	1268	DENV-1, DENV-2, DENV-3
2003	4982	DENV-2, DENV-3
2004	564	DENV-3
2005	2317	DENV-2, DENV-3
2006	817	DENV-1, DENV-2, DENV-3
2007	672	DENV-1, DENV-2, DENV-3
2008	5537	DENV-1, DENV-2, DENV-3
2009	3134	DENV-1, DENV-2
2010	7037	DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4
2011	1325	DENV-1, DENV-2, DENV-4
2012	1832	DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4

Fonte: Adaptado de ACOSTA et al., 2012.

Estudos referentes a outros arbovírus não são realizados com frequência e devido a esse fato não se conhece a população destes vírus que pode estar acometendo a população.

Inquéritos sorológicos datados de 1981 (PINHEIRO, 1981) e de 1986 (Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará, em 1986) realizados em numerosas localidades da Amazônia revelaram infecções humanas ao OROV, detectando a presença de anticorpos em habitantes inclusive no Estado de Roraima. Outras pesquisas mais recentes não são localizadas na literatura referenciando o Estado.

Através do diagnóstico laboratorial, anualmente, um grande número de casos suspeitos de DENV notificados em Roraima são descartados através de exames que utilizam como métodos a pesquisa do antígeno NS1, detecção de anticorpos IgM e o isolamento viral. Outros possuem resultado inconclusivo em virtude de amostras biológicas não terem sido coletadas para análise ou terem sido armazenadas de forma inadequada até o momento da análise prejudicando a sua qualidade analítica laboratorial.

A escolha do método a ser realizado depende de fatores relacionados com o número de dias dos sintomas e com o tipo de resultado que se pretende obter, ou seja, se queremos obter apenas resultados positivos ou não para DEN ou se pretendemos obter o isolamento do tipo viral.

Estas informações podem ser verificadas na Tabela 3 que se encontra a seguir.

Tabela 3 - Número de casos notificados para dengue em Roraima, 2007 a 2011, com respectivo resultado.

Ano Notificação	Dengue Clássico	Dengue complicado	Dengue Hemorrágico	Choque Dengue	Descartado	Inconclusivo
2007	667	2	3	0	1752	174
2008	5148	284	105	0	3511	557
2009	2962	112	60	0	2990	57
2010	6752	200	84	1	4177	592
2011	1304	18	3	0	1648	72
Total	16833	616	255	1	14078	1452

Fonte: SINAN/CGVS/SESAU/RR.

Ao se analisar a Tabela 3 verifica-se que entre os anos de 2007 a 2011 o Estado de Roraima apresentou 14078 casos de DEN descartados e 1452 casos inconclusivos demonstrando o alto número de quadros de síndrome febril que anualmente o agente etiológico não é identificado. A necessidade de se ampliar o

diagnóstico laboratorial para diferenciar outros possíveis arbovírus torna-se clara e necessária para que ocorra uma investigação oportuna de surtos. O monitoramento da circulação viral torna-se importante para que a vigilância epidemiológica possa traçar estratégias para o vetor responsável pela transmissão da arbovirose.

A identificação dos arbovírus que se encontram em circulação é fundamental para que as condutas médicas possam ser tomadas de acordo com o vírus isolado uma vez que apresentam quadros clínicos que podem variar de uma síndrome febril acompanhada ou não de exantema, até formas graves caracterizadas por manifestações hemorrágicas e neurológicas (FIGUEIREDO, 2002).

1.2.4 Diagnóstico Laboratorial de DEN usado no LACEN-RR

Os métodos de diagnóstico laboratoriais precisam ter alta especificidade e sensibilidade, como também proporcionar rapidez no tempo de resposta do resultado para que condutas médicas possam ser tomadas.

1.2.4.1 Exame imunoenzimático ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) para captura de Antígeno NS1

O teste de detecção de antígeno (AG) NS1 é utilizado com a finalidade de identificar a presença da glicoproteína não estrutural NS1 que se encontra presente em grandes níveis na circulação sanguínea do paciente na fase aguda da infecção, ou seja, do primeiro ao quinto dia do início dos sintomas, como também é expressa na superfície das células infectadas (LINDENBACH, 2007). O teste baseia-se em um ensaio imunoenzimático do tipo “sandwich” que utiliza uma microplaca cujos orifícios estão sensibilizados com anticorpo (AC) para NS1.

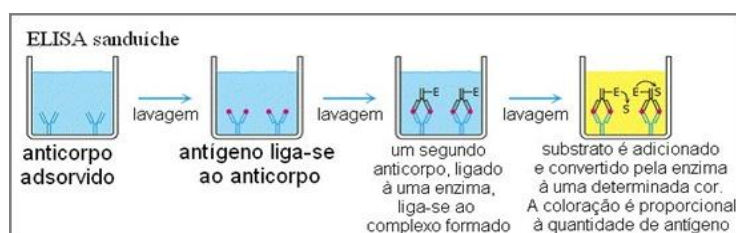


Figura 7 - Esquema da técnica de ELISA para captura de antígeno NS1.
Fonte: <http://www.biomedicinapadrao.com/2010/05/elisa.html>.

1.2.4.2 Exame imunoenzimático ELISA Anticorpo IgM para DENV

Os métodos de detecção de anticorpos antidengue IgM também são usados para o diagnóstico da doença, diferenciando-se no tempo adequado para a coleta das amostras e no significado clínico dos resultados.

Em se tratando de IgM identifica-se como coleta adequada a partir do quinto dia de sintomas.

O teste similar ao descrito anteriormente, baseia-se em um ensaio imunoenzimático do tipo “sandwich”. A microplaca possui orifícios sensibilizados com Ag para detecção de Ac e a diferença esta no conjugado que é composto por anti-IgM.

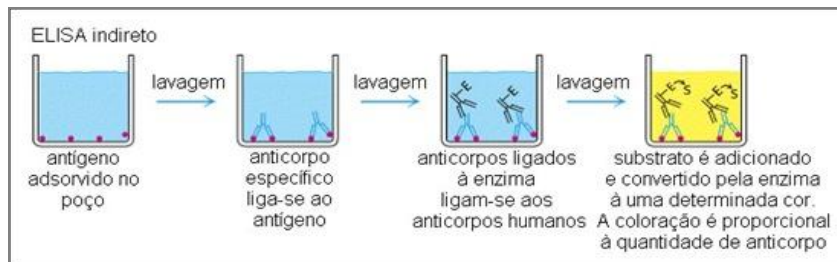


Figura 8 - Esquema da técnica de ELISA para IgM DENV.

Fonte: <http://www.biomedicinapadrao.com/2010/05/elisa.html>.

1.2.4.3 Isolamento viral

O método de isolamento viral baseia-se na pesquisa do DENV em soro de paciente, coletado do primeiro ao quinto dia de sintomas, com posterior identificação do sorotipo através da técnica da imunofluorescência indireta (IFI). Esta técnica é eficaz na detecção do DENV, porém é demorada, pois a inoculação das amostras ocorre por 10 dias para posterior identificação por IFI.

O isolamento é realizado por inoculação da amostra biológica em cultura de células C6/36 de *Aedes albopictus* seguindo a técnica de Igarashi et al, 1985 e a IFI segundo Gubler et al., 1984 que utiliza anticorpos monoclonais para os quatro sorotipos de DENV que serão visualizados através de microscopia de fluorescência.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar os arbovírus Dengue, Mayaro e Oropouche através de RT-PCR em tempo real, em amostras de pacientes com diagnóstico laboratorial negativo para dengue pelo ensaio de captura do antígeno NS1, no Estado de Roraima, no ano de 2012.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade da técnica ELISA para captura do antígeno NS1 para identificar dengue, usando como referência a RT-PCR em tempo real;
- Identificar, nas amostras falso-negativas para dengue pelo ensaio do antígeno NS1, os sorotipos de dengue por RT-PCR convencional e Isolamento Viral;
- Detectar nas amostras negativas para dengue os arbovírus Mayaro e Oropouche por qPCR em etapa única.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) da Universidade Federal de Roraima (UFRR), LACEN-RR e no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia).

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos para a realização do estudo foram apresentados e analisados pelo CoEP/UFRR sendo que o mesmo emitiu parecer favorável para o início das pesquisas, sendo o protocolo da pesquisa 121101-CoEP.

