

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDICIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

**MAPEAMENTO DE ARBOVÍROSES NO ESTADO DE
RONDÔNIA**

WEBER CHELI BATISTA

MANAUS
2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
CENTRO DE APOIO MULTIDISCIPLINAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

WEBER CHELI BATISTA

MAPEAMENTO DE ARBOVÍROSES DO ESTADO DE
RONDÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração: Diagnóstico de patógenos de doenças de impacto social na Amazônia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

MANAUS
2007

Ficha Catalográfica
Catalogação na fonte pela Biblioteca Central da
Universidade Federal do Amazonas

BATISTA, Weber Cheli.
Mapeamento das Arboviroses do Estado de
Rondônia. – Manaus: UFAM, 2007.

Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade
Federal do Amazonas.

110 p. ilustr.

1. Arboviroses, 2. Rondônia, 3. Biologia Molecular.

In Memoriam

Dedico esta tese a LUIZA CARDOSO BATISTA, avó e
madrinha, que sem querer colaborou para minha vida acadêmica.

Obrigado.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese de doutorado a:
Deus, por me permitir avançar mais uma fase em minha vida.

Minha mulher, Milena Jano Cheli Batista, por seu amor incondicional, dedicação, persistência, perseverança, companheirismo, cumplicidade, coragem e tenacidade.

Antônio José Batista e Rina Cheli Batista, meus pais, que apesar da distância, sempre me incentivaram a continuar essa jornada acadêmica.

Eduardo Rezende Honda, meu amigo e irmão que sempre esteve presente quando mais precisei dele.

Ao Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva que acreditou em mim e abriu as portas do mundo acadêmico e orientação dessa tese.

Ao meu eterno orientador Prof. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo pela colaboração na elaboração dessa tese.

AGRADECIMENTOS

Deusilene Souza Vieira e Glauciane Bifano, primeiras virologistas da Unidade de Virologia do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical e Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais..

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho pela colaboração nesta tese.

Ao Dr. Victor Hugo Aquino pela colaboração com o seqüenciamento do vírus dengue sorotipo 3.

Ao Mestre Mauro Shugiro Tada, pela colaboração no atendimento de pacientes com suspeitas de dengue.

Ao Mestre Roberto Penna de Almeida Cunha, pelo atendimento aos pacientes com suspeitas de dengue e por ter tornado as viagens por Rondônia inesquecíveis.

Ao Mestre Luiz Hermam Soares Gil e todo o Laboratório de Entomologia, pela captura dos mosquitos *Aedes aegypti* em nossas viagens pelo Estado de Rondônia.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade de compor seu quadro discente.

Ao *Special Programme for Training and Reseach in Tropical Disease* pelo financiamento inicial da Unidade de Virologia.

Ao DESCIT/UNESCO pela colaboração na elaboração dessa tese de doutorado.

A Secretaria de Saúde do Estado de Rondônia pela colaboração na captura de amostras.

Ao CNPQ pelo fornecimento de bolsas.

A todos os funcionários do CEPEM

A todos os funcionários do IPEPATRO.

EPIGRAFE

Peçam e vocês receberão; procurem e vocês acharão; batam, e a porta será aberta para você. Porque todos aqueles que pedem, recebem; que procuram, acham; e a porta será aberta para quem bate. Por acaso algum de vocês, que é pai, será capaz de dar uma pedra ao seu filho quando ele pede pão? Ou lhe dará uma cobra, quando ele pede um peixe? Vocês, mesmo sendo maus, sabem dar coisas boas aos seus filhos. Quanto mais o Pai de vocês, que está no céu, dará coisas boas aos que lhe pedirem.

Mateus 7: 7-11

...Nós, os bandeirantes de Rondônia...
...Somos destemidos pioneiros...

Hino de Rondônia.

RESUMO

As arboviroses representam graves problemas de saúde pública no Brasil, particularmente na Região Amazônica. Quatro arboviroses têm-se mostrado especialmente relevantes, a saber: dengue, febre amarela, Oropouche e Mayaro, pois causam doenças humanas graves, com mortalidade relativamente elevada e são responsáveis por surtos epidêmicos. O mapeamento e caracterização dos principais arbovírus registrados no Estado de Rondônia são necessários para identificar quais estão circulando, definir o período de transmissão e seu diagnóstico através de isolamento viral e caracterização molecular pela técnica de RT-PCR,

Isso foi realizado neste estudo com a seleção de *primers* para a identificação desses vírus tanto isolados a partir do soro do paciente quanto a partir de culturas celulares semeadas com soro dos pacientes.

No presente trabalho, é apresentado resultado de isolamento e caracterização de arbovírus a partir de duzentas e sessenta e seis amostras de sangue coletadas de pacientes com suspeitas de arbovirose nas cidades de Ariquemes, Cacoal, Colorado D'Oeste, Jarú, Ouro Preto D'Oeste, Porto Velho, Theobroma e Vilhena. As amostras foram inoculadas em culturas de células C6/36 e após sete dias os fluídos celulares foram recolhidos e submetidos à extração de RNA pelo método do TRIzol®. O RNA extraído foi utilizado para RT-PCR com os *primers* selecionados na literatura especializada. Os primers universais para *Flavivirus*, *Alphavirus*, para os quatro sorotipos de dengue, para o sorogrupo Simbu e específico para febre amarela foram testados nessas amostras. Os amplicons foram submetidos à corrida eletroforética em géis de agarose 1,7% e visualizados em

transiluminador ultravioleta. Para o seqüenciamento gênico utilizou-se a técnica de interrupção da cadeia por dideoxynucleotídios. Foram utilizados os seqüenciadores ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosynthesis, USA), para seqüenciar o vírus dengue sorotipo 1, o Personal Seq 4X4 (Amersham Pharmacia Biotech, USA), para seqüenciar o genoma do vírus da dengue sorotipo 3 e o Mega BACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, USA), para seqüenciar o vírus Cacipacoré. Cento e quatorze amostras foram identificadas após a realização da RT-PCR.

Os resultados de isolamento e caracterização das amostras virais foi o seguinte: 70 pacientes com dengue sorotipo 1, um paciente com dengue sorotipo 2; 42 pacientes com dengue sorotipo 3 e um paciente com o vírus Cacipacoré. A seqüência gênica dos vírus da dengue sorotipos 1 e 3 foram analisadas pelo programa Clustal W e apresentaram 98% de semelhança com aqueles isolados em regiões do sudeste do Brasil. Note-se que a amostra isolada de vírus Cacipacoré representa o primeiro isolamento do vírus de seres humanos e seu seqüenciamento apresentou 91% de similaridade com o de amostras isoladas precedentemente de aves migratórias selvagens

Concluiu-se nestes estudos que a vigilância epidemiológica, associando métodos moleculares e sorológicos de caracterização viral são mais precisos do que aquela feita apenas por técnicas sorológicas. Soma-se a isso o grau de relativa facilidade para se obter o resultado, não sendo uma metodologia que implica em interpretação complexa como a Inibição da Hemaglutinação ou Fixação do Complemento, técnicas que necessitam de amostras pareadas e eventualmente podem fornecer reações cruzadas entre

diferentes viroses. Os *primers* escolhidos tanto para *Multiplex-RT-PCR*, quanto para *Nested-RT-PCR* usados neste trabalho, identificam as principais arboviroses circulantes no Estado de Rondônia, e podem ser usados em outros centros de pesquisas na região norte.

Os resultados destes estudos mostram que a agilidade do uso direto do soro de pacientes com suspeitas de arboviroses como fonte de material para a RT-PCR recomendam o uso dessa técnica, pois diminui o tempo na obtenção do resultado.

Palavras Chaves – RT-PCR, Arboviroses, Mapeamento, Rondônia.

ABSTRACT

The arboviruses represent serious problems of public health in Brazil, in particular in the Amazon area. Four arboviruses have shown to be particularly important, namely dengue, yellow, Oropouche and Mayaro, since they cause severe human disease with high mortalities and are involved in periodic outbreaks. The mapping of the main arboviruses in the Rondonia State is necessary, as well as the knowledge of their biological cycles, in order to define control measures with the understanding of their period and mechanisms of transmission. It is also necessary to improve diagnostic procedures by viral isolation and molecular characterization by RT-PCR, with the primers selected for identification of these viruses, directly from the serum or tissue fluids of patients, or indirectly from cell cultures inoculated with patient's materials.

In the present manuscript are presented results of arbovirus isolation and characterization procedures from two hundred and sixty six samples of blood collected from patients with suspected of arboviruses infections in the following Rondonia State's cities: Ariquemes, Cacoal, Colorado D'Oeste, Jarú, Ouro Preto D'Oeste, Porto Velho, Theobroma and Vilhena. The samples were inoculated in C6/36 monolayers and after seven days the cellular supernatants were collected for RNA extraction by Trizol® method. The RNA extracted was used for RT-PCR with primers selected from the specialized literature's data. The universal primer was selected for identify *Flavivirus*, *Alphavirus* genera and Simbu serogroup. Specific primers were also used to identify the four serotypes of dengue virus and yellow fever virus. The amplicons were submitted to electrophoresis in agarose gel 1,7% and

visualized in ultra violet light. For genetic sequencing was used the interruption of extension of chain of nucleotide by dideoxynucleotide technique. The ABI PRISM 310 Genetic Analyser (PE Biosynthesis) was used for sequencing the dengue virus serotype 1, the Personal Seq 4X4 (Amersham Pharmacia Biotech, USA), for sequencing the dengue virus serotype 3 and the Mega BACE1000 (Amersham Pharmacia Biotech, USA) for sequencing the Cacipacore virus. One hundred fourteen samples were identified by RT-PCR. The results of identification of positive collected samples from different periods of 2003 to 2005 was the following: 70 patients with dengue serotype 1, one patient with dengue serotype 2, 42 patients with dengue serotype 3 and one patient with Cacipacore virus. The genetic sequencing performed of dengue virus serotypes 1 and 3 samples analyzed by software Clustal W showed 98% of similarity with others dengue virus isolated and sequenced in southeastern areas of Brazil. The Cacipacore virus sample isolated from the Theobroma patient was the first sample isolated from human infections and presented 91% of similarity with others virus samples isolated in Brazil from migratory birds

We concluded from, our studies, that the epidemiologic surveillance, using molecular methods associated to serological ones is more accurate and precise than serological methods alone. It must be added the easiness of the procedure and the speed for getting the result in contrast with complicated methodologies like hemagglutination inhibition or complement fixation methodologies that need double samples and eventually give cross-reacting results with others arboviruses. The selected primers, for Multiplex-RT-PCR and for nested-RT-PCR used in this work, identify the main arboviruses

circulating not only in the Rondonia State that can be used in other centers of research in the region north region of Brazil. Our results also emphasize the agility of the method consisting in the direct use of patient's serum for the RT-PCR procedure which reduces the time for getting a diagnosis.

Key words – RT-PCR, Arboviruses, Mapping, Rondonia

ABREVIATURAS

- 3' NC – 3' não codificante
5' NC – 5' não codificante
C - Proteína do capsídio
cDNA - DNA complementar
CEP – Comissão de Ética em Pesquisa
CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
CPCV – Vírus Cacipacoré
DENV – Vírus da dengue
DENV-1 – Vírus da dengue sorotipo 1
DENV-2 – Vírus da dengue sorotipo 2
DENV-3 – Vírus da dengue sorotipo 3
DENV-4 – Vírus da dengue sorotipo 4
DEPC – Dietil piro-carbonato
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
E – Proteína do Envelope
ELISA – Ensaio imunoenzimático
FA – febre amarela (doença)
FC - Fixação do complemento
IF - Imunofluorescência
IFI - Imunofluorescência indireta
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
G1 – glicoproteína 1
G2 – glicoproteína 2
IGUV – Vírus Iguape
IH - Inibição de hemaglutinação
ILHV – Vírus Ilhéus
JEV - Vírus da encefalite japonesa
L – Segmento grande - *Large*
M - Proteína de membrana
M – Segmento médio – *Médium*
MAYV – Vírus Mayaro
MIAF – Fluído Ascítico Hiperimune de Camundongo

N – proteína do nucleocapsídeo
NSm – Proteína não estrutural M
NSs – Proteína não estrutural S
NS1 – Proteína não estrutural 1
NS2a – Proteína não estrutural 2a
NS2b – Proteína não estrutural 2b
NS3 – Proteína não estrutural 3
NS4a – Proteína não estrutural 4a
NS4b – Proteína não estrutural 4b
NS5 – Proteína não estrutural 5
OROV – Vírus Oropouche
PBS – Solução fosfato salina
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PM - Peso molecular
PrM - Proteína de Pré-membrana
RNA - Ácido Ribonucléico
RNAc – Ácido Ribonucléico complementar
ROCV – Vírus Rocio
RT-PCR - Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S – Segmento pequeno - *Small*
SLEV – Vírus da encefalite de Saint Louis.
TBEV– Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
TN - Teste de neutralização
UTI – Unidade de Tratamento Intensivo
UV – Ultravioleta
YFV - Vírus da febre amarela

Lista de Figuras

	Página
Figura – 1: Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus e suas principais proteínas estruturais	25
Figura – 2: Esquema do genoma dos <i>Flavivirus</i> .	26
Figura – 3: Desenho mostrando a morfologia do vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	28
Figura – 4: Esquema do genoma da família <i>Bunyaviridae</i> .	29
Figura – 5: Figura mostrando a morfologia do virion de Alphavirus	30
Figura – 6: Esquema do genoma dos <i>Alphavirus</i>	31
Figura – 7: Mapa do Brasil mostrando a localização do Estado de Rondônia.	38
Figura – 8: Mapa de Rondônia mostrando os locais de coleta de sangue para o isolamento viral.	47
Figura – 9: Gel de agarose mostrando a amplificação de dengue sorotipos 1 e 3 pelo <i>primers</i> de Lanciotti, et al., 1992	63
Figura – 10: Amplificação do genoma de DENV-1 através de nested-PCR com os <i>primers</i> de Lanciotti et al, 1992.	64
Figura – 11: Amplificação do genoma de DENV-3 através de nested-PCR com os <i>primers</i> de Lanciotti et al, 1992	65
Figura – 12: Amplificação do genoma de DENV2 com os primres selecionados por Figueiredo et al, 1997	66
Figura – 13: Amplificação do genoma de CACV pelo <i>primers</i> Flavi-1 e Flavi-2.	68
Figura – 14: Amplificação do genoma de DENV-1 E DENV-3 pelo <i>primers</i> Flavi-1 e Flavi-2.	69

Figura – 15:	Amplificação do genoma de DENV-1 E DENV-3 pelo primers FG1 e FG2.	70
Figura – 16:	Amplificação do genoma de DENV-1 E DENV-3 pelo primers FG1 e ndenv1(-) e ndenv3(-).	71
Figura – 17:	Seqüência nucleotídica final de DENV-1 isolado em Porto Velho	72
Figura – 18:	Alinhamento múltiplo realizado com programa Clustal W da cepa de DENV1 isolada em Porto Velho	73
Figura – 19:	Seqüência gênica deduzida dos DENV3 isolados no Estado de Rondônia.	74
Figura – 20:	Alinhamento total das amostras de DENV3 do Estado de Rondônia feito pelo programa Clustal W do sítio EMBL	75
Figura – 21:	Seqüência final CPCV	76
Figura – 22	Alinhamento do CPCV isolado em Porto Velho com a cepa Cacipacoré BeAn 4073 (Query) obitdo através do BLAST.	77

Lista de Tabelas

		Pagina
Tabela – 1:	Distribuição das amostras de sangue coletadas nos municípios de Rondônia.	46
Tabela – 2:	Variações das temperaturas e tempo dos ciclos térmicos da PCR e locais de anelamentos dos <i>primers</i>	53
Tabela – 3:	Variações das temperaturas e tempo dos ciclos térmicos da <i>nested-PCR</i>	53
Tabela – 4:	Seqüência dos <i>primers</i> usados para identificação de arbovírus.	54
Tabela – 5	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para obter a seqüência de DENV-1 isolado em Porto Velho.	56
Tabela – 6:	Resultados da sorotipagem do vírus da dengue no Estado de Rondônias durante os anos de 2001 a 2005.	567
Tabela – 7:	Número de acesso das seqüências nucleotídicas no GenBank e a referência bibliográfica utilizadas para o alinhamento múltiplo do DENV1.	73
Tabela – 8:	Número de acessos das seqüências nucleotídicas no GenBank e a referência bibliográfica utilizadas no alinhamento múltiplo do DENV3.	76

SUMÁRIO

	Página
1.0 INTRODUÇÃO	23
1.1 Características gerais dos arbovírus	24
1.2 Os <i>Flavivirus</i>	25
1.3 Os <i>Bunyavirus</i>	27
1.4 Os <i>Alphavirus</i>	29
1.5 O diagnóstico das infecções por arbovírus	32
1.6 PCR, RT-PCR, <i>nested</i> -PCR e seqüenciamento genômico	33
1.7 Seqüenciamento gênico de arbovírus	34
1.8 Epidemiologia de arbovírus	35
1.9 Resumo histórico dos arbovírus em Rondônia	36
1.10 O Estado de Rondônia	37
1.11 Resumo da história de Rondônia	38
2.0 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivos geral	44
2.2 Objetivos específicos	44
3.0. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Amostras Biológicas	46
3.2 Isolamento viral	48
3.2.1 Em monocamada de células C6/36	48
3.2.2 Em cérebro de camundongos recém-nascidos	48
3.3 Os MIAFs	49
3.4 Confirmação da infecção por IFI	49
3.5 Extração e purificação do RNA dos arbovírus	50

3.6 RT-PCR	51
3.6.1 Confeção cDNA	51
3.6.2 A PCR	52
3.6.3 Reação de <i>nested</i> -PCR	52
3.6.4 Os ciclos térmicos	52
3.7 Clonagem e seqüenciamento dos arbovírus	55
3.8 Análise das seqüências	58
4.0 RESULTADOS	59
4.1 Isolamento viral	60
4.1.1 Em células C6/36	60
4.1.2. Em cérebro de camundongos recém-nascidos	61
4.2 IFI	61
4.3 A RT-PCR	62
4.3.1 Primers	62
4.3.1.1 D1 e D2 (Lanciotti et al, 1992)	62
4.3.1.2 TS1 e TS3 (Lanciotti et al, 1992)	63
4.3.1.3 DEN2C e DEN2V (Figueiredo et al., 1997)	65
4.3.1.4 FLAV1 e FLAV2 (Figueiredo et al., 1998)	67
4.3.1.5 FG1 e FG2 (Bronzoni et al, 2005)	69
4.4. Hemi- <i>nested</i> -PCR	70
4.5 Seqüenciamento de nucleotídeos	71
4.5.1 Dengue sorotipo1	72
4.5.2 Dengue sorotipo 3	74
4.5.3 Cacipacoré	76
5.0 DISCUSSÃO	79

6.0 CONCLUSÕES	90
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III	

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

.1 Características gerais dos arbovírus

A palavra arbovírus é um termo usado para descrever os vírus que requerem artrópodes que se alimentam de sangue para completar seu ciclo vital. Formada pela primeira sílaba das duas palavras *arthropode-borne* e acrescidas da palavra vírus, os arbovírus constituem um grupo heterogêneo, do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas, possuindo, entretanto, certas características epidemiológicas em comum (GUBLER, 1988). Pela definição, os arbovírus requerem no mínimo dois hospedeiros, sendo um vertebrado e um artrópode. Geralmente, os vírus produzem alta viremia nos hospedeiros vertebrados para os artrópodes tornarem-se infectados no repasto sanguíneo (KARABATSOS, 1985; GUBLER, 1988).

São registrados 534 arbovírus no Catálogo Internacional de Arbovírus, 214 dos quais são causadores certos ou prováveis de arbovirose. Outros 287 vírus são considerados como possíveis causadores de arbovirose e 33 são listados como provável ou definitivamente não causadores de arbovirose. Desses 534 arbovírus, 134 são documentados como causadores de doença humana (GUBLER, 1998).

Assim, considera-se como arbovírus, os vírus que são transmitidos na natureza, entre hospedeiros vertebrados susceptíveis por meio de artrópodes hematófagos, ou entre esses através da via transovariana (WOODALL, 1987).

Taxonomicamente diversos, os arbovírus são formados por 8 famílias virais e 14 gêneros. A maioria dos arbovírus com importância em Saúde Pública pertence a três famílias: Flaviviridae; Togaviridae, e Bunyaviridae (GUBLER, 1998).

Os arbovírus como um grupo tem uma distribuição global, mas a maioria é encontrada em áreas tropicais onde as condições climáticas permitem ciclos de transmissão anuais. Os seres humanos geralmente são hospedeiros finais ou acidentais, os quais usualmente contribuem para o ciclo de transmissão pelo desenvolvimento da viremia e infecção de artrópodes. Em termos de Saúde Pública, as arbovirose mais importantes são aquelas que provocam epidemias causadas pela picada do mosquito, pois há

produção de viremia e conseqüente doença em seres humanos (VASCONCELOS, et al., 1992).

No Brasil, as arboviroses representam um grave problema de saúde pública, dentre elas provocadas pelos vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Bunyavirus* e *Alphavirus* são as mais importantes causadoras de surtos ou epidemias (PINHEIRO, 1982; FIGUEIREDO, 1994; VASCONCELOS et al., 1992)

1.2 Os *Flavivirus*

Os *Flavivirus* compartilham características comuns quanto à morfologia dos vírions, determinantes antigênicos e a organização genômica. Possuem o capsídeo de simetria icosaédrica circundado por uma membrana lipoprotéica derivada da célula hospedeira que é o envelope viral. Suas formas são esféricas com projeções na superfície e medem, aproximadamente, de 40 a 50 nm de diâmetro conforme mostrado na figura 1.

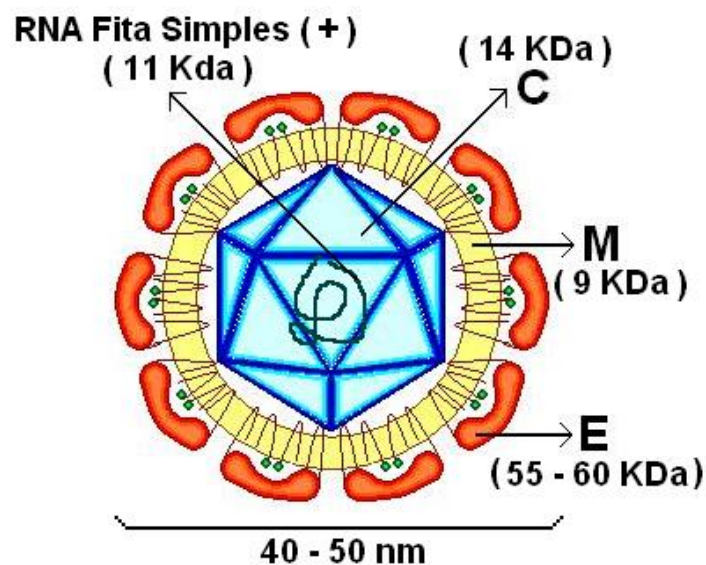


Figura – 1: Desenho mostrando a morfologia do virion de um Flavivirus e suas principais proteínas estruturais. Em C: proteína do nucleocapídeo; M, proteína de membrana e E, proteína do envelope.

Classicamente, os *Flavivirus* são classificados com base em seu relacionamento antigênico detectado por reações sorológicas. Com base em relacionamento antigênico cruzado estes vírus foram divididos em 8 subgrupos, utilizando testes específicos de neutralização. Estes são: o vírus

Tick Born Encephalitis (TBEV), Rio Bravo, o vírus da encefalite japonesa (JEV), Tyuleniy, Ntaya, Uganda S, dengue (DENV) e Modoc. Também, 18 *Flavivirus* não foram agrupados. Entre estes estão incluídos os brasileiros Ilhéus (ILHV), Rocio (ROCV), vírus da febre amarela (YFV), Cacipacoré (CPCV) e Iguape (IGUV). Nos últimos anos, esta classificação vem sendo corroborada e aprimorada por estudos filogenéticos baseados no genoma destes vírus (FRANK et al. 1991; WENGLER, 1991; PROUTSKI et al., 1997). Seu genoma é constituído de uma fita única de RNA, de polaridade positiva, que se comporta como RNA mensageiro, com PM de 4×10^6 , contendo, aproximadamente, 11.000 nucleotídeos (RICE et al., 1986; MONATH & HEINZ, 1996). O genoma é composto por 10 genes na seguinte ordem: 5'-C-PrM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3' que estão contidos em um segmento aberto de leitura, precedido de uma região 5'NC, com aproximadamente 100 nucleotídeos, sucedida por uma região terminal 3'NC, com aproximadamente 500 nucleotídeos e sem cauda de poliadenina poli(A). A poliproteína codificada pela cadeia aberta de leitura, após clivagem, libera 3 proteínas estruturais (E, M e C) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a e NS4b, e NS5) conforme mostrado na figura 2.

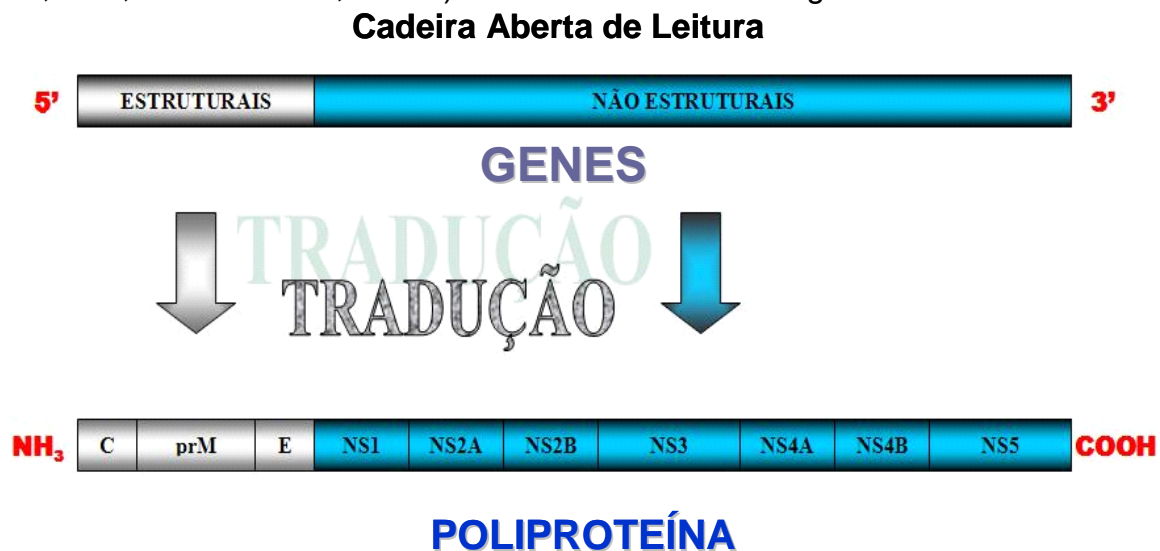


Figura – 2: Esquema do genoma dos *Flavivirus*. A partir de uma Cadeira Aberta de Leitura (ORF – *Open Reading Frame*) é traduzido em uma poliproteína que recebe a mesma denominação de seus genes. Em verde: 3 proteínas estruturais e em amarelo, as 7 proteínas não estruturais.

durante o processo de maturação viral. A proteína E, com 53kDa é a maior proteína codificada por esses vírus e junto com a proteína M forma o envelope viral. A proteína NS1 possui atividade na maturação viral, mas sua

função específica no processo de replicação não está definida. No entanto, estudos com mutantes sugerem a participação da NS1 na fase precoce da replicação viral bem como na virulência (PLETNEV et al., 1993). A proteína NS1 encontra-se na superfície celular sendo secretada no espaço extracelular (RICE, et al., 1986). A proteína NS2 é dividida nas porções NS2a, que possui papel obscuro na replicação viral e a proteína NS2b, com atividade proteolítica. A proteína NS3, a segunda maior proteína viral, é altamente conservada entre os *Flavivirus* e acredita-se que seja um componente enzimático utilizado na replicação do RNA. Comparações entre seqüências e análises bioquímicas sugerem que a proteína NS3 tenha um papel trifuncional, atuando como protease, helicase e RNA trifosfatase. A proteína NS4 é clivada, transformando-se em NS4a e NS4b, juntamente com as proteínas NS2a e NS2b associam-se à membrana da célula infectada durante o processo de maturação viral (MONATH & HEINZ, 1996). A proteína NS5 é a proteína mais conservada entre os *Flavivirus* e atua como uma RNA-replicase dependente de RNA, metiltransferase e juntamente com a proteína NS3 atuar na transcrição e na duplicação do RNA viral (CHAMBERS et al., 1990; MONATH & HEINZ, 1996; KHROMYKH et al., 1998).

A composição química dos *Flavivirus*, obtida com o SLEV é de 6% de RNA, 66% de proteínas, 17% de lipídios e 9% de carboidratos (BARBOSA, 1996).

1.3 Os *Bunyavirus*

A família *Bunyaviridae* inclui mais de 300 vírus distintos compreendidos em 4 gêneros: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus* (KARABATSOS, 1985; MERTZ, 1997; SCHMALJOHN, 1996). A grande maioria destes vírus é de arbovírus transmitidos por mosquitos, flebótomos ou carrapatos e mantidos na natureza como agentes causadores de zoonoses (DÉGALLIER et al., 1989; KARABATSOS, 1985). Fazem exceção os *Hantavirus*, que infectam roedores e têm mecanismos de transmissão relacionado à inalação de aerossóis das excretas desses animais (SCHMALJOHN & HJELLE, 1997; SCHMALJOHN & LE DUC, 1998; PETERS et al., 1999; FELDMANN, 2000; SCHMALJOHN & NICHOL, 2001). Também, pertencem à família *Bunyaviridae* o gênero *Tospovirus* que

incluem vírus que infectam vegetais (SCHMALJOHN, 1996). No Brasil foram isolados dezenas de vírus da família *Bunyaviridae*, sendo o mais importante deles, do ponto de vista epidemiológico, o OROV, por causar epidemias extensas na região amazônica (VASCONCELOS, et al, 1989).

Os *Bunyaviridae* são vírus de RNA de fita simples tri-segmentados, esféricos e envelopados, medido de 80 a 120 nm, que possuem projeções glicoprotéicas na superfície. Dois segmentos do RNA tem polaridade negativa (RNAc) e são denominados L, com 6875 nucleotídeos e M, com 4300 nucleotídeos. O 3º segmento, denominado S, com 750 nucleotídeos, pode atuar de forma *ambisense* no caso da replicação dos *Phlebovirus* e como de polaridade negativa no processo dos *Bunyavirus* e *Hantavirus* (OBIJESKI et al., 1976) como mostrado na figura 3.

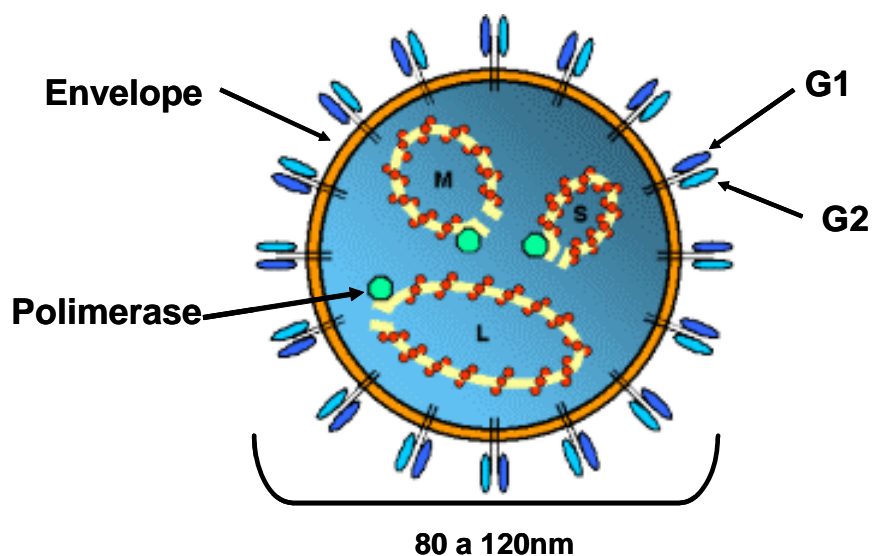


Figura – 3: Desenho mostrando a morfologia do vírus da família *Bunyaviridae*. Possuem três segmentos helicoidais no nucleocapsídeo (L, M e S). Possuem no envelope uma camada bilipídica. Têm dimensões que variam entre 80 a 120nm de diâmetro.