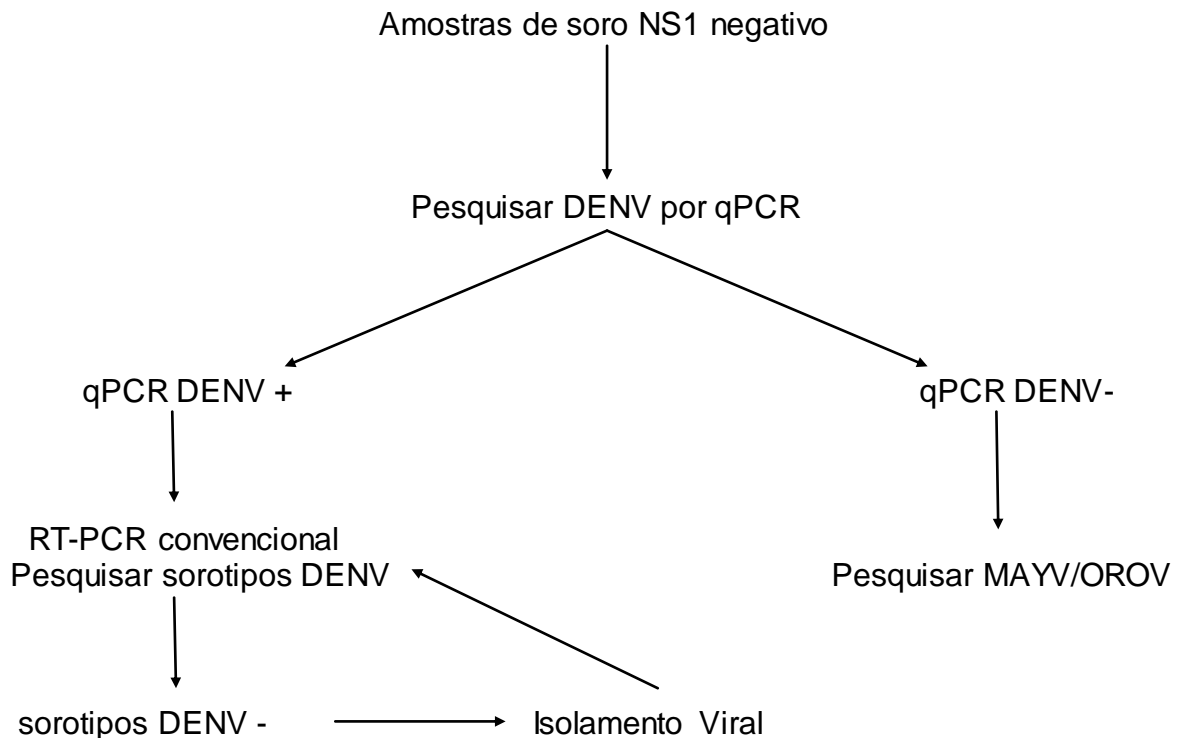
3.2 AMOSTRAS

As amostras clínicas do estudo (n=150) foram selecionadas entre 778 amostras com resultado não reagente para NS1 analisadas pelo LACEN-RR no decorrer do ano de 2012. As informações referentes à data da coleta, início dos sintomas, sexo, idade, município de procedência e sintomas dos pacientes encontram-se no quadro presente nos anexos. Estas se encontravam armazenadas em freezer a - 70°C.

Foram selecionadas amostras que possuíam volume de soro suficiente para a execução de todas as técnicas descritas posteriormente e com as fichas epidemiológicas devidamente preenchidas para que se pudessem verificar os sintomas apresentados pelos pacientes.

As 150 amostras provêm de pacientes com diagnóstico presuntivo de DEN que estavam na fase aguda da doença, ou seja, aqueles que os soros foram coletados entre o primeiro e quinto dia do início dos sintomas que além de febre possuem um ou mais dos sintomas típicos de dengue: artralgia, cefaleia, dor retroorbital, calafrio, mialgia, diarreia, vômito e exantema e com procedência do Estado de Roraima. A verificação do quadro do paciente foi realizada através da leitura da ficha de notificação compulsória que acompanhou a entrada da amostra no LACEN-RR.

3.3 FLUXOGRAMA DA PESQUISA PARA ANÁLISE DAS AMOSTRAS



3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA viral foi extraído através do kit AxyPrep Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep (Axygen®).

Uma alíquota de 200µL do soro foi acrescida de mesmo volume do tampão V-L, responsável pela lise viral, e homogeneizado vigorosamente. Após ocorrer a incubação, à temperatura ambiente, durante 5 minutos, 75µL do tampão V-N foram adicionados. Seguiu-se a centrifugação à 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante clarificado obtido foi transferido para um microtubo onde foram adicionados 250 µL da solução de isopropanol + 1% de ácido acético e procedeu-se a nova homogeneização para posterior transferência desse clarificado para uma coluna seguido de novamente centrifugação a 6000 x g por 1 minuto.

O filtrado obtido foi descartado e acrescentou-se à coluna o tampão W1A na quantidade de 500 µL, deixando em repouso durante 1 minuto à temperatura ambiente. Após este período centrifugou-se a 12000 x g por 1 minuto e novamente

o filtrado obtido foi descartado e, desta vez, acrescentou-se 800 µL do tampão W2 procedendo-se à centrifugação por 1 minuto a 12000 x g. Novamente o filtrado foi descartado e para que todo o resíduo de tampão fosse removido realizou-se nova centrifugação da coluna.

A coluna foi transferida para um novo microtubo e 40 µL de Buffer TE (livre de RNase e DNase) foram depositados no centro dela. Aguardou-se 1 minuto à temperatura ambiente e finalizou-se o procedimento centrifugando a 12000 x g por 1 minuto. Descartou-se a coluna e o eluído final foi aliquoteado para ser utilizado na execução do qPCR.

O RNA viral foi armazenado a -70 C até o uso.

3.5 RT-PCR Em Tempo Real (qPCR)

Realizou-se uma transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real com etapa única para DENV e as amostras que apresentaram resultado negativo foram testadas posteriormente para MAYV e OROV. As amostras que apresentaram positividade para DENV foram submetidas à uma RT-PCR convencional (LANCIOTTI et al., 1992 mod.) para a identificação do sorotipo viral.

Foi selecionada a qPCR para DENV como primeiro método de detecção a ser realizado uma vez que é relatada na literatura a sensibilidade superior dessa técnica de biologia molecular sobre o antígeno NS1 (CHAU et al., 2011).

Além da alta sensibilidade identificada outras características relevantes do método são: a rapidez para a obtenção de resultados, a capacidade de detecção do produto da PCR à medida que este vai sendo amplificado e a possibilidade de quantificação do número de cópias produzidas a cada ciclo.

Estas características são diferenciadas ao se comparar os métodos de RT-PCR convencional com a qPCR.

A qPCR, desta pesquisa, utilizou uma sonda específica para uma região alvo da sequência que se desejava amplificar de DENV, MAYV e OROV.

Esta sonda apresenta em cada uma de suas extremidades um fluorocromo. Na extremidade 5' da sonda está presente o fluorocromo denominado de R (repórter) que emite fluorescência apenas quando estiver separado do outro fluorocromo

presente na extremidade 3', denominado de Q (*quencher*) que apresenta a função de capturar a energia impedindo que a extremidade R emita fluorescência, enquanto estiverem ligados.

Durante a reação a Taq polimerase vai sintetizando uma nova fita até que se encontra com a sonda ligada ao seu alvo na amostra provocando a sua degradação. Desta forma ocorre a liberação do fluorocromo R o qual torna-se capaz de emitir luz em comprimento de onda característico o qual é medido pelo equipamento ao final de cada ciclo. Quanto maior a quantidade de DNA presente menor o número de ciclos necessários para a detecção da emissão de fluorescência pelo equipamento o qual traça um gráfico representando a curva de amplificação da amostra testada.

Assim todo o processo da qPCR ocorre no interior do aparelho evitando que se manipule o produto amplificado diminuindo o risco de contaminação das amostras além de diminuir o trabalho laboral uma vez que todas as etapas da amplificação das cópias de DNA ocorre na plataforma mecanizada e não manualmente.

Diferente, a RT-PCR convencional fornece apenas valores qualitativos onde a visualização dos produtos final é realizada através do uso da eletroforese em gel. Sendo assim torna-se bastante laboriosa, necessitando de mais tempo para a liberação de seus resultados e gerando maior possibilidade de contaminação das amostras com produtos amplificados.

3.5.1 RT- PCR em tempo real como etapa única para identificação dos DENV, MAYV e OROV

Para identificação dos vírus dengue foi realizada uma RT-PCR em tempo real com etapa única e capaz de detectar o genoma de qualquer dos sorotipos virais da dengue a partir dos extratos de RNA usando a técnica desenvolvida por Gurukumar et al. (2009) com adaptações de Naveca, F. (informações verbais) sendo que esta técnica não identifica o sorotipo específico do DENV.

Para os MAYV e OROV foi utilizada uma técnica de RT-PCR em tempo real capaz de detectar os dois vírus simultaneamente em etapa única desenvolvida

por Naveca F. A técnica está em via de publicação pelo que não serão apresentados em neste manuscrito a sequencias dos primers e a sonda.

As reações foram efetuadas com 10µl do RNA misturado com 5µl de uma solução TaqMan Universal PCR Master Mix (mistura otimizada de PCR da Applied Biosystems contendo principalmente tampão, dNTPs, Taq polimerase e referencia passiva ROX) diluído em uma solução com concentração final de 300nM dos primers senso e anti-senso e 100 nM da sonda e água ultrapura em quantidade suficiente para (q.s.p.) um volume total de 20µl. As condições da reação foram de 1 ciclo de 50°C por 2 minutos para realização da transcrição reversa, seguida de 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos para desnaturação da transcritase reversa e ativação da taq-polimerase e 45 ciclos térmicos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. Em todas as reações de PCR foram usadas as sondas e primers segundo os vírus a ser identificado (DENV ou MAYV/OROV) e foram utilizados controles positivos e controles negativos para detecção de possíveis contaminações.

As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento do sistema de PCR-Tempo Real da AppliedBiosystems. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX.

Na parte exponencial da amplificação foi determinado o ciclo threshold (Ct) ou ciclo limiar (quando sinal de fluorescência emitida pela amostra é estatisticamente significativo maior que a fluorescência basal). Este valor indica a positividade da amostra e é uma medida relativa da concentração do alvo, menor Ct implica maior concentração inicial da amostra.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DOS SOROTIPOS DOS DENVs POR RT-PCR CONVENCIONAL

Lanciotti et al. (1992) desenvolveram um método rápido de identificação do sorotipo do vírus dengue baseado em uma RT-PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) com um passo prévio de transcrição reversa do RNA viral produzindo um DNA complementar (cDNA). O método inclui duas etapas de amplificação de DNA sendo a última uma PCR semi-aninhada (Hemi-nested PCR) o que aumenta a sensibilidade do teste. Os passos são descritos a seguir.

O cDNA foi obtido diretamente do RNA viral através da transcrição reversa. Microtubos de 0,2mL, devidamente identificados, contendo em seu interior 5µL do RNA extraído e 1µL do iniciador anti-senso D2 com concentração de 10 µM foram aquecidos a 70°C durante 5 minutos em termociclador. Após este período acrescentou-se a cada microtubo 19 µL do MIX-RT constituído por Buffer em concentração 1X (Promega®), dNTPs a 10nM, transcriptase reversa a 10U/ µL (AMV-RT Promega®) e água DEPC q.s.p. 19 µL, imediatamente colocados no termociclador a 42°C durante 60 minutos para a formação do cDNA.

A primeira etapa da PCR baseia-se na formação de um amplicon com tamanho de 511 pares de bases (pb) que localiza-se entre a região do capsídeo (C) e a região do precursor da proteína da membrana (prM) de todos os sorotipos do DENV. Para que ocorra esta formação prepara-se um MIX-PCR composto por Buffer PCR com concentração de 1X, dNTPs a 10mM, MgCl₂ a 25mM, iniciador D1 e D2 ambos a 10µM, Taq polimerase 5U/ µL e água DEPC q.s.p. 22,5 µL. Ao final da preparação distribui-se 22,5 µL do Mix-PCR a cada microtubo e acrescenta-se a cada um respectivamente 2,5 µL do cDNA levando-se ao termociclador com o programa de amplificação iniciando-se com uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos cada um composto pelas etapas de desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 5 minutos, seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A segunda etapa, destinada à identificação do sorotipo do DENV tem como resultado final a formação de um amplicon com tamanho correspondente ao tipo de vírus, sendo DENV1= 482 pb, DENV2= 119pb, DENV3=290pb e DENV4=389pb utilizando-se iniciadores tipo específicos (TS).

Nesta etapa 25 µL do mix composto por PCR Buffer 1X, dNTPs a 10mM, MgCl₂ a 25 mM, iniciador D1 10µM, iniciadores TS1-4 a 10mM cada, Taq polimerase 5U/ µL e água DEPC p.s.p 25 µL foram distribuídos a novos microtubos acrescentando-se 0,1 µL do amplicon no microtubo correspondente.

O produto formado foi revelado usando-se eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE (Tris+Borato+EDTA) 0,5X corado com 0,5 µL gel red.

Após a polimerização da agarose aplicou-se a cada poço uma mistura de 9 µL do amplicon a ser identificado mais 1 µL de azul de bromofenol. Submete-se a eletroforese a 110V durante 45 minutos e mediante a utilização do fotodocumentador com fonte de luz ultravioleta realiza-se a leitura dos dados.

Na eletroforese utilizou-se um padrão de peso molecular de 100 pares de bases.

Tabela 4 - Tabela de iniciadores (primers).

Iniciador	Sequência	Localização	Tamanho do amplicon
D1	5' – TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG – 3'	134-161	511pb
D2	5' – TTGCACCAACAGTCAA TGTCTTCAGGTTC – 3'	616-644	
TS1	5' – CGTCTCAGTTGATCCGGGG – 3'	568-586	482pb
TS2	5' – CGCCACAAGGGCCATGAACAG – 3'	232-252	119pb
TS3	5' – TAACATCATCATGAGACAGAGC – 3'	400-421	290pb
TS4	5' – CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA – 3'	506-527	389pb

3.7 ISOLAMENTO VIRAL EM CÉLULAS C6/36

A técnica seguiu a metodologia desenvolvida por Igarashi (1978). Células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 foram cultivadas em garrafas estéreis de 55 mL em meio de cultura Leibovitz's L-15 modificado com L- glutamina (Himedia – Mumbai/India), suplementado com solução de 2,95% de Triptose Fosfato, 5% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen™, USA), 10mL de Estreptomicina 100µg/mL – Penicilina 100U/mL (GIBCO – Invitrogen™, USA), 1mL de antifúngico (Fungizone - 5µg/mL) e 10mL de solução de aminoácidos não-essenciais 100x (Sigma®). As garrafas foram incubadas de 24-48 horas, em estufa BOD a 28°C até a formação de monocamada de células.

Após este período, inoculou-se 20µL das amostras de soro em meio L-15, suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino. As garrafas inoculadas foram incubadas em estufa a 28°C por dez dias, onde as monocamadas celulares foram inspecionadas diariamente em microscópio invertido para detecção de efeito citopático. Ao final do período de inoculação realizou-se a extração de RNA do fluido celular procedendo-se à RT-PCR descrita anteriormente (LANCIOTTI et al., 1992).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PESQUISA DO DENV POR RT- PCR EM TEMPO REAL E CONVENCIONAL

Foram testadas 150 amostras, com resultado negativo para kit Platelia® Dengue NS1 ELISA Ag (Bio-Rad), utilizando a metodologia RT-PCR para DENV. Nestas amostras obtivemos positividade para DENV em 33 soros, representando 22% das amostras analisadas.

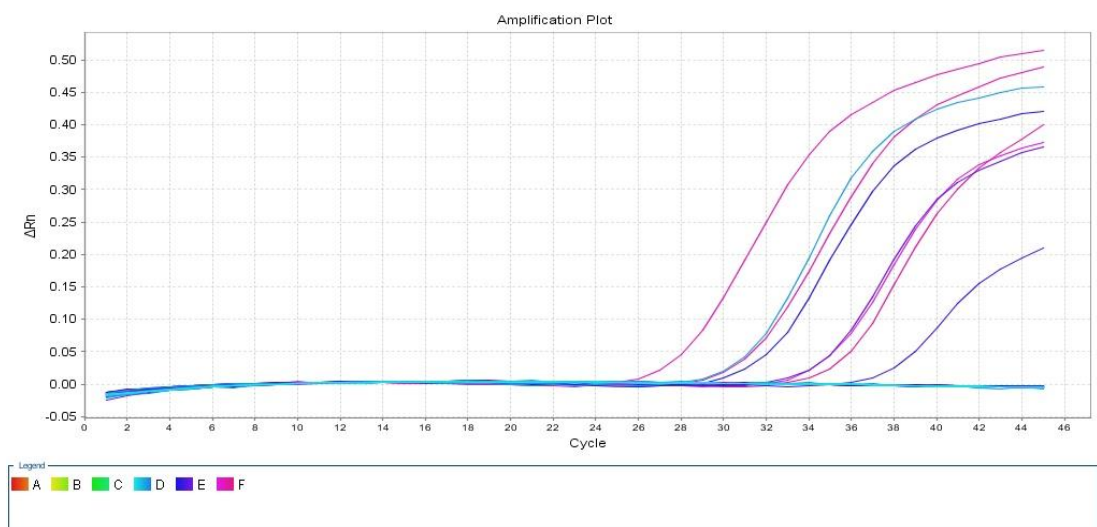


Figura 9 - Curva de amplificação da detecção do vírus dengue em RT-PCR em tempo real.