Também, no processo replicativo, o segmento S dos *Bunyavirus* codifica proteína NS com gene sobreposto à seqüência nucleotídica do gene de N. Para tanto, a cadeia aberta de leitura da nucleoproteína N encontra-se localizada na primeira metade do segmento S, próxima à extremidade 5' e a proteína NSs na segunda metade (OBIJESKI et al., 1976). As seqüências nucleotídicas terminais comuns ligam-se de forma estável, não-covalentes, com pareamento de bases, o que permite aos segmentos apresentarem-se

em forma circular (DUNN et al., 1995; LOPEZ et al., 1995). O vírion carrega, também, uma polimerase (cap-dependente), denominada L. As extremidades dos segmentos de RNA servem com sítios de reconhecimento para a polimerase viral (DUNN et al., 1995; LOPEZ et al., 1995). As proteínas estruturais dos vírus da família *Bunyaviridae* são a ribonucleoproteína N com 26,5 kD, que é codificada no segmento S do RNA viral; as proteínas G1 e G2, do envelope viral, codificadas no segmento M e a proteína L, codificada no segmento do mesmo nome. A proteína não-estrutural NSs dos *Bunyavirus*, com, 7,4 kD e codificada em S, tem função pouco conhecida. A proteína não estrutural NSm, de 11 kD, presente apenas nos *Bunyavirus* e *Phlebovirus*. É codificada no segmento M do RNA viral, em uma região situada entre G2 e G1 (MARSH & HELENIUS, 1980; HACKER & HARDY, 1997; RONKA et al., 1995) conforme mostrado na figura 4.

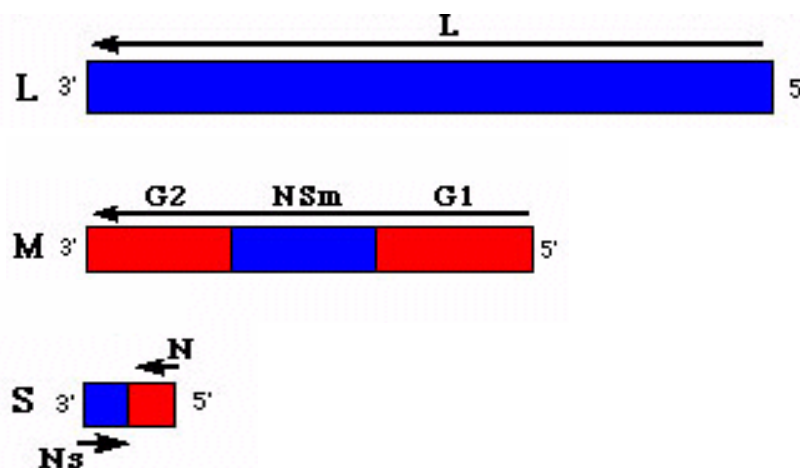


Figura – 4: O genoma da família *Bunyaviridae*. O segmento L codifica a proteína L, uma RNA polimerase dependente de RNA; o segmento M codifica duas glicoproteínas de superfície G1,G2 e NSm que formam as espículas do envelope lipídico e o segmento S, que codifica a proteína N e Ns, do nucleocapsídeo. (OBIJESKI & MURPHY, 1977).

1.4 Os *Alphavirus*

A família *Togaviridae* compreende dois gêneros, os *rubellavirus*, que causa a rubéola e os *alphavirus*. Os vírus do gênero *Alphavirus* compreendem 25 vírus todos transmitidos por artrópodes. São esféricos, de 60 a 70 nm de diâmetro, com um nucleocapsídeo icosaédrico envolvido em um envelope lipoprotéico. O seu RNA é linear, de fita simples, com aproximadamente

4×10^6 daltons e poliadenilado. O genoma tem aproximadamente 11,7 Kb e comporta-se como RNA mensageiro (FRANK, et al., 1991) O envoltório lipoprotéico contém lipídeos de origem celular e proteínas especificadas pelo vírus; é constituído por dupla camada e na superfície vêem projeções de 6,5 a 10 nm de comprimento. Três antígenos distintos são encontrados nos vírions: E1 e E2 (Glicoproteínas) e C (Nucleoproteína). A nucleoproteína C é um antígeno de grupo, reagindo em fixação do complemento. O antígeno E2 do vírus Sindbis é tipo específico, fixa o complemento e estimula a produção de anticorpos neutralizantes, enquanto E1 é um antígeno de subgrupo (PFEFFER, PROETZEL & KINNEY, 1997). A estrutura do virion de um Alphavirus é mostrada na figura 5.

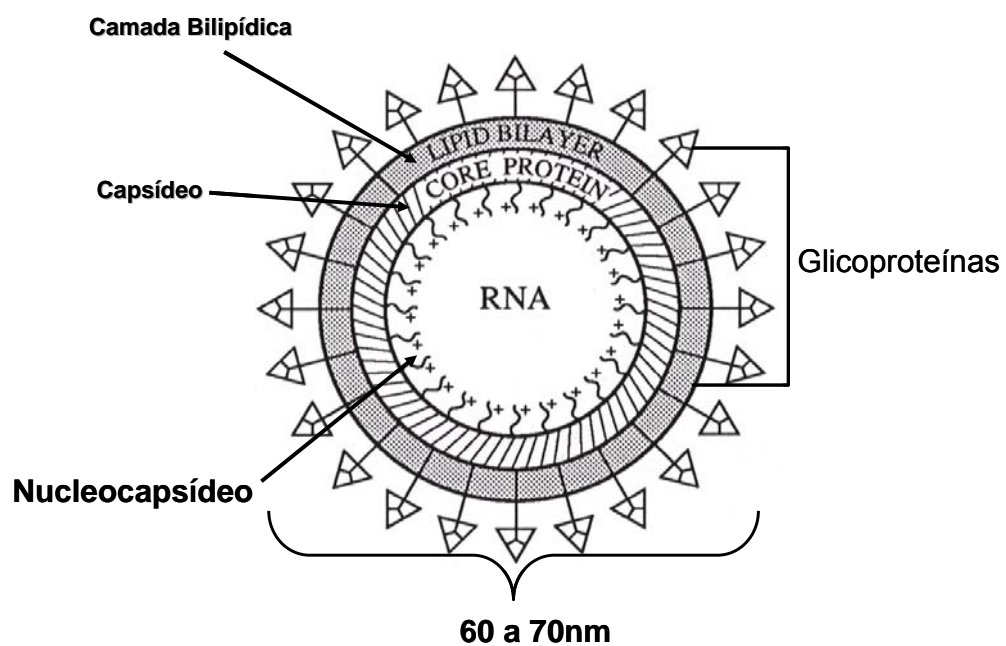


Figura – 5: A figura mostra o esquema de um Alphavirus, onde estão representadas as glicoproteínas E1 e E2, o Nucleocapsídeo representado pela proteína N e a camada bilipídica formando o envelope. Os virions medem aproximadamente de 60 a 70 nm.

O vírus Semliki Florest apresenta uma terceira glicoproteína, de pequeno tamanho, denominada E3. (STRAUSS, et al., 1991). O RNA dos *Alphavirus* apresenta 7 genes na seguinte ordem 5'-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-C-pE2 (E3 e E2)-6k-E1-3'. Essas proteínas estão contidas em um segmento aberto de leitura, precedida de um terminal 5'NC, com aproximadamente 59 nucleotídeos, que possui um "cap" tipo I (m7GpppAmp) (OU, et al., 1983). Na região terminal 3' NC, que sucede o segmento aberto de leitura, existem aproximadamente 322 nucleotídeos e uma cauda de poliadenina (poli A) (PFEFFER, et al., 1997). A poliproteína codificada pela cadeia aberta de leitura após clivagem, libera 3 proteínas estruturais (C, pE2 e E1) e 4 não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4).

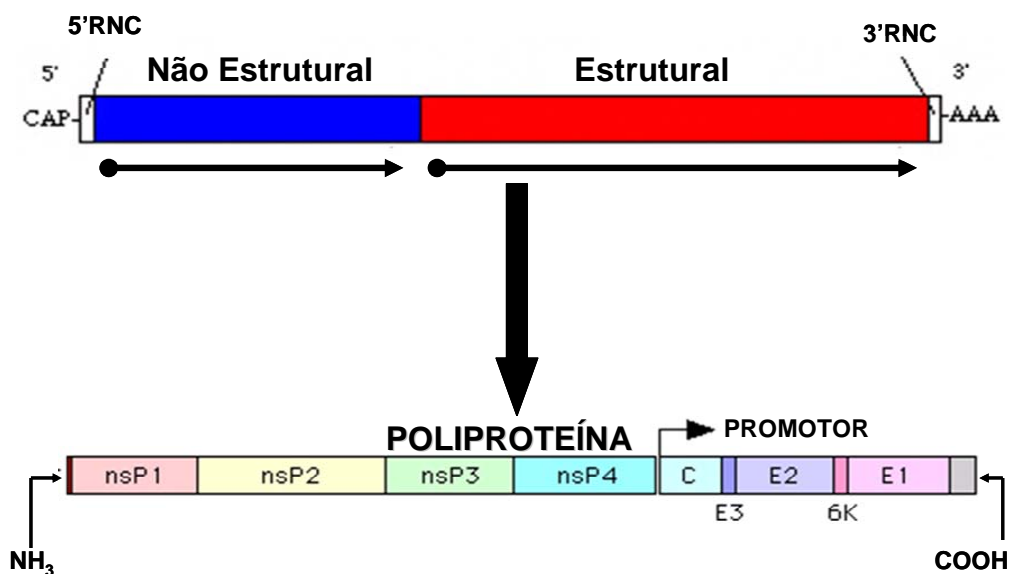


Figura – 6: Esquema do genoma dos *Alphavirus*. A partir de uma Cadeia Aberta de Leitura é traduzido em uma poliproteína que recebe a mesma denominação de seus genes. Na porção amino terminal as 4 proteínas não estruturais e na porção carboxi terminal, as 5 proteínas não estruturais.

A proteína C compõe a cápside viral e juntamente com o RNA forma o nucleocapsídeo. O envelope viral é formado pela união de 3 proteínas: E1, E2 e E3.

A proteína nsP1, com peso molecular variando de 59-62 kDa, possui um domínio de metil-transferase em sua região carboxi-terminal, sendo esta atividade relacionada à proteína. A proteína nsP2, com peso molecular de 88-95kDa, está envolvida na síntese do RNA fazendo a regulação da fita negativa; participa como protease no processo proteolíticos das outras nsPs; e provavelmente possui atividade de helicase, pois há seqüências de nucleotídeos do tipo *motifs* homólogos aos das helicases bacterianas. A proteína nsP3, de 52-63kDa, ainda não tem função determinada. Finalmente, a proteína nsP4, de 68-70kDa tem a função de RNA polimerase viral devido à presença de motifs tipo YDD.

1.5 O diagnóstico das infecções por arbovírus

O diagnóstico laboratorial das infecções por arbovírus, classicamente, depende do isolamento viral em culturas celulares de vertebrados ou de mosquitos, bem como em camundongos recém-nascidos ou em mosquitos inoculados. O isolamento viral é possível quando se utilizam os materiais clínicos obtidos de pacientes durante a viremia. Trata-se de técnica trabalhosa e que consome muito tempo, inclusive por que exige procedimentos posteriores visando à identificação do vírus isolado. Esta identificação costuma ser feita utilizando-se técnicas sorológicas abaixo referidas e MIAFs. Estes testes são: testes de IH, de FC, de TN e de IFI. Na década de 80, difundiram-se os ensaios de ELISA no diagnóstico do DENV, da FA, do OROV e MAYV e de outras arboviroses. Estes testes são específicos, especialmente quando neles se usam anticorpos monoclonais, detectando de forma discriminada a presença de anticorpos IgM e IgG (CALISHER, et al., 1989).

A técnica de RT-PCR, surge no final dos anos 80 como um método sensível, simples, rápido, específico (dependendo do *primer* e das condições de teste) e que se presta perfeitamente à identificação de vírus a partir de fluidos de isolamento ou de materiais biológicos de pacientes. Com esta técnica, facilita-se a classificação taxonômica destes vírus que apresentam reações cruzadas nos testes sorológicos (HENCHAL et al., 1991). A excepcional sensibilidade da metodologia do PCR permite a rápida detecção e identificação dos arbovírus tanto em artrópodes vetores, quanto em

amostras clínicas, nos quais há dificuldades de isolamento, ou quando há a necessidade de um diagnóstico rápido para tratamento clínico e implicações no controle de epidemias ou de vetores (FIGUEIREDO, 1990, HOWE, et al, 1992; MONROY, 1996; DEUBEL, et al., 1997).

1.6 PCR, RT-PCR, *nested*-PCR e seqüenciamento genômico

A PCR tem como base à própria replicação do DNA nos organismos celulares. A prática de manipulação do material genético e das DNA polimerases celulares como instrumentos de biologia molecular, foi ampliada após o surgimento dessa técnica. Basicamente, a PCR utiliza-se da Taq DNA polimerase, que é uma enzima de leitura unidirecional da cadeia de nucleotídeos e que possui a característica de ser termorresistente, atuando nos deoxinucleotídeos trifosfatos, ligando-os à outra fita de DNA que é complementar à fita molde. O par de *primer* liga-se aos dois lados da seqüência de DNA e guia a formação de cDNA.

O processo é feito em ciclos múltiplos e contínuos de variações da temperatura. Inicia-se com a desnaturação da dupla fita do DNA que contém a seqüência a ser amplificada. Geralmente, a desnaturação é realizada a uma temperatura de 94°C, temperatura em que as duas fitas do DNA se separam. O passo seguinte consiste em reduzir a temperatura a níveis ao redor de 53°C, permitindo que os *primers* anelem-se especificamente às extremidades das seqüências alvo. Finalmente, faz-se a extensão, fase em que à temperatura é elevada para aproximadamente 72°C, temperatura ideal de ação da Taq DNA polimerase, e produzem-se milhares de cópias da seqüência alvo.

A PCR sendo técnica de detecção sensível, específica e rápida para pequenas quantidades de material genético, representa um grande atrativo para a identificação de microorganismos e vem sendo utilizada no diagnóstico de vírus pertencentes a várias famílias (MORITA et al., 1994; SUDIRO et al., 1997).

Para a detecção do genoma de vírus RNA, utiliza-se a RT-PCR. Para tanto, utiliza-se a enzima transcriptase reversa. A RT-PCR é usada amplamente na identificação rápida e específica dos *Flavivirus* (MORITA et al., 1994).

A *nested*-PCR é um método que visa a aumentar a sensibilidade da amplificação genômica promovida pela PCR, ou RT-PCR. Consiste de uma segunda série de ciclos térmicos de PCR utilizando *primers* que se liga a sítios internos ao do primeiro par de *primers*, fazendo uma re-amplificação dos produtos (*amplicons*) da primeira PCR. A grande especificidade da *nested*-PCR, que faz com que a obtenção do segundo produto amplificado seja confirmatória de teste positivo, tem relação com a especificidade dos *primers* internos utilizados. A *Multiplex*-RT-PCR é uma variação da *nested*-PCR, precedida de uma RT-PCR usada para identificação gênero-específico de arbovírus. Esta estratégia associada à alta sensibilidade da *nested*-PCR fornece a detecção de arbovírus rápida e facilmente com baixo custo, qualidades proporcionadas pelos sistemas de *multiplex*. Essas vantagens são importantes para o diagnóstico clínico e programas de vigilância epidemiológica (BRONZONI, 2005).

1.7 Seqüenciamento gênico de arbovírus

O seqüenciamento de nucleotídeos de praticamente todos os organismos vivos vem sendo amplamente utilizado nas últimas duas décadas. O seqüenciamento de nucleotídeos permite decifrar as informações de um gene ou de parte dele. Existem dois métodos de seqüenciamento mais comumente utilizados, o químico ou de Maxam-Gilbert (MAXAN & GILBERT, 1977) e o dos dideoxynucleotídeos ou de Sanger (SANGER et al., 1977). Os seqüenciamentos efetuados neste trabalho utilizaram a técnica de SANGER et al. (1977) que utiliza nucleotídeos inibidores do alongamento da cadeia de ácido nucléico. Estes são dideoxynucleotídios que podem ser marcados com isótopos radioativos ou com fluoresceína. No último caso, a determinação da seqüência de bases nucleotídicas ocorre após eletroforese, com leitura automática da fluorescência por feixe de raio laser. O seqüenciamento de nucleotídeos feito diretamente de produtos da PCR constitui uma técnica simples, eficiente, reduzindo o tempo de trabalho e despesas com procedimentos de clonagem.

O genoma completo de vários arbovírus vem sendo seqüenciado a partir de 1985. Iniciando com RICE, et al., (1985), que seqüenciou totalmente o genoma do YFV vacinal, seguido por outros pesquisadores que obtiveram

as seqüências dos genomas dos quatro sorotipos de DENV (MASON et al., 1987; HAHN et al., 1988; OSATOMI & SUMIYOSHI, 1990). Quanto aos arbovírus brasileiros, apenas alguns foram parcialmente seqüenciados e a maioria permanece com seu genoma completamente desconhecido (DEUBEL et al., 1993; RICO-HESSE, 1990; KUNO et al., 1998, SÁNCHEZ-SECO, et al., 2005).

1.8 Epidemiologia de arbovírus

Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos envolvendo artrópodes hematófagos como vetores e vertebrados silvestres como reservatórios (WHO, 1985). Essas viroses são transmitidas biologicamente pelos vetores a vertebrados susceptíveis. O vertebrado desenvolve uma viremia com título e duração suficiente para infectar subseqüentes vetores que se alimentam do sangue do hospedeiro. Algumas arboviroses podem ser transmitidas pelas vias transovariana e venérea entre os artrópodes (WHO, 1985). As infecções em seres humanos são usualmente acidentes biológicos, e são tidos como hospedeiros finais para o vírus. Fazem exceção, desde que raramente podem participar da cadeia de transmissão, a FA urbana, o DENV e o OROV, que tem nos seres humanos um papel essencial na manutenção e disseminação das arboviroses na Região Amazônica (VASCONCELOS et al., 1992). Exceto o DENV, as arboviroses isoladas na Amazônia brasileira são mantidas por diferentes ciclos, alguns complexos e outros ainda não bem caracterizados, envolvendo muitos vetores e hospedeiros vertebrados.

Trinta e seis arbovírus dentre os tipos presentemente isolados no país têm sido relacionados como causadores de doença humana. Destes, cinco foram identificados como importantes em termos de saúde pública, pois estão associados com epidemias, são os vírus DENV, MAYV, OROV, ROCV e YFV. O DENV e OROV estão associados com doença humana epidêmica em áreas urbanas enquanto MAYV, ROCV e YFV especialmente em áreas rurais. Basicamente, o vírus OROV determina um quadro febril algumas vezes acompanhado por meningite asséptica. MAYV e DENV são responsáveis por quadros febris exantemáticos, sendo que DENV, nos últimos anos tem sido associado com quadros de febre hemorrágica, o que

sabidamente é o mecanismo pelo qual o vírus da febre amarela determina sua apresentação clínica clássica e o ROCV está associado com graves quadros de encefalite. Trinta e um arbovírus têm sido associados com a infecção febril benigna em poucos e esporádicos casos. Afora DENV e os *Arenavirus* Flexal e Sabiá (não são arbovírus), todos são envolvidos com doença humana na Amazônia brasileira. São mantidos em natureza através de um ciclo silvestre desenvolvido na floresta, onde diversas espécies de insetos hematófagos e vertebrados silvestres atuam como vetores e hospedeiros, respectivamente. As epidemias por arbovírus provocam impactos sociais e econômicos importantes. Assim, durante essas epidemias muitos trabalhadores e estudantes ficam doentes e há conseqüentemente, uma diminuição da produtividade e o aumento da ausência escolar. Desta forma é que, até o momento, as epidemias por arbovírus causam grandes impactos negativos nas cidades afetadas, mais do que os causados pela morbidade e mortalidade atribuídas a esses vírus. (VASCONCELOS, et. Al., 1998)

As epidemias estão relacionadas com as variações climáticas e sazonais. Também a isso se pode associar a falta de planejamento urbano das cidades na região amazônica. Isso é demonstrado pela ocorrência de epidemias de OROV na primeira metade do ano, ocorrendo entre os meses de março a julho (LINLEY, HOCH, & PINHEIRO, 1983). Esta ocorrência está intrinsecamente associada com as mudanças climáticas e o aumento das chuvas que são mais freqüentes na primeira metade do ano. Esse aumento contribui para a reprodução dos artrópodes hematófagos vetores de arbovírus. Um exemplo prático dessas epidemias são as causadas por DENV e MAYV, que são registradas mais freqüentemente na primeira metade do ano. As epidemias de FA silvestre acontecem aproximadamente de sete em sete anos, causando grande mortandade de macacos, pois esse tempo corresponde a uma geração de macacos (PINHEIRO et al., 1981b; PINHEIRO & LÊ DUC, 1988; VASCONCELOS et al., 1997).

1.9 Resumo histórico dos arbovírus em Rondônia

O Brasil é um país de dimensões continentais, com 8.512.000 km², tem a maioria de seu território situado em área tropical, que associado a

grande diversidade de flora e fauna, apropriada à ocorrência de zoonoses transmitidas por artrópodes. O país pode ser dividido em 5 regiões de acordo com sua vegetação. Uma área de floresta tropical remanescente nas costas leste, sudeste e sul, denominada Mata Atlântica; no centro oeste uma extensa região alagada denominada pantanal mato-grossense e sul mato-grossense; no Planalto Central uma área conhecida por cerrado; no nordeste, a caatinga e uma extensa área de floresta tropical denominada Floresta Amazônica.

A área da Floresta Amazônica ocupa 59% do território nacional, aproximadamente 5 milhões de km², abrangendo 8 Estados brasileiros, sendo 7 da região norte e 1 da região nordeste.

Estudos sobre arbovírus na região, pelo Instituto Evandro Chagas, em 44 anos (1954-1998) identificaram um grande número de vírus. Pelo menos 187 diferentes arboviroses foram isoladas. Esse grande número de isolamentos é devido ao fato desta região conter uma grande diversidade de artrópodes aéreos e vertebrados terrestres e arbóreos e uma infinita variedade de condições ecológicas. Trinta e dois desses agentes são conhecidos causadores de patologias humanas, causando estado febril agudo, febre exantemática, doença hemorrágica e encefalite. Quatro viroses são relevantes para saúde públicas porque causam grave doença humana ou morte e estão envolvidos em epidemias. Essas quatro arboviroses são: DENV, YFV, MAYV e OROV (VASCONCELOS et al., 1992). O vírus do dengue é associado com uma doença febril exantemática e são potenciais causadores de febre hemorrágica. O MAYV é também associado com doença febril exantemática. O YFV é um arbovírus causador de doença hemorrágica encontrado na Região Amazônica, enquanto o OROV causa doença febril e algumas vezes acompanhada de meningite asséptica. O OROV e o DENV são ativos em áreas urbanas, enquanto o MAYV e o YFV ocorrem principalmente em áreas rurais (VASCONCELOS et al, 1992).

1.10 O Estado de Rondônia

O Estado de Rondônia, localizado totalmente na Amazônia Legal e na região norte do Brasil, possui 238.512,80 km². Faz fronteira com Bolívia em uma extensão de 1.342 km de linha divisória em sua totalidade delimitada por

rios. Os limites territoriais são: ao norte, nordeste e noroeste com o Estado do Amazonas; ao leste e sudeste com o Mato Grosso; ao sul e sudoeste com a República da Bolívia. Possui 32 municípios localizados na Amazônia Legal e 20 municípios situados em faixa de fronteira. Tem uma população estimada em 1.130.847 habitantes (IBGE, 2000). Está em uma região triplamente favorável a propagação de arbovírus. Primeiro, por sua posição geográfica, ligando por rodovia o Estado do Acre e a Bolívia aos outros Estados do país, assim, havendo intensa circulação de caminhões das mais diversas regiões do país. Segundo, o Estado de Rondônia faz fronteira com a Bolívia possibilitando a entrada de novos arbovírus. Terceiro, o Estado ainda está em plena expansão de suas fronteiras agrícolas, favorecendo o aparecimento de arboviroses silvestres. Ainda, vale salientar a relativa facilidade do acesso por via aérea a qualquer outra região do país ou do mundo. A figura 7 mostra a localização do Estado de Rondônia em relação ao Brasil e em destaques à rodovia BR 364 e a fronteira com a Bolívia.

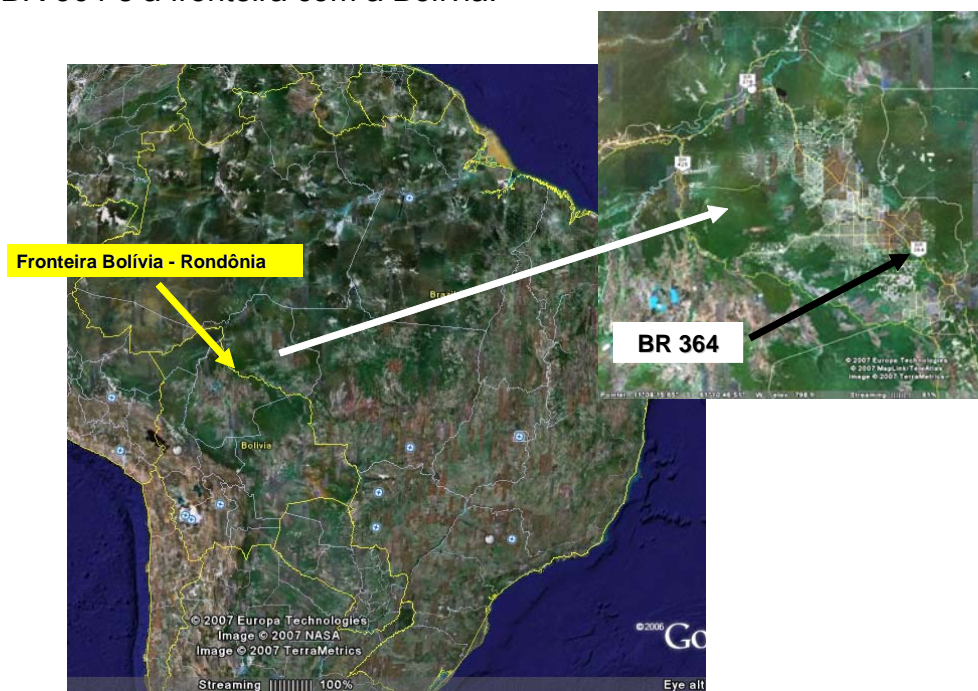


Figura – 7 – Mapa mostrando a localização do Estado de Rondônia em relação à região norte do Brasil. Em destaque a fronteira Bolívia-Rondônia e BR 364. Fonte: Google Earth.

1.11 Resumo da história de Rondônia.

As primeiras informações sobre a passagem de bandeirantes na região rondoniana dão conta que, em 1524, o português Aleixo Garcia teria

percorrido o ocidente do Brasil, com outros companheiros, em busca de um reino de infinitas riquezas onde teria a lendária “serra de prata”. Entretanto o mais notável dos bandeirantes que teriam embicado pelas bandas do atual Estado de Rondônia teria sido Raposo Tavares. Este Bandeirante, no final do século XVII, atingiria o rio Mamoré e em seguida o rio Madeira pelo qual chegaria ao Amazonas, e por ele seguindo até o Grão-Pará. A viagem do Capitão-mor em busca de descobrimentos de rios, de metais preciosos, e também com intuítos bélicos e de preservação da Coroa Portuguesa, terminou por ser benéfica em argumentos futuros sobre os traços fronteiriços da região do Guaporé-Mamoré-Madeira. Somente algumas missões religiosas se haviam aventurado pela região até o século XVII. Com a descoberta do ouro no vale do rio Cuiabá, no século XVIII, os bandeirantes começaram a explorar o vale do rio Guaporé. Em 1723, João San Payo fundou do lado direito da Cachoeira de Aroaya o arraial de Santo Antônio das Cachoeiras e ao centro uma igreja. No século XVIII, exploradores voltaram a se fixar nesta região e no século XIX a vila serviu de ponto de apoio para construção da Estrada de Ferro Madeira-Mamoré, assim foi o início da cidade de Porto Velho.

Um fator importante para a colonização foi o auge do ciclo da borracha, no final do século XIX, quando muitos nordestinos migraram para a área. O início da construção da Ferrovia Madeira-Mamoré, em 1907, constituiu outro impulso para o povoamento. Entre os anos de 1877 e 1900, houve um fenômeno de migração no Estado, 158 mil pessoas migraram atraídas pela exploração da borracha. Outras 22 mil pessoas chegaram à região entre os anos de 1907 e 1912, para a construção da “Estrada de Ferro Madeira-Mamoré” (EFMM). Ressalta-se que a ferrovia foi construída para atender as necessidades de transporte de mercadorias oriundas da expansão da exploração da borracha. Segundo Oswaldo Cruz, que esteve ali na qualidade de sanitarista, em 1910, a vila de então não tinha esgoto, água canalizada, iluminação pública de qualquer natureza. Naturalmente que à distância da sede da província, Cuiabá (MT), era motivo para as dificuldades daquela povoação, embora seja verdade que, após a mudança da sede da companhia construtora da EFMM, Mato Grosso procurou reanimar o progresso local. Entretanto, com o fim do primeiro ciclo da borracha, por volta

de 1920, milhares dessas pessoas emigram para outras partes do país e para o exterior, e a população atual do Estado, que era de aproximadamente 180 mil habitantes em 1900, caiu para menos de 21 mil no ano de 1940. No período da Segunda Guerra Mundial, em função da recuperação da exploração da borracha brasileira, devido da tomada das plantações da Malásia pelo Japão, a região atraiu migrante novamente. Neste período, a população atingiu aproximadamente 37 mil habitantes. É importante salientar que em 1942, foi assinado o acordo de Washington, incluindo dentre outros aspectos a compra de toda a produção de borracha brasileira.

Em 1943, foi criado o Território Federal de Guaporé, em terras desmembradas do Amazonas e de Mato Grosso. O território recebeu o nome de Rondônia em 1956, em homenagem a Cândido Rondon, o desbravador da região.

No início da década de 70, um grande número de mineradores de diversas regiões do Brasil formaram garimpos em Rondônia. A atividade ilegal de mineração foi responsável pela intensa modificação do meio ambiente resultaram na introdução e transmissão de diversas doenças que nunca haviam sido diagnosticadas. Em 1991, estabeleceu-se nos garimpos epidemia de febre amarela com casos fatais (DÉGALLEIR et al., 1992b, IEC, 1996, 1999). Na segunda metade dos anos 90 o garimpo entrou em declínio, estando praticamente interrompido. Este ciclo gerou muita riqueza, sendo, porém quase nulos os benefícios duradouros produzidos, pois a riqueza foi drenada para outras áreas do país ou para o exterior. Foi uma exploração predatória e de alto impacto ambiental. Pode-se dizer que, da exploração do ouro, a maior herança é o seu passivo ambiental: erosão do leito e das margens do rio, contaminação das águas e da cadeia alimentar pelo mercúrio, poluição por óleo, combustíveis e rejeitos lançados na água e por equipamentos abandonados, sedimentação do canal navegável, etc.

Mudanças no meio ambiente são responsáveis pela emergência dos arbovírus (DÉGALLIER et al., 1992a, VASCONCELOS, 1999a). O vírus Oropouche é o melhor exemplo documentado desta categoria. Moradias construídas em áreas desmatadas são tidas como principal fator na emergência de epidemias do OROV na Amazônia Brasileira (PINHEIRO et al., 1981a, 1998; LE DUC & PINHEIRO, 1988). Práticas impróprias de

mineração e uso inadequado da terra podem facilitar o contato entre os seres humanos, vetores e arbovírus. Como exemplo, se pode citar, os mineradores de ouro que invadem a floresta e traz perigo ao meio ambiente, como a poluição do solo e rios por mercúrio, além de promover locais favoráveis à multiplicação de mosquitos.

A descoberta de cassiterita estimulou a economia local e, em 1981, Rondônia tornou-se Estado. Já naquela época, milhares de famílias que viviam na região aguardavam a distribuição de terras pelo INCRA situação que ainda não encontrou uma solução definitiva. As práticas de mineração e de desflorestamento para agricultura por várias décadas resultaram em epidemias de febre amarela silvestres na América Latina. Em Rondônia, extensas áreas de florestas foram desmatadas para essas práticas ao qual atraiu grandes contingentes humanos não-imunizados de áreas urbanas para trabalhar (VASCONCELOS, et al., 2001). Esse tipo de desflorestamento tornou-se o principal fator na reemergência e aumento dos casos de febre amarela notificados no Brasil em anos recentes (VASCONCELOS et al., 1997). A disseminação dos vírus Mayaro e Oropouche pode ser resultado dessa prática (PINHEIRO et al., 1981a, 1981b, 1994 e 1998).

Como consequência, e de forma desordenada, formaram-se rapidamente inúmeros aglomerados urbanos, e ocuparam-se efetivamente as terras próximas às margens da BR 364. Este processo quebrou a estrutura espacial então existente, condicionada aos ciclos extrativistas, e de economia concentrada nas cidades de Porto Velho e Guajará Mirim. O eixo de importância econômica do Estado deslocou-se para os municípios que iam sendo criados ao longo da rodovia que é a espinha dorsal da vida econômica do Estado. A ocupação e colonização do espaço físico exigiram maciças derrubadas e queimadas na floresta. O contingente populacional sofreu incrementos explosivos, a infra-estrutura urbana era muito deficiente. A formação de novos povoados às margens das rodovias foram os principais fluxos demográficos e provocaram mudanças no meio-ambiente, estão associados com a transmissão de vírus. Uma das explicações para essas epidemias ocorreria com o aumento da população, resultando de pessoas susceptíveis vivendo e trabalhando às margens das florestas e se expondo a um grande número de vetores (PINHEIRO et al., 1977). A construção de

rodovias durante a década de 70, principalmente a BR 364 e 316, atravessando vastas áreas de floresta inexplorada possibilitou estudos de ocorrência de arbovírus e sua influencia na saúde pública. A construção da barragem de Samuel em Candeias do Jamari, nos anos 90 inundando grandes áreas de floresta promoveu a catalogação de novos vírus. Dúzias deles foram isolados e identificados, incluindo vírus não-classificados (DÉGALLIER, et al., 1989, 1992a; VASCONCELOS, 1999a; TRAVASSOS DA ROSA, et al., 1992b).