O eixo vertical identifica a quantidade de ciclos necessários para o equipamento detectar a presença do alvo (DENV), através da fluorescência emitida pela sonda. Os Ct indicam uma medida relativa de concentração, sendo que quanto menor a quantidade de ciclo necessários para a detecção do alvo, maior a quantidade de RNA presente na amostra testada.

Posteriormente, as 33 amostras positivas por qRT-PCR foram submetidas a RT-PCR convencional de Lanciotti (LANCIOTTI et al., 1992) para identificação do sorotipo viral do DENV onde obtivemos os resultados apresentados na tabela abaixo.

Tabela 5 - Número de amostras NS1 negativas testadas por qPCR para DENV com posterior identificação de sorotipo por RT-PCR convencional

Amostras NS1 Negativas (total)	Amostras qPCR DENV		Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (LANCIOTTI et al., 1992 mod.)					
	Neg	Pos	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Negativo	Inconclusivo
150	117 (78%)	33 (22%)	1	4	2	21	03	02

Embora termos obtido um número de amostras positivas pequenas para DENV(33), foram identificados os quatro sorotipos de dengue.

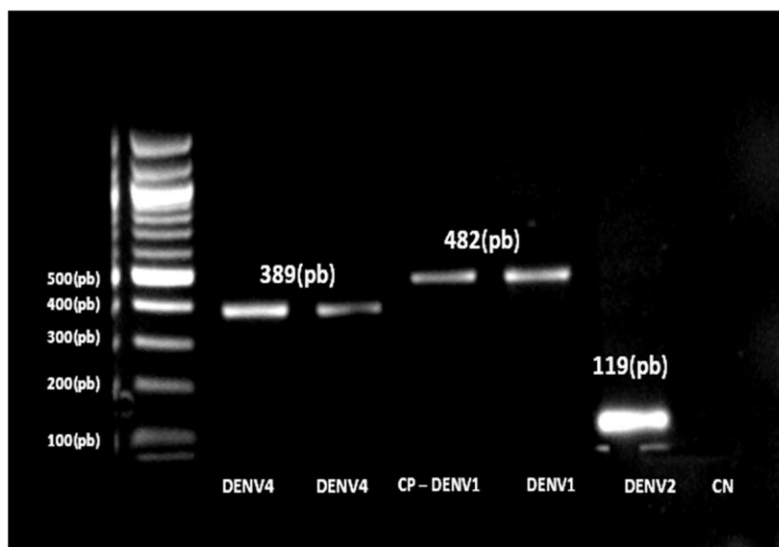


Figura 10 - Apresentação da eletroforese para os sorotipos virais de DENV.

Estes resultados concordam com os sorotipos reportados pela Vigilância Epidemiológica do Estado de Roraima para ano de 2012, e, reafirmam Roraima como uma estado hiperendêmico para o dengue, a esta situação devemos acrescentar a alta incidência da doença no Estado que foi classificado pelo Ministério da Saúde como de alta incidência em dez dos últimos treze anos (Acosta et al. 2012). Este fato indica um provável elevado número de infecções secundárias e assim seja responsável para o número de falso-negativos, que neste trabalho correspondeu a 22% das amostras selecionadas.

Levando em conta este fato a utilização do kit antígeno NS1 como teste para identificação de DENV, na fase aguda da doença, em locais que apresentem a circulação de vários sorotipos e alta incidência da doença, como o Estado de Roraima, deve ser avaliada, pois é importante, para as ações de vigilância, o fechamento do maior número de casos que se apresentem.

As amostras negativas e inconclusivas na RT-PCR convencional podem ter sofrido degradação do seu RNA nos processos de descongelamento da amostra ou não ter apresentado material genético suficiente para que a sua amplificação seja identificada por esta técnica mesmo após ter-se procedido à inoculação destas amostras em células C6/36 para isolamento viral. Não podemos descartar a possibilidade de variações genéticas que façam os iniciadores de Lanciotti et al. (1992) não reconhecer os alvos. As amostras negativas serão realizadas segunda passagem para tentar identificar o sorotipo.

A identificação de amostras positivas para DENV através da técnica de qPCR, que foram liberadas como falso-negativas pela técnica de detecção do antígeno NS1 está em conformidade com estudos comparativos realizados para as técnicas referidas acima. Trabalhos anteriores que avaliaram a especificidade dos kits comerciais disponíveis de detecção do antígeno NS1 (KUMURASAMY et al., 2007; LIMA et al., 2010) apontaram a especificidade do kit Platelia™ Dengue NS1 Ag de 100% correspondendo as informações do fabricante presentes na bula.

A sensibilidade apresentada pelo fabricante (Bio-Rad) para a detecção do antígeno NS1 corresponde a 91%, semelhante à obtida por Chau et al. (2011) o qual apresentou um estudo comparativo entre as técnicas de NS1, isolamento viral, RT-PCR convencional e RT-PCR em tempo real utilizando SYBR Green em amostras identificadas com dengue e testadas nas quatro metodologias acima tendo atingindo a sensibilidade de 91,6%. Também se verificam dados comparativos entre vários kits comerciais de detecção do antígeno NS1 em Silva et al. (2011), no qual identifica o kit Platelia™ NS1 (Bio-Rad) o teste que apresentou maior sensibilidade (95%).

A presença neste estudo de amostras positivas para DENV cujo exame de NS1 foi liberado como negativo pode ser devido à presença de infecções secundárias (TRICOU et al., 2010). O fato do Estado de Roraima ser considerado hiperendêmico para DENV e apresentar a circulação dos quatro sorotipos virais, conforme dados apresentados posteriormente referentes aos sorotipos

encontrados neste trabalho e já apresentados por Acosta et al. (2012) reforça este fato.

O teste de detecção de antígeno NS1 em infecções secundárias apresenta menor sensibilidade devido à presença de anticorpos anti-NS1 formados após o primeiro contato. O complexo imunológico formado entre o anticorpo anti-NS1 e o antígeno NS1, numa nova infecção, impede a capacidade do teste em detectar os antígenos livres, diminuindo a sensibilidade do teste (YOUNG et al., 2000).

Estudos sobre as variações de sensibilidade da detecção do antígeno NS1, na infecção primária x secundária apresentam dados com queda de sensibilidade variando de 87,5% x 53,5% (DUONG et al., 2011) e 95% x 71,4% Lima et al., 2010.

Em função ao número de dias do aparecimento dos sintomas que os pacientes deste estudo apresentavam no momento da coleta verifica-se que o período variou de 1 a 5 dias sendo que as amostras que tiveram um resultado falso-negativo encontravam-se entre o primeiro e quarto dia de sintomas conforme podemos observar na Tabela 6.

Tabela 6 - Número de dias de sintomas que o paciente apresentava no momento da coleta

Identificação da amostra	Número de dias de início dos sintomas	Identificação da amostra	Número de dias de início dos sintomas	Identificação da amostra	Número de dias de início dos sintomas
A08	02	A88	00	A664	01
A16	02	A115	01	A667	02
A18	01	A140	02	A669	03
A41	02	A186	02	A674	03
A43	03	A245	03	A675	02
A44	02	A247	04	A676	02
A45	02	A601	01	A680	02
A50	02	A619	01	A689	03
A59	01	A621	01	A705	04
A63	02	A629	00	A740	02
A75	03	A634	01	A743	03

Quando avaliamos a sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag em função do número de dias do início dos sintomas verificamos que as amostras testadas encontravam-se no período de maior sensibilidade apresentado pelo kit.

Para tal apresentamos a tabela referente à sensibilidade do kit de acordo com o número de dias de febre, segundo dados do fabricante.

Tabela 7 - Sensibilidade do kit em função do número de dias do início dos sintomas no momento da coleta do sangue.

Dias após o aparecimento de febre	Sensibilidade do teste Platelia™ Dengue NS1 Ag
0	100 %
1	87,8%
2	92,5%
3	95 %
4	96,3%
5	52,6%
≥6	35,7%

Fonte: Bula do kit Platelia™ Dengue NS1 Ag.