Rondônia tem, no interior da federação, um lugar peculiar. Ao receber milhares de migrantes nos anos do “milagre econômico brasileiro”, serviu como válvula de segurança mitigadora de tensões sociais em várias regiões do país. E, ao se transformar em “exemplo negativo” das mazelas do processo de ocupação da Amazônia, foi obrigada a se constituir em palco de experimentação de medidas migratórias diversas, que na prática significam a manutenção de grande parte de seu território sob um veto às atividades usuais da indústria de transformação.

Essa tese é justificável e inédita, pois dimensiona a atuação de arbovírus em relação à malária e outras patogêneses com sintomas similares, promove a atualização do conhecimento sobre os arbovírus circulantes para melhor planejamento de ações em saúde pública e introduz técnicas moleculares para detecção, diretamente do soro de pacientes ou de fluído de cultura celular, de arbovírus em Rondônia. Segundo dados obtidos no CEPEN, gentilmente cedidos pelo Dr. Mauro Shugiro Tada, em 2005 foram realizados 31.111 exames para malária, onde 11.505 (37%) foram positivos e 19.606 (63%) exames (65%) são negativos. Nos exames negativos para malária, ou seja, de processos febris agudos, pode estar implícito algum arbovírus não detectado. O problema mais grave, que atualmente compromete de modo definitivo o desenvolvimento do Estado, é a falta quase generalizada de infraestrutura de saneamento. A carência de sistemas de abastecimento de água canalizada, coleta de esgotos e de lixo atinge a maioria da população, em especial a que habita as áreas urbanas (SEPLAN, 1998).

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. Geral:

- Isolar e caracterizar arbovírus responsáveis por patologias em seres humanos no Estado de Rondônia.

2.2. Específicos:

- Inocular materiais clínicos de pacientes com quadro febril agudo de etiologia não-malárica em cultura celular para isolamento viral.
- Identificar a etiologia viral em processos febris agudos caracterizados através das metodologias seguintes: inoculação em cultura celular e RT-PCR
- Padronizar o teste de RT-PCR para identificação de arbovírus utilizando *primers* descritos na literatura e/ou propondo *primers* alternativos.
- Mapear a área de atuação dos arbovírus eventualmente encontrados incluindo a determinação do período anual de maior transmissibilidade

MATERIAL E MÉTODOS

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Amostras Biológicas

Foram coletadas 266 amostras de sangue entre os meses de janeiro de 2001 a dezembro de 2005, na cidade de Porto Velho, na Policlínica Municipal “Dr. Hamilton Gondin”, localizada na zona leste da cidade e no Ambulatório de Especialidades do CEPEM; durante epidemia ocorrida em janeiro/2004 em Ouro Preto do Oeste, no Hospital Municipal; na cidade de Colorado do Oeste, na Unidade Mista “Dra. Laura Maria de Carvalho Braga”, durante a epidemia de fevereiro /2004; nos Prontos Socorros Municipais de Ariquemes, Cacoal, Jarú e Vilhena durante a epidemia de Janeiro de 2005. Uma amostra foi coletada em 2002 de paciente no 7º dia de sintomas na UTI do Hospital de Base “Dr. Ary Pinheiro”. A tabela 1 mostra a quantidade de soro coletado em cada município.

Tabela 1: Distribuição das amostras de sangue coletadas nos municípios de Rondônia.

Municípios	Quantidade de amostras
Ariquemes	15
Cacoal	20
Colorado D'Oeste	22
Jarú	15
Ouro Preto D'Oeste	33
Porto Velho	145
Theobroma	01
Vilhena	15
Total	266

Inicialmente, foram selecionados os pacientes que apresentavam quadro de febre aguda e com resultado negativo no exame de gota espessa para malária, entre o primeiro e quinto dia de sintomas, sugestivo de infecção por arbovírus. Após a anamnese foi preenchido questionário (Anexo I) e explicado verbalmente para o paciente o destino da amostra, sendo as mesmas coletas com sua anuência e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela CEP do IPEPATRO (Anexo II). Todos os casos estudados foram notificados ao Ministério da Saúde. As localizações das cidades onde foram coletadas as amostras são mostradas na figura 7.

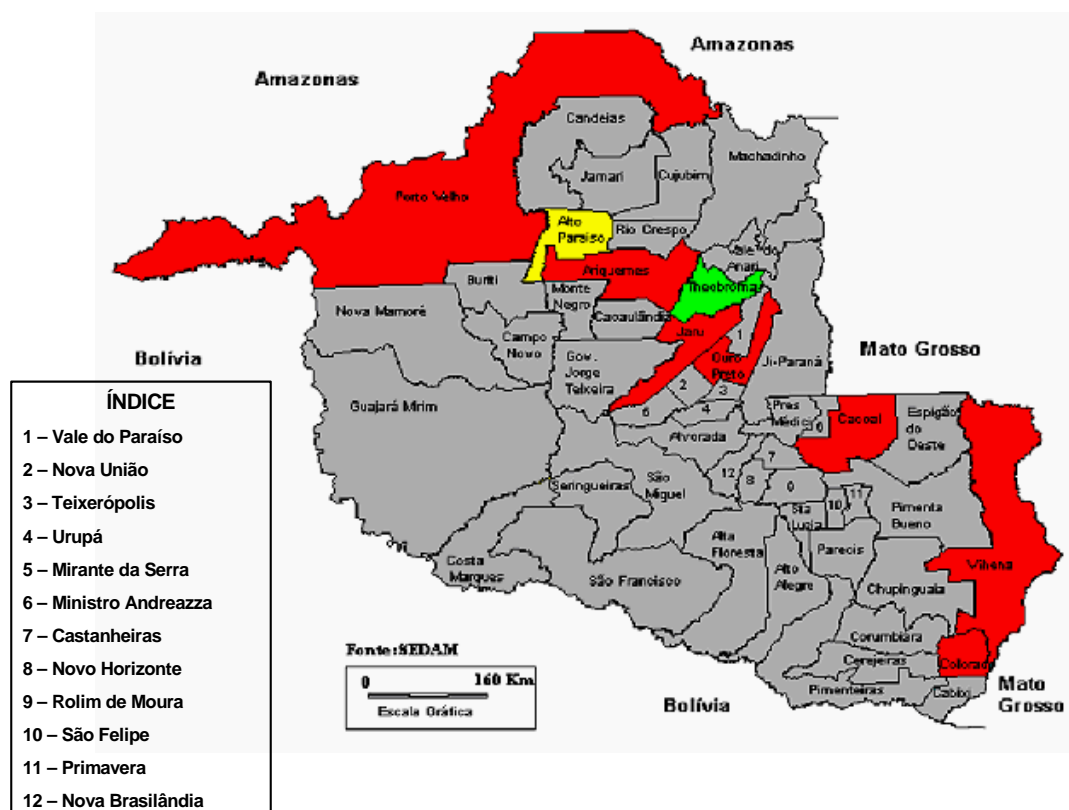


Figura – 8: Mapa de Rondônia. Em vermelho: locais de coleta de amostras com suspeita de dengue. Em verde: local de coleta de amostra suspeita de Febre Amarela. Em Amarelo: locais de coleta de amostras com suspeitas de Hantavírus. tipo vacutainer sem anticoagulantes. Incubou-se as amostras por 30 minutos

a 37°C, para retração de coágulo. Separou-se 2ml de soro para isolamento viral sem prévia centrifugação. Para o diagnóstico molecular utilizou-se uma série de pares de *primers* para identificação dos vírus da DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4; YFV; MAYV e OROV.

3.2 Isolamento viral.

3.2.1 Em monocamada de células C6/36

Para o isolamento viral foram utilizadas células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36. Cultivou-se em placas estéreis de cultura celular de 24 orifícios (Corning, USA) em meio de cultura Leibowitz – L15 (Gibco BRL, USA) suplementado com solução de 10% de triptose fosfato (Sigma, USA), 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL, USA) e 10.000U/ml de penicilina e 1.000µg/ml estreptomicina. As placas foram mantidas em estufa BOD a 28°C até a formação de monocamadas confluentes. Foram inoculados 200µl das amostras de soro diluídas 1:100 em meio L-15 incompleto. Incubou-se as placas em estufa a 28°C por 7 dias. A monocamada foi inspecionada diariamente a em microscópio invertido (Nikon, USA) para detecção de efeito citopático. Após o período realizou-se o teste de imunofluorescência indireta, como teste de triagem, para determinar quais orifícios foram infectados com vírus (TESH, 1979 e HENCHAL et al., 1983).

3.2.2 Em cérebro de camundongos recém-nascidos

Para o isolamento viral em cérebro de camundongo utilizou-se uma gaiola contendo 6 camundongos recém-nascidos, com aproximadamente 3 dias de vida e uma fêmea adulta. Injetou-se 10µl o soro ou o fluido de células

intracerebralmente com seringa de 1ml de vidro B-D Tuberculina (Becton&Dickinson, Brasil) com graduação de 0,01ml e agulhas 25X5cm. Para o controle do experimento utilizou-se outra gaiola com a mesma quantidade de animais inoculados com o YFV 17DD vacinal. Observou-se os camundongos diariamente, duas vezes ao dia, por uma semana verificando a presença de encefalite. Ao verificar o quadro de encefalite os camundongos foram recolhidos e armazenados em freezer -70°C.

3.3 Os MIAFs

Os MIAFs utilizados no teste de IF foram gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo da Unidade de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e pelo Dr. Vincent Deubel do Instituto Pasteur, França. Foram preparados em camundongos brancos (*Mus musculus* – variedade albino suíço) inoculados pela via intraperitoneal, por quatro semanas consecutivas, com fluido celular infectados com arbovírus. Após a última imunização, injetou-se, nos animais, via intraperitoneal, o sarcoma 180/TG, para o desenvolvimento de ascites volumosas ricas em anticorpos policlonais.

Para o teste de IFI foram usados anticorpos anti-DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, anti-YFV, anti-MAYV e anti-OROV.

3.4 Confirmação da infecção por IFI

Para a confirmação da infecção celular fez-se uma IFI. O procedimento consistiu na raspagem da monocamada celular, mistura ao fluido de cultivo e transferência das células para *spot* da lâmina para o teste (Glasstécnica,

Brasil). O material foi seco e fixado por 10 minutos em acetona gelada. Na primeira etapa do processo foi acrescentado MIAF na diluição 1/50 em PBS. Incubou-se a lâmina a 37°C, por 30 minutos. Na segunda etapa, acrescentou-se imunoglobulina caprina, anti-IgG de camundongo conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma, USA), na diluição de 1/100, em PBS, contendo azul de Evans a 1/5000. Incubou-se a 37°C, por 30 minutos. Após procedeu-se à lavagem da lâmina, 10 minutos, 2 vezes em PBS e 2 minutos, 1 vez em água destilada para remover o excesso de isotiocianato de fluoresceína. Na etapa final fez-se a leitura do teste em microscópio de fluorescência Eclipse E 400 (Nikon, Japão), equipado com lâmpada de mercúrio de alta pressão. O teste foi considerado positivo quando houve evidente fluorescência celular quando comparado com dois tipos de controles, um de células não infectadas e outro, a observação por duas pessoas com a confrontação de resultados (FIGUEIREDO, 1990). Após, as amostras foram submetidas à extração do RNA viral e subseqüentes RT-PCR.

3.5 Extração e purificação do RNA dos Arbovírus.

A extração do RNA do fluído de cultura de células C6/36 infectadas ou diretamente do soro do paciente fez-se pelo método do Trizol®, método baseado na utilização de solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Life Technologies, USA). O protocolo original descrito por Chomczynski et al (1987) foi adaptado da seguinte forma: 750µl da amostra de fluído de células C6/36 infectadas ou soro foram homogeneizados com 500µl do reagente, agitou-se a mistura vigorosamente em *vortex* e logo em

seguida a mesma foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 150µl de clorofórmio agitando manualmente por 15 segundos e incubou-se por 2 minutos à temperatura ambiente. Após, foi centrifugado em 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, separou-se a fase aquosa transparente superior em outro tubo de 1,5ml, precipitou-se o RNA com 380µl de isopropanol e incubou-se a amostra por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se a 12000g, por 10 minutos, a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente, lavou-se o precipitado com 750µl de etanol gelado a 75%. Centrifugou-se a 14.000rpm, por 5 min, a 4°C. O excesso de etanol foi retirado secando a amostra em um concentrador de amostras (Eppendorf, Alemanha). O RNA foi suspenso em 50µl de água DEPC e estocado a -70°C até o momento do uso.

3.6 RT-PCR

3.6.1 Confeção cDNA

Para a confecção da fita de cDNA através da transcrição reversa incubou-se 10µl do RNA extraído com 1µl (3µg) de *primer* randômico pd(N)₆ (GIBCO® BRL, USA), 1µl (10mM) de dNTPs, (GIBCO® BRL, USA). A amostra foi aquecida por 5min à 65°C. Acrescentou-se 4µl do tampão 5X First Strand (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µl DTT (0.1M), 1µl (10U/µL) inibidor de RNase e 1µl (200U) de SuperScript™ (GIBCO® BRL, USA) e completou-se o volume com água DEPC para 20µl. O produto final foi incubado a 42°C por 1 hora e 95°C por 10min a para inativar a transcriptase reversa.

3.6.2 A PCR

Para a PCR a mistura foi feita com 8µl do cDNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de cada *primers*, 1µl da mistura de dNTP (250mM de cada dNTP), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA) e água para completar a mistura para 50µl. Em seguida, a mistura foi submetida a 30 ciclos térmicos. A visualização da amplificação foi feita submetendo 10µl amplicons à eletroforese em gel de agarose 1,7%, corado com brometo de etídio e observado em transiluminador UV.

3.6.3 Reação de *nested*-PCR

Para reação de *nested*-PCR, misturou-se 1µl do amplicom da primeira reação, 5µl do tampão 10X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 2µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de dNTP mix (250mM de cada dNTP), 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA) e completou com água MilliQ para o volume final de 50µl.

3.6.4 Os ciclos térmicos

Mesmo havendo uma diversidade de *primers*, observou-se pouca variação nas temperaturas e nos tempos de denaturação, anelamento e extensão durante os ciclos térmicos tanto da RT-PCR, quanto da *nested*-PCR. As variações de temperaturas e tempos dos ciclos térmicos da PCR e da *nested*-PCR, assim como o locais de ligações dos primers da RT-PCR estão representadas nas tabelas 2 e 3. A seqüência dos *primers* utilizados neste trabalho estão descritas na tabela 4.

Tabela – 2: Variações das temperaturas e tempo dos ciclos térmicos da PCR e locais de anelamentos dos *primers*.

Primers	Temperatura/tempo	Incremento de temperatura/tempo	Local de anelamento
Flavi 1 e Flavi 2	94°C/1min, 53°C/1min 72°C/1min	72°C/5 min.	Final do gene NS5 e início da região 3'NC
FG1 e FG2	94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/2 min	72°C/5 min	Gene NS5
D1 e D2	94°C/1min, 53°C/1min 72°C/1min	72°C/5min	PrM/E
BUN-S e BUN-C	94°C/1min, 55°C/1min 72°C/1min	72°C/5min	Segmento S, extremidade 5' e 3'.
M2W e cM3W	94°C/1 min 53°C/1 min 72°C/2 min	72°C/5 min	Gene nsP1

Tabela – 3: Variações das temperaturas e tempo dos ciclos térmicos da *nested-PCR*

Primers	Temperatura/tempo	Incremento de temperatura/tempo	Local de Anelamento
nDEN1W, nDEN2W e nYFW	94°C/1min 55°C/1min 72°C/2min	72°C/5mim	Parte terminal de NS5 e inicial de 3'NC
nden1(-), nden2(-), nden3(-), nden4(-) e nyf(-)	94°C/1min, 53°C/1min 72°C/2 min	72°C/5mim	Gene NS5
TS1, TS2, TS3 e TS4	94°C/1mim 55°C/1min 72°C/2mim	72°C/10min	PrM/E
BS-S e BS-C	94°C/1min 55°C/1min 72°C/1min.	72°C	Segmento S/Nucleoproteína
naura(+) e nmay(+)	94°C/1min, 53°C/1min 72°C/2 min	72°C/5mim	Gene nsP1

Tabela – 4: Sequência dos *primers* usados para identificação de arbovírus.

Vírus/Gênero	Primers (5'-3')	Tamanho do amplicom	Referência
Flaviviruses	Flavi 1: GGTCTC CTC TAA CCT CTA G Flavi 2: GAGTGGATGACCACGGAAGACATG C	DENV-1 e DENV-2: 650 e 550pb YFV: 600pb	FIGUEIREDO, 1998
	FG1: TCAAGGAACTCCACACATGAGATGT ACT FG2: GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAG CATACA	958pb	BRONZONI et al, 2005
	nden1 (-): CGTTTTGCTCTTGTGTGCGC	472pb	
	nden2 (-): GAACCAGTTTGGTTDRTTTCATCGC TGCC	316pb	
	nden3 (-): TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTC GCACT	359pb	
	nden4 (-): GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	222 pb	
	nYFV (-): TCAGAAGACCAAGAGGTCATGT	253pb	
Dengue	D1: TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAAC CG D2: TTGCACCAACAGTCAAATGTCTTCA GGTTC	511 pb	LANCIOTTI et al., 1992
DENV-1	TS1: CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482 pb	
DENV-2	TS2: CGCCACAAGGGC	119 pb	
DENV-3	TS3: TAACATCATCATGAGACAGAGC	290 pb	
DENV-4	TS4: CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392 pb	
DENV-2	DENV-2S: GTTCTCTGCAAACACTCCA DENV-2C:	210pb	FIGUEIREDO, et al. 1997.

	GTGTTATTTTGATTTTCCTTG		
Febre Amarela (YFV)	EMF: TGGATATGACSACKGARGAYAT VD8: GGGTCTCCTCTAACCTCTAG	595pb	VASCONCELOS et al, 2004.
Bunyaviridae Oropouche	BUN-S AGTAGTGTGCTCCAC BUN-C AGTAGTATACTCCAC	700/ 1.100pb	MORELI et al, 2002
	BS-S: GTGGGGTCCAATTTGC BS-C: TGAACCCTATGCATCT	300pb	
Alphaviruses	M2W: YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW cM3W: ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCC DAYCC	434pb	BRONZONI, et al, 2005.
	naura (+): TCAATGCACCTTCGACCA	86pb	
	nmay (+): GGAAGTTGGCCAAGGC	270pb	

3.7 Clonagem e seqüenciamento dos arbovírus

Os *amplicons* obtidos na RT-PCR foram seqüenciados pelo método de interrupção da síntese da cadeia de nucleotídeo por dideoxynucleotídeos, com previa clonagem e utilizando os respectivos *primers sense* e *anti-sense*.

Para clonagem e seqüenciamento do vírus do dengue tipo 1, o gene NS1 completo foi isolado das amostras. Para isso dois pares de *primers* foram desenhados usando o programa *Edit Sequence* contido no pacote de programas *DNA Star*. Os clones e o resultado do seqüenciamento do vírus foram gentilmente cedidos pelo Mestre Eduardo Rezende Honda. O primeiro par de *primers*, denominado NS1-1 amplificou um fragmento de 498pb correspondendo à porção N-terminal e o segundo par, denominado NS1-2 amplificou um fragmento de 558pb correspondendo a porção C-terminal.

Para este experimento, três amplicons derivados de três pacientes diferentes, escolhido aleatoriamente foram usados. Os amplicons foram clonados no vetor pGEM® T easy de acordo com as instruções do fabricante. As seqüências dos primers usados para o seqüenciamento são mostradas na tabela 5.

Tabela – 5: Seqüência dos *primers* utilizados para obter a seqüência de DENV-1 isolado em Porto Velho.

Primers	Seqüência de Nucleotídios	Pares de base
NS1-1	5' TT CAT ATG GAC TCG GGA TGT GTA ATC AAC TG 3' 5' TT GGA TCC CTA GTT GAA AAT TCC AAA TC 3'	498bp
NS1-2	5' CG CAT ATG ATA TGG TTG AAA TTG CGT GAC TCC 3' TC GGA TCC CTA TGC AGA GAC CAT TGA CTT AAC 3'	558bp

Os amplicons obtidos através da clonagem com NS1-1 e NS1-2 foram diretamente seqüenciados no ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosynthesis, USA), gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, do Laboratório de Virologia Molecular da FMRP-USP, usando o Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Biosynthesis, USA). A PCR seguiu os seguintes ciclos: um ciclo para denaturação das fitas de 96°C por 2 minutos; 25 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 90 segundos. Após os ciclos as amostras foram deixadas em 60°C por 4bminutos e no gelo por 2 minutos conforme o manual do fabricante. As seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST na *home page* doNCBI, para garantir que as amostras isoladas foram do vírus da dengue tipo 1.

Amostras dos vírus do dengue foram seqüenciadas, também, na Unidade de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP. O seqüenciador, Personal Seq 4X4, foi gentilmente cedido pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. Para

obtenção da seqüência utilizou-se o kit *Thermo Sequenase Cy5.5 dye terminator cycle sequencing* (Amersham-Pharmacia-Biotech, USA). Para a mistura, utilizou-se aproximadamente 5µg de DNA purificado, 3,2 pmol do *primer sense*, 3,2 pmol do *primer anti-sense*, 0,5µl de cada dideoxynucleotídeos (ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP) contidos no kit, 1µl de DNA. Submeteu-se as amostras a 25 ciclos térmicos de 96°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Em seguida, precipitou-se os *amplicons* com álcool isopropílico. A seqüência nucleotídica foi obtida no seqüenciador automático *Personal Seq 4x4* (Amersham-Pharmacia-Biotech, USA).

No Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas foram seqüenciados amplicons do caso suspeito de febre amarela. Utilizou-se o Mega BACE 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, USA), gentilmente cedido pelo Dr. Spartaco Astolfi Filho. Para obtenção da seqüência utilizou o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE* (Amersham Bioscience). Assim misturou-se o *primer forward* ou FLAV 2 (5,0 pmol/µL), DNA com aproximadamente 100 a 200ng, diluído em água MiliQ autoclavada para se obter o volume final de 10µl. Para PCR foi utilizada uma microplaca com 96 orifícios com bordas (Sorenson, USA). Para evitar evaporação no momento da reação a placa foi selada com adesivo selador (Sorenson,USA). A PCR foi realizada em termociclador com os seguintes ciclos térmicos: inicialmente um ciclo de 95°C como *hot start*, em seguida 30 ciclos nas temperaturas 95°C por 15 segundos, 20°C por 20 minutos, 60°C por 80 segundos. Preciptou-se o DNA com acetato de amônia e etanol absoluto. Em seguida fazer o seqüenciamento gênico.

3.8 Análise das seqüências

As seqüências foram confrontadas com outras existentes no GeneBank através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), programa procura trechos na seqüência que sejam similares. As árvores filogenéticas foram obtidas através do alinhamento de seqüências. O programa Clustal W, que é um programa de alinhamento de múltiplas seqüências para DNA ou proteínas, produz o múltiplo alinhamento e divergências de seqüências biologicamente significativas. Esse programana está contido no site do European Bioinformatics Institute, e utiliza o método neighboring-joining que determina a diferenciação molecular do vírus e evolucionariamente, as relações podem ser vistas em Cladogramas e filogramas.

RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

Os objetivos do trabalho foram de início, o de identificar as arboviroses de maior prevalência no Estado de Rondônia e contribuir para o mapeamento de suas incidências nas diferentes áreas do Estado. Assim, após a realização dessa tese fica estabelecida uma metodologia para promover a vigilância epidemiológica através das análises efetuadas por método de isolamento, identificação e caracterização de arboviroses. Desde que os procedimentos para coleta e análise das 266 amostras de sangue de pacientes, em diferentes localidades do Estado, seguiram os mesmos critérios. Para isso considerou-se que o critério de exposição permitiria igualmente avaliar a utilidade e eficiência de cada método para orientar o estabelecimento de rotinas de caracterização e identificação de arboviroses para serem usadas pela Unidade de Virologia. Registre-se que os 266 pacientes apresentavam sinais e sintomas clínicos de processo infeccioso agudo e apresentaram exame microscópico negativo para pesquisa de *Plasmodium sp* no sangue.

4.1 Isolamento viral

4.1.1 Em células C6/36

Duzentas e sessenta e seis amostras de sangue dos pacientes com suspeitas clínicas de arboviroses foram inoculadas em células C6/36 para tentativa de isolamento viral. Apenas a monocamada celular inoculada com uma das amostras apresentou alteração na sua morfologia, caracterizando assim a presença de infecção viral através do efeito citopático, o que foi posteriormente confirmado por IFI.

4.1.2. Em cérebro de camundongos recém-nascidos

Apenas um soro foi inoculado em cérebro de camundongos recém-nascidos. O soro do paciente ASS, lavrador, 34 anos, morador do município de Theobroma, que após exames clínicos, originariamente suspeitou-se de febre amarela. Foram inoculados 30 camundongos recém-nascidos da seguinte forma: seis com o soro do paciente; 12 com fluído da cultura de células C6/C36 previamente inoculada com o soro do paciente, após oito dias de inoculação, seis com vírus da febre amarela vacinal, como controle positivo, e seis como controle negativo onde foi inoculado apenas meio de cultura L-15. Em 24 camundongos inoculados, seis com o fluído de cultura celular, seis com o soro do paciente ASS e 12 com o vírus da febre amarela vacinal apresentaram quadro de encefalite no terceiro dia após inoculação, sugestivo de isolamento de vírus. Os seis camundongos utilizados como controles negativos se mantiveram hígidos até o décimo dia do experimento e foram posteriormente sacrificados. Os camundongos que desenvolveram quadro de encefalite tiveram seus cérebros removidos por sucção com uma seringa de 5ml e submetidos à extração do RNA viral e RT-PCR com primers FLAV1 e FLAV2 que apresentou um amplicon com 800pb, posição característica do vírus Cacipacoré, seguida de seqüenciamento gênico para confirmação.

4.2. Imunofluorescência Indireta (IFI)

As 266 amostras de soro de pacientes inoculadas em células C6/36 foram analisadas por IFI. Destas, 70 foram positivas para DENV-1, uma para DENV-2 e 42 para DENV-3 e 1 positiva com “pool” de *Flavivirus*. Também,

utilizou-se no teste célula sabidamente infectada com DENV-1, cepa Mochizuki e com o vírus da febre amarela vacinal, como controles positivos. Como controles negativos foram utilizados dois *spots* infectados com vírus de outra família (o *Orthobunyaviridae* Oropouche) e outros dois não infectados. Foram consideradas amostras negativas os 152 soros que não apresentaram fluorescência para DENV1-2-3-4 e pool de *Flavivirus*. A confirmação dos resultados da IFI foi feita ao microscópio de fluorescência pela observação de dois microscopistas, ao considerarem que a intensidade da imunofluorescência determinava a infecção celular. As células inoculadas com a amostra do soro do paciente ASS exibiram fluorescência somente com o “pool” de *Flavivirus*, sendo esta amostra negativa para MIAF de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

4.3 A RT-PCR

4.3.1 Primers

4.3.1.1 D1 e D2 (Lanciotti et al, 1992)

Após a Imunofluorescência Indireta, foram realizadas a RT-PCR dos extratos de RNA oriundos do sobrenadante das células inoculadas com as 266 amostras visando a detectar RNA viral e a identificar os vírus que causaram infecção nos pacientes. Inicialmente, os 266 extratos foram submetidos à hemi-*nested*-RT-PCR utilizando o par de *primers* D1 e D2 que identificam vírus do dengue de qualquer sorotipo. Esse par de *primers* amplifica um fragmento de 511 pb correspondente à confluência dos genes C/prM, conforme mostra a figura 9. Obteve-se o *amplicom* com 511 pb de 112 amostras, isto é, 70 amostras positivas por IFI para DENV-1 e 42 amostras positivas para DENV-3

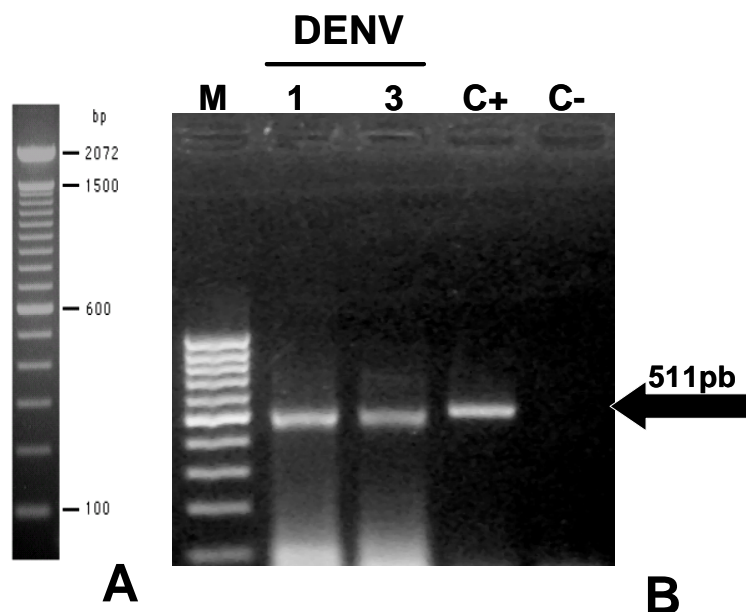


Figura – 9: Em A: Padrão do peso molecular de 100pb. Em B: Gel de agarose mostrando o perfil eletroforético do amplicom de dengue sorotipos 1 e 3 pelo *primers* de Lanciotti, et al., 1992. Gel de agarose a 1,7% com o produto da RT-PCR, submetido à corrida eletroforética, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador UV. Em M: marcador de peso molecular de 100 pb. Nas 2 linhas seguintes a amplificação parcial do genoma de DENV-1 e DENV-3. Nas linhas C+ e C-, o controle positivo utilizando o DENV-1 Mochizuki e controle negativo, respectivamente.

4.3.1.2 TS1 e TS3 (Lanciotti et al, 1992)

Em seguida, nos 112 produtos da RT-PCR dos quais foram detectados *amplicons* realizou-se uma *hemi-nested-PCR* com *primers* TS1, TS2, TS3 e TS4. Setenta amostras, correspondentes às coletadas nas epidemias de 2001 até 2003, apresentaram *amplicons* com o tamanho de 482 pb, caracterizando o isolamento de DENV-1 conforme mostrado na figura 10.

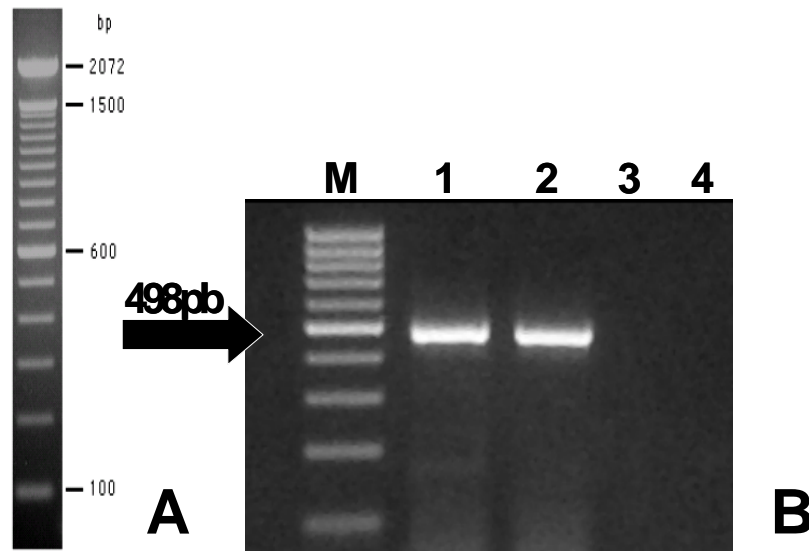


Figura – 10: Em A: Padrão do peso molecular de 100pb. Em B: Perfil eletroforético do amplicom de DENV-1 através de nested-PCR com os *primers* de Lanciotti et al, 1992. Gel de agarose 1,7% corado com brometo de etídio mostrando os amplicons de DENV-1. Em M: marcador de peso molecular de 100pb. Em 1: DENV-1 isolado de paciente. Em 2: controle positivo com DEN-1 cepa Mochizuki. Em 3 e 4: controles negativos com o vírus Mayaro e água, respectivamente.