Quanto à sensibilidade, de acordo com o sorotipo de DENV, o fabricante informa que não há diferença quanto aos quatro sorotipos e estudos apresentam uma grande diversidade de resultados referentes aos sorotipos que produzem maior sensibilidade (SILVA et al., 2011; DUONG et al., 2011). Através dos nossos resultados obtidos não podemos relacionar sensibilidade do kit com o sorotipo, pois apesar de termos isolado um maior número de DENV-4 isto apenas reflete o perfil epidemiológico da circulação viral de dengue, que no ano de 2012, teve este sorotipo predominando.

Outro fator que pode ter interferido nos resultados falso-negativos para DENV é a viremia apresentada pelo paciente no momento da coleta, pois viremia muito baixa pode ocasionar a não detecção do antígeno NS1 pelo kit (LINDENBACH, 2007).

Por todos estes fatores vários pesquisadores tem proposto a realização de mais de uma técnica de detecção de dengue para aumentar a identificação do número de casos. De Araújo, 2009, caracterizou seu trabalho obtendo por qPCR a identificação de DENV em um maior número de casos de dengue em amostras de tecido proveniente de pacientes que foram a óbito na epidemia de 2002 no Rio de Janeiro, sendo que após realizar as técnicas de qPCR, isolamento viral, RT-PCR convencional e imunohistoquímica em conjunto aumentou a sensibilidade do diagnóstico para 89,6% apresentando a necessidade da integração das técnicas para aumentar a acurácia de detecção viral.

O fator de integração das técnicas também é confirmado por Huang et al., 2012 que ao combinar as técnicas de qPCR e antígeno NS1 obteve a sensibilidade de 99,52% dos casos pesquisados na fase aguda do doença conforme apresentado na tabela abaixo.

Tabela 8 – Comparação entre a sensibilidade das técnicas e resultados laboratoriais confirmados de DENV em períodos distintos de sintomas

Positividade das técnicas	Quantidade de dias de sintomas		Total de casos n=392 (100%)
	0-3 dias n=209 (%)	4-8 dias n= 183 (%)	
qPCR (sensibilidade)	196 (93.78)	86 (46.99)	282 (71.94)
NS1 (sensibilidade)	156 (74.64)	112 (61.2)	268 (68.37)
IgM/IgG	21 (10.05)	136 (74.32)	157 (40.05)
qPCR and NS1	208 (99.52)	134 (73.22)	342 (87.24)
NS1 and/or IgM	158 (75.6)	165 (90.13)	323 (82.40)

Fonte: Adaptado de Huang et al., 2012

4.2 RT- PCR EM TEMPO REAL PARA MAYV/OROV

Das 117 amostras DENV negativo pelas técnicas de NS1 e RT-PCR em tempo real, foram testadas 72 amostras por RT-PCR em tempo real com etapa única para MAYV/OROV (45 amostras tiveram soro e/ou RNA insuficientes). Ao todo foram positivas 20 amostras sendo 7 (sete) amostras para MAYV e 13 (treze) amostras para OROV representando 27,7% das amostras analisadas. Esta etapa do processo foi inicialmente planejada para ser realizada no LaBMol/UFRR mas devido a problemas operacionais e de reagentes foi realizada por pesquisadores do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia).

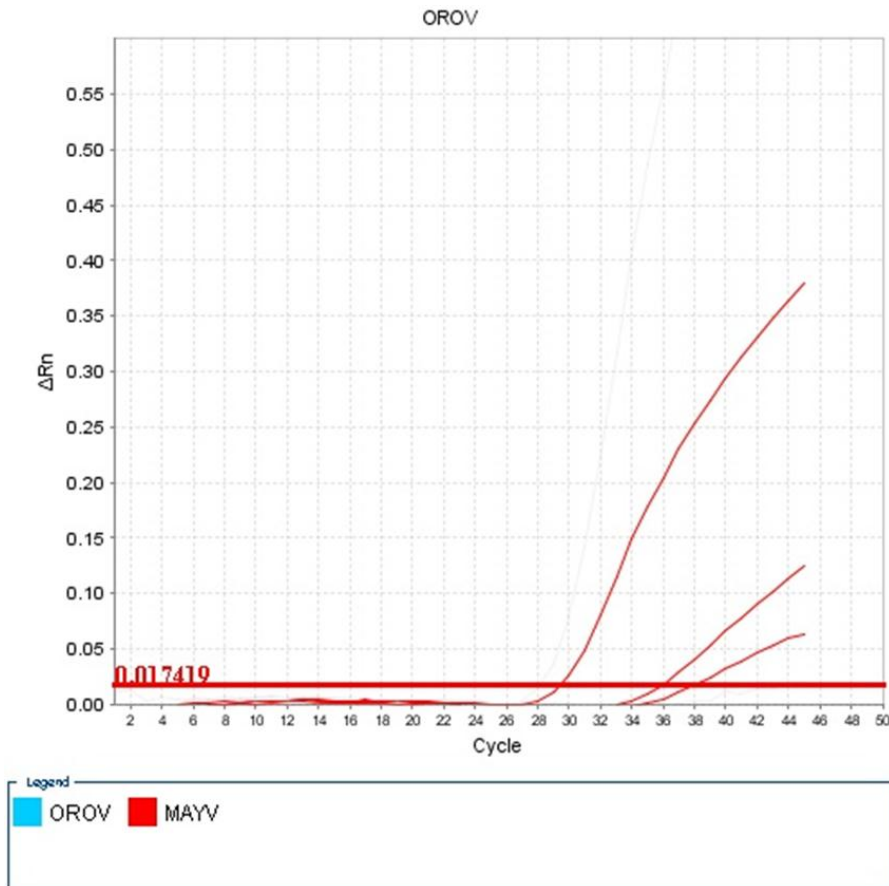


Figura 11 - Curvas de amplificação da detecção do vírus MAYV por RT-PCR em tempo real

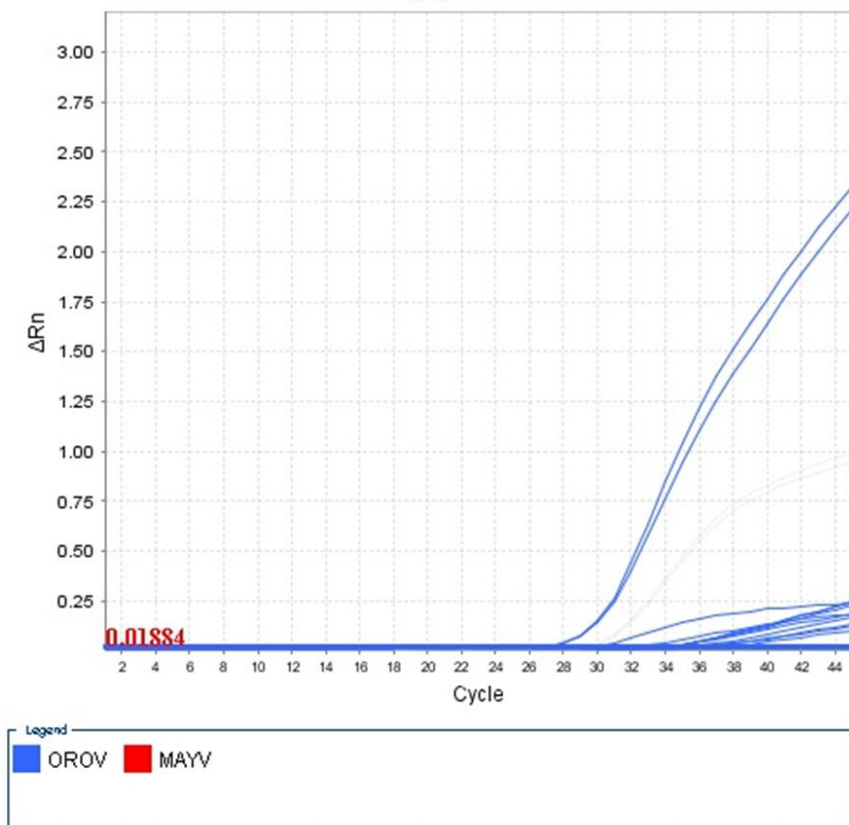


Figura 12 - Curvas de amplificação da detecção de OROV por RT-PCR em tempo real

Tabela 9 - Número de amostras testadas por qPCR para MAYV/OROV.

Total de amostras NS1 negativas	Amostras testadas por qPCR para MAYV/OROV		Amostras positivas	
	Total	Positivas %	MAYV	OROV
150	72	27,7	07 (9,7%)	13 (18%)

Vale ressaltar que a técnica utilizada está em fase de validação pela equipe ILMD/Fiocruz Amazônia, por isso precisamos ter cautela com os resultados obtidos, pelo que estão sendo desenvolvidas técnicas de RT-PCR convencional, clonagem e sequenciamento para confirmar estes resultados.