Quarenta e duas amostras, correspondentes às coletadas nas epidemias de 2004 e 2005, apresentaram *amplicons* com o tamanho de 290 pb, conforme mostrado na figura 11, caracterizando isolamento do DENV-3

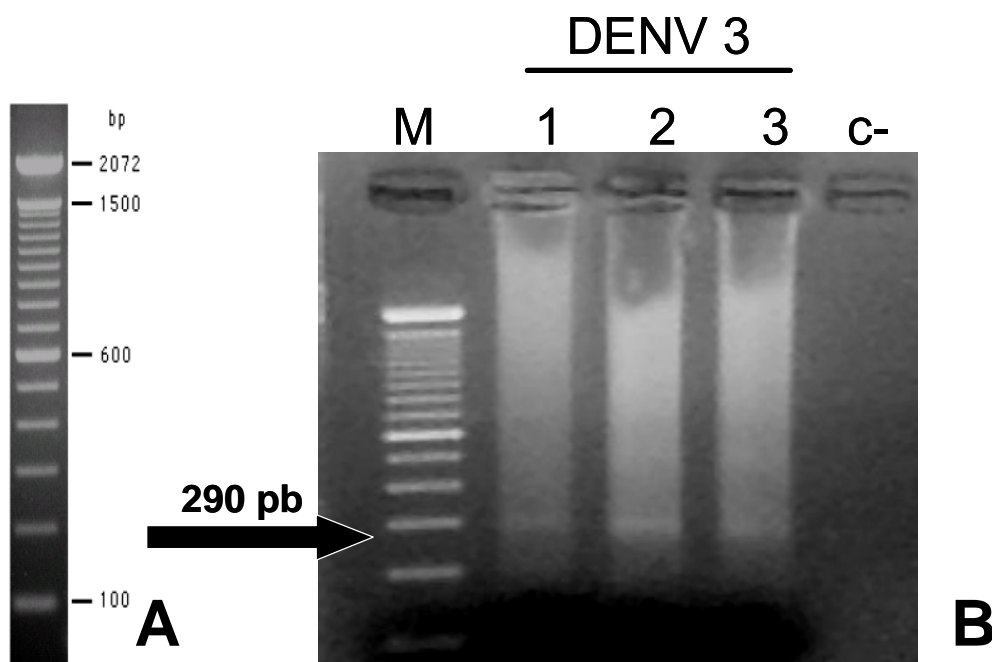


Figura – 11: Em A: Padrão do peso molecular de 100pb. Em B: Perfil eletroforético do amplicom de DENV-3 através de nested-PCR com os *primers* de Lanciotti et al, 1992. Gel de agarose a 1,7% com o produto da Hemi-nested-PCR, para caracterização do sorotipo 3 do vírus dengue. Em M: Marcador de peso molecular de 100pb. Linha de 1 a 2: Fragmento de 290pb de amostras de pacientes com dengue no Estado de Rondônia. Linha 3: Controle positivo. Em C-, o controle negativo da reação.

4.3.1.3 DEN2C e DEN2V (Figueiredo et al., 1997)

Das 74 amostras coletadas durante a epidemia de 2006, somente em uma obteve o isolamento viral do DENV-2. A amplificação do genoma de DENV-2 é mostrado na figura 12.

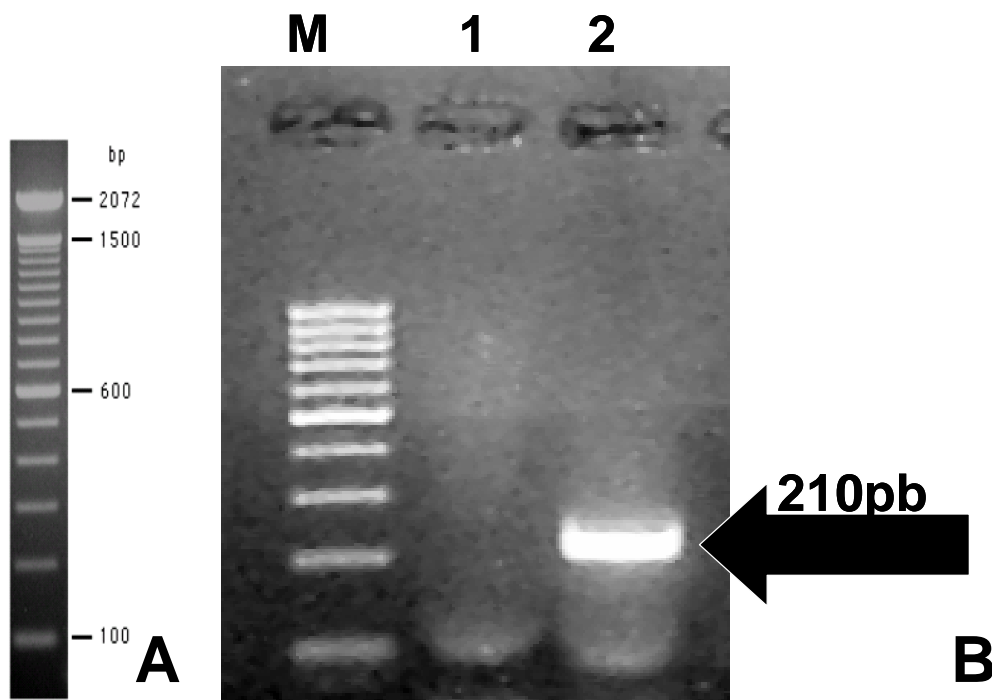


Figura – 12: Em A: Padrão do peso molecular de 100pb. Em B: Perfil eletroforético do amplicom de DENV-2 com os primres selecionados por Figueiredo et al, 1997. Gel de agarose 1,7% corado com brometo de etídio. Em M: marcador de peso molecular de 100pb. Em 1: controle negativo usando cepa de DENV-1 isolado em Porto Velho. Em 2: amplicom mostrando a amplificação do genoma do DENV-2 isolado em Porto Velho.

Portanto, detectou-se genoma do DENV e desta forma confirmou-se o isolamento viral nos materiais clínicos de 113 pacientes diferentes. A origem dos pacientes encontra-se na tabela 6.

Tabela – 6: Resultados da sorotipagem do vírus da dengue no Estado de Rondônia durante os anos de 2001 a 2006.

Cidades	DENV-1	DENV-2	DENV-3
Ariquemes			01 paciente
Cacoal			01 paciente
Colorado do Oeste			12 pacientes
Jarú			02 pacientes
Ouro Preto D'Oeste			13 pacientes
Porto Velho	70 pacientes	1 paciente	10 pacientes
Vilhena			03 pacientes
TOTAL	70 pacientes	1 paciente	42 pacientes

4.3.1.4 FLAV1 e FLAV2 (Figueiredo et al., 1998).

Os 152 extratos de RNA oriundos de fluido de cultivo celular previamente inoculado, nas quais não se obteve amplicom pela RT-PCR com os *primers* específicos para dengue, foram submetidas a uma *hemi-nested-RT-PCR* com *primers* universais para *Flavivirus*, os quais amplificam o final do gene NS5 e início da região 3' não codificante. Obteve-se de um destes extratos, o do paciente ASS, um *amplicom* com 800pb, sugerindo o isolamento do CPCV. Este *amplicom* é mostrado na figura 13.

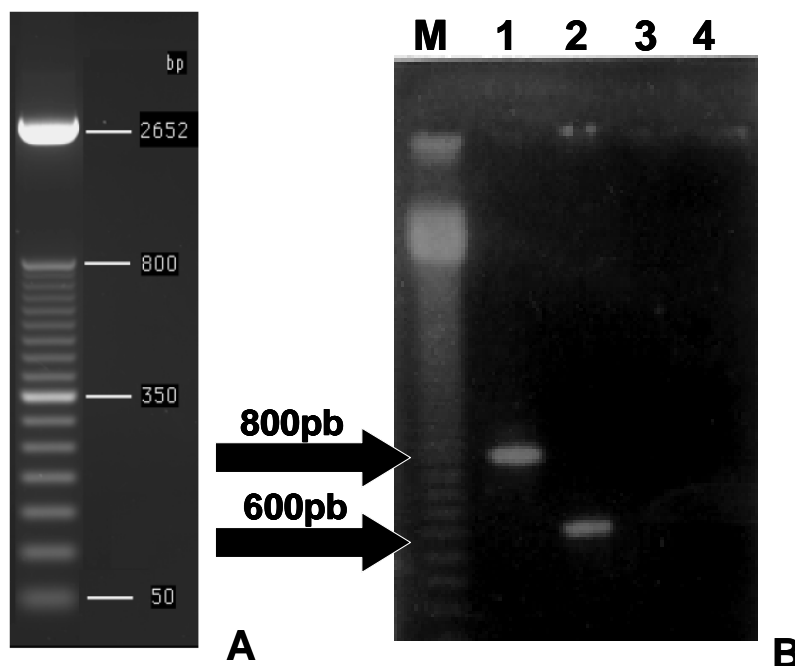


Figura – 13: Em A: Padrão do marcador de peso molecular de 50 pb. Em B: Amplificação do genoma de CACV pelo *primers* Flavi-1 e Flavi-2. Gel de agarose 1,7% , corado com brometo de etídio mostrando em M: marcador de peso molecular de 50pb. Linha 1, amplicom de 800pb produzido pela amostra do paciente AS. Linha 2: Amplicon de 600pb produzido pelo YFV 17DD. Linha 3: controle negativo utilizando o vírus Mayaro. Linha 4: controle negativo.

Os 112 extratos de RNA nos quais foram detectados DENV-1 e 3 também foram submetidos a RT-PCR com os *primers* universais para *Flavivirus*, e exibindo como resultado dois fragmentos, um de 650 pares de base e outro de 550pb. Os fragmentos podem ser observados na figura 14

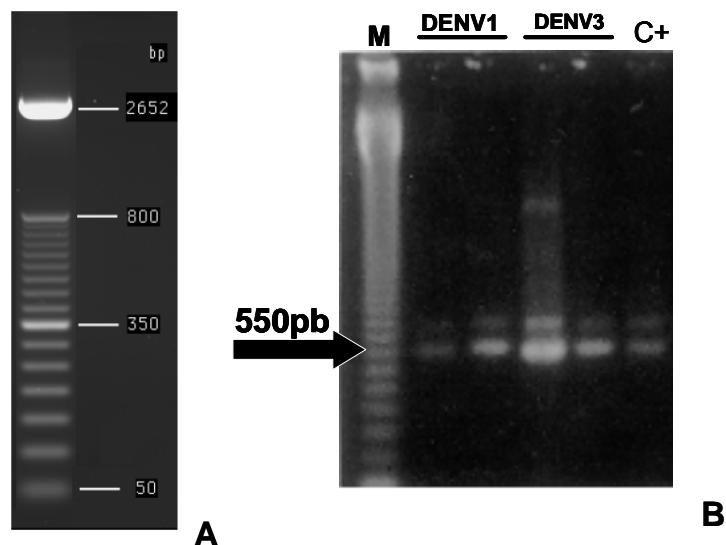


Figura – 14: Em A: Padrão de peso molecular de 50 pb. Em B: Amplificação do genoma de DENV-1 E DENV-3 pelo *primers* Flavi-1 e Flavi-2. Gel de agarose a 1,7% corado com brometo de etídio com amostras escolhidas aleatoriamente de DENV-1 e 3 para mostrar o perfil eletroforético com os *primers* universais para *Flavivirus*. As amostras apresentaram bandas duplas com 650-550pb. Em M: Marcador de peso molecular de 50 pb. O controle positivo (C⁺) foi DENV-1, cepa Mochizuki.

4.3.1.5 FG1 e FG2 (Bronzoni et al, 2005)

Com o propósito de estabelecer um par de *primer* universal para *Flavivirus*, que tivesse maior maleabilidade e segurança na identificação de flavivíroses, foram usados os *primers* FG1 e FG2 que amplificam 938 pb do gene da proteína NS5 e que seguidos de uma *hemi-nested-PCR*, permitem identificar o *Flavivirus* presente. As amostras para o teste foram escolhidas aleatoriamente. O resultado da RT-PCR pode ser visto na figura 15.

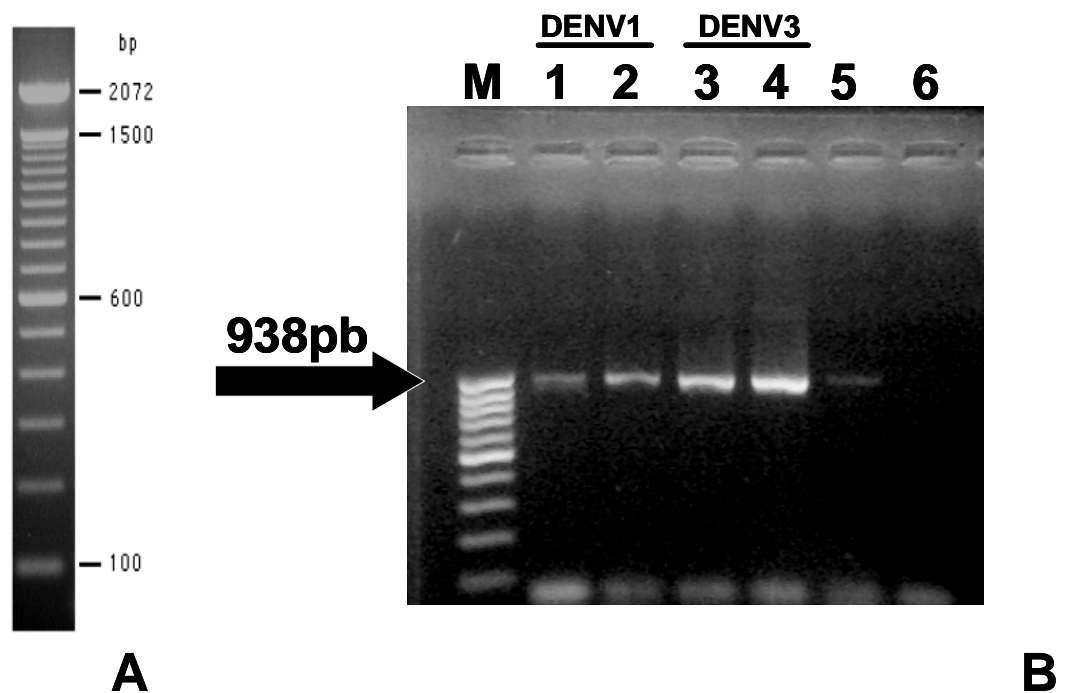


Figura – 15: Em A: Padrão de peso molecular de 100 pb. Em B: Amplificação do genoma de DENV-1 E DENV-3 pelo *primers* FG1 e FG2. Gel de agarose 1,7% corado com brometo de etídio com amostras selecionadas aleatoriamente para a PCR com FG1 e FG2 amplificando 938 pb. Linha M: marcador de peso molecular de 100pb. Linhas 1 e 2: amostras de dengue sorotipo 1. Linhas 3 e 4: amostras com dengue sorotipo 3. Linha 5: amostra de febre amarela vacinal 17DD. Linha 6: controle negativo utilizando o vírus Mayaro.

4.4 Hemi-nested-PCR

Os testes com os *primers* ndenv1(-) e ndenv3(-) mostraram resultado satisfatório, amplificando e sorotipando os vírus da dengue, não amplificando o vírus da febre amarela utilizado como controle negativo. O DENV-1 apresentou um *amplicom* de 472 pb e o DENV-3 um *amplicom* de 659pb, que podem ser vistos na figura 16

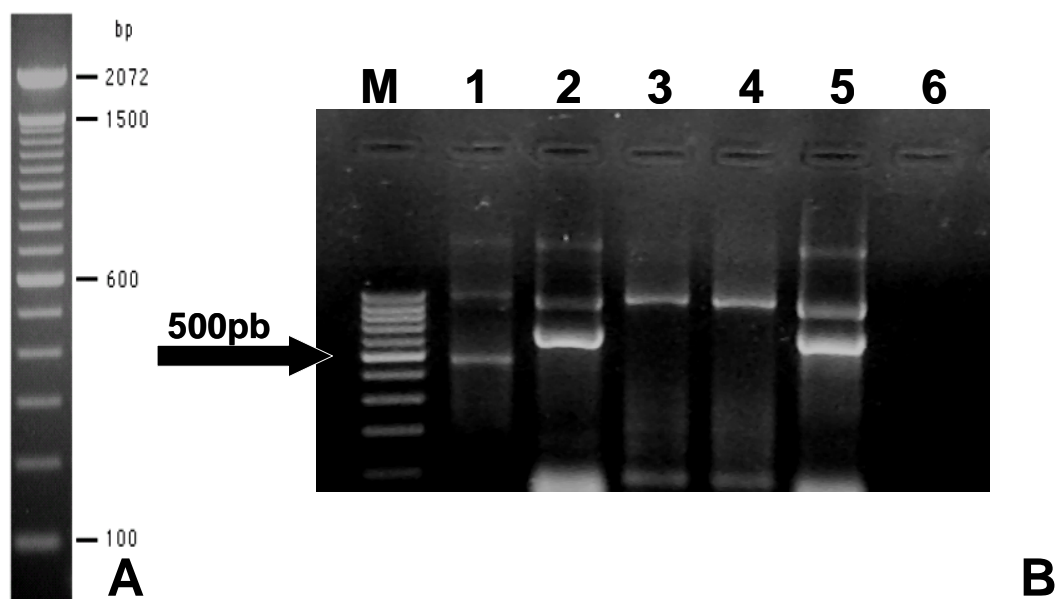


Figura – 16: Em A: Padrão de peso molecular de 100 pb. Em B: Amplificação do genoma de DENV-1 e DENV-3 pelo *primers* FG1 e ndenv1(-) e ndenv3(-) em gel de agarose 1,7% corado com brometo de etídio. Na linha M, marcador de peso molecular de 100pb. Linha 1, DENV-1 com 472 pb. Linha 2, DENV-3 com 659pb. Linhas 4 e 5, vírus YFV 17DD e CACV e linha 6, controle negativo.