Os registros que temos conhecimento de identificação laboratorial de OROV em Roraima correspondem aos anos de 1981 e 1986, quando pesquisadores do Instituto Evandro Chagas (IEC), Belém, Pará, realizaram inquéritos sorológicos detectando a presença de anticorpos em habitantes da capital Boa Vista (PINHEIRO et al., 1981; IEC, 1986) e em comunidades indígenas (PINHEIRO et al., 1981). Informações junto à Coordenação Geral de Vigilância em Saúde (dados não publicados) descrevem a identificação de casos positivos de Oropouche e Mayaro entre os anos de 2004/2005 realizada pelo IEC em amostras aleatórias, cujo diagnóstico laboratorial para DENV tinha sido negativo.

A identificação destes dois arbovirus no Estado é de grande importância epidemiológica uma vez se tratar de RR um Estado da região norte que apresenta dados insipientes sobre o isolamento destes vírus apesar de trabalhos apresentarem a identificação de casos de MAY em Estados vizinhos assim como em países da América do Sul que circundam o Estado.

Na figura abaixo estão representados Países de América do Sul onde tem casos de Mayaro reportados. Ao observar o mapa verificamos os países e estados brasileiros que tem fronteira com Roraima (RR circulado de vermelho) em que o MAYV foi isolado. O deslocamento de indivíduos infectados através dos países ou Estados brasileiros pode provocar e reemergência deste arbovirus e confirma a necessidade de se implantar em Roraima a vigilância deste vírus uma vez que casos isolados ou surtos podem passar despercebidos ou serem confundidos por dengue, pois apresentam sintomas semelhantes.

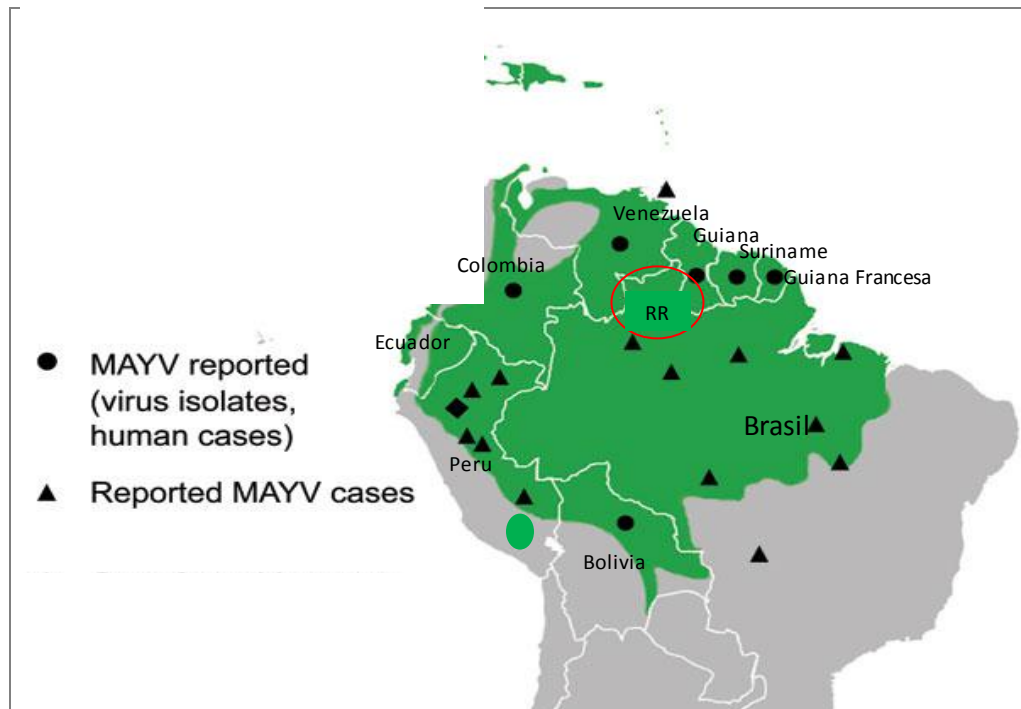


Figura 13 - Identificação de casos de MAYV na América do Sul.
Fonte: Adaptado de Neumayer et al., 2012.

Desta forma pesquisas futuras caracterizando os genótipos de MAYV e OROV poderão orientar nos ciclos de circulação.

4.3 APRESENTAÇÃO DOS SINTOMAS

Os sintomas apresentados pelos pacientes com DEN são compatíveis com os descritos na literatura predominando febre, seguido de cefaleia e mialgia. Sintomas semelhantes foram observados nos casos de MAY e ORO onde predomina a cefaleia seguida mialgia.

Sendo assim os dados obtidos confirmam que a diferenciação destas arboviroses apenas pela sintomatologia não se torna eficaz uma vez que apresentam as mesmas características.

A sintomatologia dos pacientes em estudo está apresentada na tabela 10.

Tabela 10 - Número de casos e porcentagem de sintomas apresentados pelos casos de Mayaro e Oropouche positivos.

Sintoma	Dengue (33 casos)	Mayaro (7 casos)	Oropouche (13 casos)
Febre	33 (100%)	07 (100%)	13 (100%)
Mialgia	17 (51,5%)	07 (100%)	09 (69,2%)
Artralgia	09 (27,3%)	04 (57,1%)	03 (23%)
Cefaleia	19 (57,6%)	06 (85,7%)	13 (100%)
Dor ocular	09 (27,3%)	04 (57,1%)	05 (38,5%)
Exantema	06 (18,2%)	03 (42,8%)	02 (15,4%)
Calafrio	06 (18,2%)	00	01 (7,7%)
Náuseas	01 (3%)	01 (14,3%)	03 (23%)
Diarreia	02 (6%)	00	03 (23%)
Vômito	01 (3%)	02 (28,6%)	01 (7,7%)
Tontura	02 (6%)	00	01 (7,7%)
Dor abdominal	01 (3%)	00	00
Dificuldade respiratória	01 (3%)	00	00
Dor lombar	00	01 (14,3%)	02 (15,4%)

4.4 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

O Estado de Roraima é composto por 15 municípios, sendo eles: Boa Vista (capital), Alto Alegre, Amajari, Bonfim, Cantá, Caracaraí, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São João da Baliza, São Luiz do Anauá, Uiramutã, conforme Figura abaixo.

Sendo que os municípios de Bonfim e Pacaraima fazem fronteira internacional com Guiana Inglesa e Venezuela, respectivamente. Nestas fronteiras existe um grande fluxo de pessoas que se deslocam a estes países com regularidade para fazerem compras e turismo. Também temos a presença de estrangeiros em RR que vêm principalmente em busca de atendimento médico na rede pública de saúde.

Desta forma este fluxo populacional entre as fronteiras pode ocasionar a entrada de arbovírus presente nestes países.



Figura 14 - Mapa do estado de Roraima com a representação dos municípios.
Fonte: <http://jota7.com/brasil>.

Das amostras analisadas com resultado de antígeno NS1 negativo e qPCR positivo para DENV, MAYV e OROV obtivemos os seguintes resultados referentes a sua procedência.

Tabela 11 - Número de casos NS1 negativo para dengue, positivos por RT-qPCR para DENV, MAYV e OROV analisados por município.

Município	Total de amostras analisadas/ %	Resultados obtidos por RT-qPCR		
		DENV n=33	MAYV n=7	OROV n=13
Boa Vista	140 / 93,3%	32	05	10
Cantá	04 / 2,7%	00	01	01
Bonfim	02 / 1,33%	00	01	01
Caracaraí	01 / 0,67%	00	00	01
Amajari	01 / 0,67%	00	00	00
Iracema	01 / 0,67%	01	00	00
Alto Alegre	01 / 0,67%	00	00	00

Também foi avaliado o número de amostras que durante os anos de 2011 e 2012 foram enviadas para o LACEN-RR para ser realizada a detecção do antígeno NS1, sendo separadas por município obtendo os seguintes dados abaixo.

Tabela 12 - Número total de amostras testadas por município para pesquisa do vírus dengue pela técnica do antígeno NS1 nos anos de 2011 e 2012.

Município	População em 2012 *	2011		2012	
		Total de NS1 realizado	NS1 negativo	Total de NS1 realizado	NS1 negativo
Alto Alegre	16.228	04	02	01	01
Amajari	9.936	03	03	03	02
Boa Vista	296.959	371	315	952	741
Bonfim	11.188	00	00	08	07
Caracaraí	19.019	00	00	07	06
Caroebe	8.480	03	01	02	02
Cantá	14.707	14	13	11	08
Iracema	9.288	02	02	02	01
Mucajá	15.328	02	01	05	04
Normandia	9.364	02	02	00	00
Pacaraima	10.953	01	01	03	03
Rorainópolis	25.319	03	02	01	01
S. João da Baliza	7.023	00	00	00	00
São Luiz do Anauá	6.968	00	00	01	01
Uiramutã	8.764	00	00	02	01
Total	469.524	407	342	998	778

Fonte: Sistema de informação do LACEN-RR/ GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial).

*Dados obtidos DATASUS.

Podemos avaliar na tabela 12 que a concentração de amostras testadas (93,3%) encontra-se na capital do Estado, Boa Vista, desta forma tendo – se obtido o maior número de amostras positivas. No ano de 2011, verifica-se que o número de amostras provenientes de outros municípios comparando-se às provenientes de Boa Vista é baixa, dificultando a vigilância do DENV e prejudicando o monitoramento dos sorotipos de DENV circulantes no Estado, desta forma o padrão epidemiológico da capital é referenciado para os demais municípios.

Destacamos os municípios de Bonfim, fronteira com República Cooperativa da Guiana e Pacaraima, fronteira com a República Bolivariana da Venezuela que apresentam um número insuficiente de amostras necessário para ser realizada uma vigilância sentinela de síndromes febris. Para tornar eficiente a vigilância das fronteiras poderia ser criado um programa de monitoramento de amostras de síndromes febris que semanalmente enviasse material para serem pesquisadas as principais arboviroses.

5 DISCUSSÃO

Através de literaturas recentes tem-se evidenciado que as técnicas de PCR têm sido eleitas para o desenvolvimento de pesquisas na área da saúde. Este fato deve-se à alta sensibilidade e especificidade que as técnicas desenvolvidas por Biologia Molecular têm alcançado, quando comparadas às técnicas sorológicas (CHAU et al., 2011).

Ainda no que se refere às técnicas de PCR a predileção pela técnica RT-PCR em tempo real frente a RT-PCR convencional destaca-se devido a possibilidade de contaminação da reação com os produtos da amplificação ser reduzida pois todo o processo ocorrer em um sistema fechado, ou seja, no interior de plataformas de automação onde não ocorre a manipulação das amostras após a amplificação. Além disso, vale destacar a redução do tempo necessário para a liberação dos resultados e a possibilidade de quantificar o DNA presente na amostra testada.

Ao se pesquisar o DENV nas amostras do estudo (n=150), as quais tinham sido liberadas anteriormente com um resultado negativo para DEN através do teste de detecção do antígeno NS1, obte-se positividade para esta arbovirose em 33 amostras (22%) utilizando-se a metodologia qPCR para DENV (GURUKUMAR et al., 2009).

A identificação destas amostras que foram liberadas como falso-negativas para DENV condiz com outros estudos que avaliaram a sensibilidade de diagnóstico laboratorial através de diferentes técnicas entre elas: NS1, Isolamento Viral, PCR convencional e qPCR, nos quais tendo apresentado maior sensibilidade a técnica de qPCR (CHAU et al., 2011).

Ao se evidenciar esse fato destaca-se a necessidade de implantação desta metodologia no Estado de Roraima para que o número de casos que são liberados como falso-negativos diminua e assim as condutas médicas e as ações de vigilância epidemiológica sejam melhores direcionadas conhecendo-se o agente que está acometendo a população. Também a diminuição do tempo necessário para a liberação de resultados é fator importante uma vez que as ações em vigilância em saúde podem ser realizadas em tempo oportuno.

Dentre estas 33 amostras positivas para DEN através de qPCR foram identificados através da técnica de RT-PCR convencional (LANCIOTTI et al., 1992), os quatro sorotipos virais de DENV (DENV-1, DENV -2, DENV-3 e DENV-4) confirmando o Estado de RR como hiperendêmico para DEN por possuir em circulação os quatro sorotipos virais no mesmo período, podendo este ser um fator determinante pela presença de um alto número de infecções secundárias na população do Estado refletindo num alto número de resultados falso – negativos para DENV devido á formação de imunocomplexos entre anticorpos anti-NS1, formados previamente, e antígeno NS1 originado de uma nova infecção (YOUNG et al., 2000).

Mais uma vez destaca-se a necessidade de investimento na implantação de outras metodologias que mantenham uma sensibilidade alta de detecção viral em áreas que apresentam situação de risco para o surgimento de infecções secundárias.

O indicativo que houve em 2012 a circulação de MAYV e OROV em RR, juntamente com os quatro sorotipos virais, também foi evidenciado através de resultados preliminares obtidos utilizando-se uma metodologia de qPCR que está em fase de validação desenvolvida pela equipe do ILMD/FIOCRUZ Amazônia. Nesta pesquisa foram obtidas 07 amostras de MAYV e 13 amostras de OROV.

Ao realizar o somatório das amostras identificadas no final desta pesquisa tivemos a identificação tardia de 53 amostras (33 DENV, 07 MAYV e 13 OROV), que correspondem a 35,3% das amostras selecionadas.

Os pacientes correspondentes a estas amostras estudadas não tiveram um diagnóstico confirmado laboratorialmente e desta forma não houve por parte da vigilância a execução de ações de controle de vetores.

O indicativo que RR possui a circulação de MAYV e OROV entre a sua população também é destaque neste trabalho uma vez que há apenas estudos insipientes sobre a circulação destes arbovírus (PINHEIRO et al., 1981; IEC, 1986).

A falta de estudos específicos para estes vírus no Estado de Roraima de forma contínua pode estar contribuindo para o elevado número de casos de DEV que não é confirmado laboratorialmente destacando, mais uma vez, a necessidade da ampliação do diagnóstico laboratorial para que seja realizado um monitoramento de outros arbovírus, além do dengue e febre amarela.

A sintomatologia apresentada pelo paciente provocada por DENV, MAYV e OROV não é suficiente para que se possa indicar o tipo viral uma vez que estes sintomas tornam-se comuns para estes três arbovírus e ambos podem evoluir para quadros graves. Nas amostras identificadas com MAYV destacou-se que 100% dos pacientes relataram mialgia, sendo este um sintoma característico para este arbovírus. Já nas amostras identificadas com OROV tivemos a maior porcentagem (100%) referenciando cefaleia, seguido por mialgia (69,2%).

A procedência das amostras identificadas concentra-se na capital do Estado, Boa Vista, sendo que através dos dados apresentados torna-se evidente que o monitoramento de arbovírus, incluindo o DENV, tem que ser ampliado nos demais municípios do Estado.

No ano de 2011, 91,1% dos exames encaminhados para o LACEN-RR destinados à pesquisa de detecção do antígeno NS1 eram provenientes de Boa Vista sendo que no ano de 2012 este número aumentou para 95,4%.

Os demais municípios apresentam números muito baixos de análises laboratoriais encaminhadas para o LACEN-RR sendo que torna-se importante destacar que municípios que se localizam em área de fronteira internacional como Pacaraima e Bonfim estão entre os municípios com o menor número de amostras encaminhadas para testagem. A falta do monitoramento viral nos municípios pode contribuir para a entrada de um agente capaz de ocasionar um surto no Estado além de não se conhecer a população viral presente nestas áreas.

Segundo a Lei 8.080/1990:

“A Vigilância Epidemiológica é definida como um conjunto de ações que proporcionam o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos”.

Mediante esta definição é que se questiona como a vigilância do Estado de Roraima pode planejar ações de controle vetorial que se tornem eficazes se está havendo um número significativo de diagnósticos laboratoriais que não estão sendo detectados pelas técnicas disponíveis na rede credenciada e se os municípios não estão realizando um monitoramento adequado devido ao número de amostras encaminhadas para análise.

Mediante os resultados obtidos sugerimos a implantação da técnica de qPCR no Estado de Roraima para a pesquisa de DENV como também o monitoramento de outros arbovírus como MAYV e OROV objetivando aumentar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial e assim diminuindo o número de casos descartados para DEN e que seja realizado um efetivo monitoramento nos demais municípios de Roraima utilizando como estratégias a educação em vigilância em saúde.

6 CONCLUSÕES

- A RT-qPCR para DENV demonstrou-se mais sensível que o kit Platelia™ Dengue NS1 Ag;
- Foram isolados, nas amostras falso-negativas para DEN (NS1 negativas), de 2012 os 4 sorotipos de dengue;
- O número de infecções secundárias devido à circulação de mais de um sorotipo de dengue pode estar diminuindo a sensibilidade do NS1;
- Os resultados preliminares pela técnica de q-PCR indicam a presença do vírus Mayaro e Oropouche no Estado de Roraima;
- O monitoramento de DENV nos demais municípios do Estado, excluindo Boa Vista, tem que ser ampliado;
- O monitoramento de outros arbovírus, além do Dengue, é necessário no Estado de Roraima.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, P. O. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1979-1981, out. 2011.
- ACOSTA, P. O. A. et al. Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains. **Dengue Bulletin**, v. 36, p. 50-63, 2012.
- ARAÚJO, J. M. de et al. A retrospective survey of dengue virus infection in fatal cases from an epidemic in Brazil. **J Virol Methods**, v. 155, n. 1, p. 34-38, 2009.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, jun. 2007.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, nov. 2009.
- BEDIN, F. Le Brésil, une terre d'élection pour les arboviroses? **Médecine Tropicale**, n. 67, p. 281-287, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Vigilância em Saúde: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. p. 21-48.
- CALISHER, C. H. et al. Proposed antigenic classification of registered arboviroses. I. Togaviridae, Alphavirus. **Intervirology**, v.14, n. 5/6, p. 229-232, 1980.
- CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N. Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: MONATH, T. P. (Ed.). **The Arboviruses: epidemiology and ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.1, p. 19-58.
- CASALS, J. The arthropod-borne group of animal viruses. **Transactions New York Academic Science**, v. 19, p. 219-235, 1957.
- CHAU, K. B. et al. A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of acute dengue. **Malaysian J Pathol**, v. 33, n. 1, p. 13-20, 2011.
- DÉGALLIER, N. et al. Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, n. 44, p.124-135, 1992.
- DUONG, V. et al. Clinical and Virological Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen- Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 10, jul. 2011.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Pathogenesis of dengue vírus infections. **Medicina**, Ribeirão Preto, n. 32, p. 15-20, jan./mar. 1999.

- FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, n. 2, p. 1643-1649, 2000.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; FONSECA, B. A. L. **Tratado de infectologia: dengue**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 204-217.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviroses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, mar./abr. 2007.
- FORATTINI, O. P. **Entomologia medica**. Culicini: Culex, Aedes y Psorophora. Sao Paulo: Edit. Univ, 1965. v. 2, p. 506.
- GUBLER, D. J. et al. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am J Trop Med Hyg**, n. 33, p. 158-165, 1984.
- GURUKUMAR, K. R. et al. Developed of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses. **Virology Journal**, v. 6, n. 10, p. 1-8, 2009.
- HALSTEAD, S. B. Antibody, Macrophages, Dengue Virus Infection, Shock, and Hemorrhage: A Pathogenetic Cascade. **Rev Infect Dis**, v. 11, n. 4, p. 830-839, 1989.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, p.1644-1652, 2007.
- HUBER, K. et al. Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) le principal vecteur des virus de la dengue au Vietnam: écologie, structure génétique, compétence vectorielle et résistance aux insecticides. **Annales Société Entomologique France**, p. 109-120, 2000.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/interativos.php>. Acesso em: 23 maio 2012.
- IGARASHI, A. Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **J. Gen. Virol**, p. 531-544, 1978.
- INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 384.
- INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org.br/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acesso em: 14 jun. 2012.
- KARABATSOS, N. **Internacional catalogue of arboviroses including certain other viroses of vertebrates**. 3. ed. San Antonio, USA: American Society of Tropical Medicine & Hygiene, 1985. 1141 p. Atualizado em 2001.
- LANCIOTTI, R. S. et. al. 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.

- LIMA, M. R. Q. et al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, 2010.
- LINDENBACH, D. B.; THIEL; H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The viruses and their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health, 2007. p. 1101-1152.
- LONG, K. C. et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 85, n. 4, p. 750-757, 2011.
- MERTZ, G. J. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (Ed.). **Clinical virology**. New York: Churchill-Livingstone, 1997. p. 943-972.
- MONATH, T. P. Yellow fever. In: MONATH, T. P. (Ed.). **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988. v. 5, p.139-231.
- LOURÃO, M. P. G. et al. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, jan. 2012.
- MUNÓZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: um arbovírus reemergente em Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, Bogotá, v. 32, n. 2, 2012.
- MURRAY, P. R.; DREW ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Togavírus e flavivírus: microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 623-634.
- NUNES, M. R. et al. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, n. 11, p. 1610-1613, 2005.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Virosis transmitidas por artrópodos y roedores*. **Informes técnicos**, n. 719, p. 126, 1985.
- PINHEIRO, F. P. et al. Public health hazards among workers along the Trans-Amazon Highway. **Journal of Occupational Medicine**, n. 19, p. 490-497, 1977.
- PINHEIRO, F. P. et al. Belterra, Brazil: Series An Outbreak of Mayaro Virus Disease. An Outbreak of Mayaro Virus Disease in Belterra, Brazil: I. **Clinical and Virological Findings**, v. 30, p. 674-681, 1981.
- PINHEIRO, F.; LEDUC, J. Oropouche vírus I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings. **Am J Trop Med Hyg**, n. 30, p. 149-160, 1981.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. Arboviroses. In: NEVES, J. (Ed.). **Diagnóstico e tratamento das doenças infectuosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1983. p. 291-302.

- PINHEIRO, F. P. et al. **Arboviroses**: aspectos clínico-epidemiológicos. Instituto Evandro Chagas; 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: Ed. Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. v. 1, p. 375-408.
- PINHEIRO, F.; LEDUC, J. Mayaro virus disease. In: MONATH, T. P. (Ed.). **The arboviruses**: epidemiology and ecology. Florida: CRC Press Inc, 1988. p. 137-150.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Oropouche fever. In: FEIGIN, R. D. (Ed.). **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 2418-2423.
- POWERS, A. et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **Am J Trop Med Hyg**, n. 75, p. 461-469, 2006.
- RÁCZ, M. L. Nomenclatura e classificação dos vírus. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 527-531.
- SAEED, M. F. et al. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of *Oropouche virus*. **J Gen Virol**, n. 81, p. 743-748, 2000.
- SCHMALJOHN, C. S. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fundamental virology**. Philadelphia: Lipincott-Raven, 1996. p. 649-673.
- SCHMALJOHN, C. S.; HJELLE, B. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Diseases**, n. 3, p. 95-104, 1997.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Dengue. Boletim da semana 04/2005. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/dengue/boletim/pdfs/be_dengue_04_2005.pdf> Acesso em: 15 abr. 2012.
- SILVA, F. G. et al. Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue. **Bepa**, São Paulo, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.
- STRAUSS, J.; STRAUSS, E. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. **Microbiol Rev**, n. 58, p. 491-562, 1994.
- TALARMIN A. et al. Mayaro virus fever in French Guiana: isolation, identification, and seroprevalence. **Am J Trop Med Hyg**, n. 59, p. 452-456, 1998.
- TAYLOR, S.; PATEL, P.; HEROLD, T.; Recurrent arthralgias in a patient with previous Mayaro fever infection. **Southern Med J.**, p. 484-485, 2005.
- TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; SHAPE, R. E.; PINHEIRO, F. P. et al. Arbovirus research in the Brazilian Amazon. In: UREN, M. F.; BLOK, J.; MANDERSON, L. H. (Ed.). **Arbovirus research in Australia**: Proceedings fifth symposium on. Brisbane: University of Queensland Medical School, 1989. p. 4-8.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico**. Belém: CEJUP Press, 1997. p. 207-225.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. Dengue. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.). **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque amazônico**. Belém: CEJUP Press, 1997. p. 227-241.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. et al. The first laboratory confirmed cases of dengue fever in Brazil: virus isolation and serological results. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 261-274.

TRICOU, V. et al. Comparison Of two dengue NS1 rapid tests for sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **BMC Infect Dis**, n. 10, p. 142, 2012.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Epidemiologia das Encefalites por Arbovírus na Amazônia Brasileira. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 465-476, nov./dez. 1991.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura (Journal of the Brazilian association for the Advancement of Science)**, n. 44, p. 117-124, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; PINHEIRO, F. P. Arboviruses pathogenic for Man in Brazil. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. (Ed.). **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Instituto Evandro Chagas, 1998. p. 72-99.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon Region results in the emergence and reemergence of arboviroses. **Caderno de Saúde Pública**, v. 17, p. 155-164, 2001. Suplemento.

VASCONCELOS, P. F. C. Febre Amarela. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 275-293, 2003.

YOUNG, P. R. et al. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **J Clin Microbiol**, n. 38, p. 1053-1057, 2000.