4.5 Seqüenciamento de nucleotídeos

Para confirmar o resultado do isolamento viral e reforçar os dados obtidos através da *Hemi-nested-RT-PCR*, foi realizado o seqüenciamento gênico das amostras. Estas foram alinhadas com seqüências obtidas no GenBank, onde os números de acesso se encontram nas tabelas 7 e 8. Com a amostra correspondente ao paciente ASS, foi realizado, para efeitos comparativos, o BLAST, pois havia dúvidas se o vírus isolado era realmente o Cacipacoré (CPCV).

4.5.1 Dengue sorotipo 1

Os *amplicons* de três pacientes escolhidos aleatoriamente foram inseridos em vetor de clonagem pGEM T easy (Invitrogen,USA). Cinco clones selecionados foram seqüenciados. A seqüência de nucleotídeos do DENV-1 isolado em Porto Velho, baseada no gene da proteína NS1 foi gentilmente cedida pelo M. Sc. Eduardo Rezende Honda. A seqüência completa está disposta na figura 17.

```

01  GGACTCGGGATGTGTAATCAACTGGGAAAGGCAGAGCTCAAATGTGGAAAGTGGCATTT 60
61  TCTGTCACCAATGAAGTTCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCCAGGCCGACTCCCCA 120
121 AAGAGACTATCAGCACGCCATTGGGAAGGCATGGGAGGAGGGTGTGTGTGGAAATTCGAT 180
181 CAGACCACTCGTCTCGAAACATCATGTGGAAGCAAATATCAAATGAACTAAAACCACAT 240
241 TTTACTTGCAAATGCCATGAAATTCACAGTGGGTCTGTACGAGATGTTAGTGTGGATCTTG 300
301 GCCCAAGGGAAAAAAATGATTGGGCCACACCCATGGAAACACAAATACTCGTGGAAAAG 360
361 CTGGGAAAAGCAAAAAATCATAGGAGCAGATGTACAGAACACCCTTCATCATCGATGG 420
421 CCCAAACCCCCAGAATGCCCTGCTGCCAAAGAGCATGGAACATTCTGGGAAGTACTGC 480
481 GGACTATGGATTTGGAATATATGGTTGAAATTGCGTGACTCCTACACTCAAGTGTGTGAC 540
541 CACCGGCTAATGTCAGCTGCCATCAAGGACAGCAGGGCAGTTCATGCTGACATGGTGGTA 600
601 CTGGATAGAAAGTGCAAGAACGAGACCTGGAAGCTGGCGAGAGCCTCCTTCATAGAAGT 660
661 TACGACATGCGTCTGGCCAAAATCCCACACTCTATGGAGCAATGGAGTTCTGGAAAGTGG 720
721 AATGATAATCCCAAAGATATATGGAGGACCAATATCTCAGCACAACTACAGACCAGGATA 780
781 TTTCACACAAAACAGCAGTGGCCGTGGCACCTACGCAAGTTGGAACTACATTTTGTGTTTGT 840
841 GTGAGGGTACCACAGTTGTTGTGGATGGACATTGTGCGAAATCGAGGACCATCTCTTAGA 900
901 ACCACAACAGTCACAGAAACGGTAATCCATGCATGGTGTGTATATCCTGTACGCTACC 960
961 CCCCTTACGTTTCAAACGGAGCAACGACGGGTGTTGGTACGGTATGGAAATCAGACCCAG 1020
1021TCAAGGACAAGGCAAGAGAACCTAGTTAAGTCAATG 1056

```

Figura – 17: Seqüência nucleotídica final de DENV-1 isolado em Porto Velho durante as epidemias de 2002-2003

O alinhamento da seqüência de cinco DENV-1 isolados em outras regiões do Brasil com o isolado em Porto Velho demonstra 98% de semelhança como mostra a figura 18. As referências bibliográficas das seqüências utilizadas neste alinhamento múltiplo estão discriminadas na tabela 7


```

AF513110 GACTCGGGATGCGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
AF311958 GACTCGGGATGCGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
AF311957 GACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
AF311956 GACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
AF226685 GACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAACTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
PVH/NS1  GACTCGGGATGTGTAATCAACTGGAAGGGCAGAGAGCTCAAATGTGGAAGTGGCATTTTT 60
*****

AF513110 GTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
AF311958 GTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
AF311957 GTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
AF311956 GTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
AF226685 GTCACTAATGAAGTCCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
PVH/NS1  GTCACCAATGAAGTTCACACTTGGACAGAGCAATACAAATTCAGGCCGACTCCCCAAA 120
*****

```

Figura – 18: Alinhamento múltiplo realizado com programa Clustal W da cepa de DENV-1 isolada em Porto Velho com outras cepas isoladas no Brasil.

Tabela – 7: Número de acesso das seqüências nucleotídicas no GenBank e a referência bibliográfica utilizadas para o alinhamento múltiplo do DENV-1.

Acesso GenBank	Referência Bibliográfica
AF311958	Duarte dos Santos,C. N., Rocha,C. F. S., Cordeiro, M.,
AF311957	Fragoso, S. P., Rey, F., Deubel, V. and Despres, P.
AF311956	Genome analysis of dengue type-1 virus isolated
AF513110	between 1990 and 2001 in Brazil reveals a remarkable
AF226685	conservation of the structural proteins but amino acid differences in the non-structural proteins. Virus Res. 90 (1-2), 197-205 (2002).

4.5.2 Dengue sorotipo 3

Analisou-se através da pesquisa de similaridade a seqüência do DENV-3 de isolados do soro de pacientes residentes em Ariquemes, Cacoal, Colorado D'Oeste, Jarú, Ouro Preto D'Oeste, Porto Velho e Vilhena com seqüências nucleotídicas de DENV-3 encontradas no GenBank, utilizando o programa Clustal W disponível no sítio do *European Bioinformatics Institute*. A seqüência parcial obtida é mostrada na figura 19 As amostras isoladas no Estado de Rondônia quando analisadas apresentam 98% de similaridade entre si conforme o mostrado na figura 20. Os números de acesso às seqüências escolhidas são mostrados na tabela 8.

```

TTTTTACACTACTAATGCTGGTCACCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA
ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTGACGTGGTGCTCGAGCACC
GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAAACAAGCCAACGTGGATATAGAGCTTCAGAAGA
CCGAGGCCACCCAATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA
TAACTACTGACTCAAGATGTCCTACCCAAGGGGAAACGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC
AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG

```

Figura – 19: Seqüência gênica deduzida dos DENV-3 isolados no Estado de Rondônia

```

DENV3R01 TTTTACACTACTAATGCTGGTCAOCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA 60
DENV3R02 TTTTACACTACTAATGCTGGTCAOCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA 60
DENV3R03 TTTTACACTACTAATGCTGGTCAOCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA 60
DENV3R04 TTTTACACTACTAATGCTGGTCAOCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA 60
DENV3R05 TTTTACACTACTAATGCTGGTCAOCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAA 60
*****

DENV3R01 ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACG 120
DENV3R02 ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACG 120
DENV3R03 ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACG 120
DENV3R04 ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACG 120
DENV3R05 ACAGAGATTTTGTGGAAGGTCTATCAGGAGCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTCGAGCACG 120
*****

DENV3R01 GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCCAAACGTTGGATATAGAGCTTCAGAAGA 180
DENV3R02 GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCCAAACGTTGGATATAGAGCTTCAGAAGA 180
DENV3R03 GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCCAAACGTTGGATATAGAGCTTCAGAAGA 180
DENV3R04 GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCCAAACGTTGGATATAGAGCTTCAGAAGA 180
DENV3R05 GGGGGTGTGTGACTACCATGGCTAAGAACAAGCCAAACGTTGGATATAGAGCTTCAGAAGA 180
*****

DENV3R01 CCGAGGCCAACC AATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA 240
DENV3R02 CCGAGGCCAACC AATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA 240
DENV3R03 CCGAGGCCAACC AATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA 240
DENV3R04 CCGAGGCCAACC AATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA 240
DENV3R05 CCGAGGCCAACC AATTGGCGACCCTAAGGAAGCTATGCATTGAGGGGAAAATTACCAACA 240
*****

DENV3R01 TAACAAC TGACTCAAGATGTCCTA CCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC 300
DENV3R02 TAACAAC TGACTCAAGATGTCCTA CCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC 300
DENV3R03 TAACAAC TGACTCAAGATGTCCTA CCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC 300
DENV3R04 TAACAAC TGACTCAAGATGTCCTA CCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC 300
DENV3R05 TAACAAC TGACTCAAGATGTCCTA CCAAGGGGAAGCGGTTTTGCCTGAGGAGCAGGACC 300
*****

DENV3R01 AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG 343
DENV3R02 AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG 343
DENV3R03 AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG 343
DENV3R04 AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG 343
DENV3R05 AGAACTACGTGTGTAAGCATAACATACGTAGACAGAGGCTGGGG 343
*****

```

Figura – 20: Alinhamento total das amostras de DENV-3 do Estado de Rondônia feito pelo programa Clustal W do sítio EMBL.

Tabela – 8: Número de acessos das seqüências nucleotídicas no GenBank e a referência bibliográfica utilizadas no alinhamento múltiplo do DENV-3.

Acesso ao GenBank	Referência Bibliográfica
M93130	Osatomi,K. & Sumiyoshi,H., 1990.
AF317645	Yuan,X., Geng,L., Li,X., Yu,M. Não-publicado
AY679147	Miagostovich,M.P., dos Santos,F.B. & Nogueira,R.M.R. Não-publicado
AY099338	Peyrefitte, C.N., Couissinier-Paris, P., Mercier-Perennec, V., et. al. 2003.

4.5.3 O vírus Cacipacoré

O CPCV foi isolado de um paciente, AS, morador do município de Theobroma, que foi a óbito no Hospital de Base do Estado de Rondônia no dia 13 de abril de 2002. Após a RT-PCR com os *primers* universais para *Flavivirus* foi realizado o seqüenciamento do isolado e, por conseguinte o BAST com seu respectivo alinhamento. Obteve-se uma seqüência de 719pb e o alinhamento com 91% de similaridade com o CPCV. Os resultados são mostrados nas figuras 21 e 22.

```
TTCATATGGTCGACTGCACGCGGCCGTTAAATTCAGTGTATTTGGATGACGACTGAAGACATGCTGGATGTGTGGAATAGAGTGTGG
ATAGAGGAAAATGAGCACATGGAGGACAAGACTCCGTTAGATCATGGAACGAAGTGCCATACATCGGGAAAAAGAGAAGACATCTGTT
GTGGAAACCTCATTGGGACACGAAGTAGAGCTACTTGGGCTGAAAACATATATGCAGCCATAAACCAAGTTAGGGCTATAATAGGAAA
TGAAGAGTATGAAGACTATATGCCCTCACAGCGTAGATTTGAGGAAACACGGGTAGTGATTGACCCGTTTTTTAAAGAATAAACAAA
TTAACCGTAGCTATAGAAATTTTTAGGAATATGGTAGTATTAAGTTAAGCAAATAGATAAGGAAATTTGTTAGAAATATATATGTTAGTT
AAGAAGGTATTTGTAGATTATATAGTATGGTTAAGTTAAGAAATAGGGATTGTATAAATCCAAATGTAAATAGGGACAATCTTAT
ATTTAGTGGTTTAGAGACTTATTAGTCAGGCCAGAACTGCCACCGGATGCTGGGTAAAACGGTGCTGACTGTAACTAGCCCCAGGAGG
ACTGTGTAAACAACTTACGTAAGGAGGAGAGAAAGCCCTCAAACCGTCTCGGAGAGGACCTGCTCTCCAAAGGGGGAAAGCCCG
AGGCCATATGTAGCA
```

Figura – 21: - Seqüência gênica final CPCV.

Cacipacore virus BeAn 4073 NS5 gene, partial cds
Length=274
Score = 272 bits (137), Expect = 1e-69
Identities = 242/264 (91%), Gaps = 11/264 (4%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 378 GGAATATGGTAGTATTAAGTTAAGCAAATAGATAAGGAAATTGTTAGAATAT-ATATGTT 436
          |||
CACVP 18 GGAATATGGTAGTATTAAGTTA-GCAA-TAGATAAGGAAAT-GTTAGAATATTATATGTT 74

Query 437 AGTTAAGAAGGTATTTG-TAGATTATATAGTATGGTTAAGTTAAGAATAAGGGATTTGTA 495
          |||
CACVP 75 AGTTAAGAAG-TATTTGGTAGATTATATAGTATGGTTA--TTACGTATTAGGGTTTGTGTA 131

Query 496 TAAATCCAAATGTAAATAAGGGACAATTCCTTATATTTAGTGGTTTAGAGACTTATTAGTC 555
          |||
CACVP 132 -AAATC-AAATGTAAATAAAGGAAAATTTTT-TATTTAGTGGTTTAGAGACTTATTAGTC 188

Query 556 AGGCCAGAACTGCCACCGGATGCTGGGTAAACGGTGCTGACTGTAACCTAGCCCCAGGAG 615
          |||
CACVP 189 AGGCCAGAAATGCCACCGGATGCTGGGTAAACGGTGCTGCCTGTAACCTAGCCCCAGGAG 248

Query 616 GACTGTGTGAACAAACTTACGTAA 639
          |||
CACVP 249 GACTGGGTGAACAAACTTCCGTAA 272

```

Figura – 22: Alinhamento do genoma do CPCV isolado em Porto Velho (CACVP) com a cepa CPCV BeAn 4073 (Query) obtido através do BLAST.

A eficiência do processo de isolamento e identificação viral inicia-se na seleção do paciente através da anamnese médica e preenchimento correto do questionário elaborado pelo Laboratório de Virologia. A exclusão de pacientes com outras doenças infecciosas é essencial para a obtenção de amostras com alta possibilidade de obtenção do vírus. As cidades visitadas estavam com a epidemia de dengue já estabelecida e sabidamente com pacientes que tiveram o exame sorológico com o resultado de IgM positivo, porém fazia-se necessário o isolamento e identificação viral da cepa circulante. A elaboração de um cenário eficiente no ambiente laboratorial, onde as amostras foram processadas de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, favoreceu os resultados obtidos, onde diagnósticos sorológicos como IFI mostrou-se tão eficiente como diagnóstico por RT-PCR. Porém, a preferência por métodos moleculares como a RT-PCR dá-se por ser mais econômico, menos oneroso e pode ser realizado diretamente do soro do paciente, pois para a realização de IFI, geralmente preparado no próprio laboratório, necessita-se de preparo de lâminas, existência de um biotério para preparação de MIAF e também da

disposição de um banco de vírus volumoso para poder preparar os *pools* para identificação de famílias virais.

A exceção desta tese foi o vírus Cacipacoré, pois houve a necessidade de seqüenciamento gênico para obtenção de um resultado consistente. Clinicamente o paciente apresentava um quadro dúbio de febre amarela ou leptospirose. A leptospirose foi confirmada com testes sorológicos, porém o vírus Cacipacoré, até o momento isolado de aves migratórias, foi isolado deste paciente. A associação entre o óbito do paciente e a concomitância entre as duas enfermidades não foi avaliado pelo corpo clínico que atendeu o paciente, assim qualquer especulação sobre o vírus ter causado o óbito do paciente é imatura.

DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

A região norte do Brasil, pela presença da floresta tropical úmida, possui uma rica fauna de artrópodes hematófagos não alados como os carrapatos e alados como os mosquitos, culicídeos, flebotomíneos, simulídeos além de triatomíneos e outros que transmitem dezenas de doenças afetando o homem. Entre as mais conhecidas e atualmente prevalentes estão a malária, a leishmaniose, a dengue e a febre amarela. Atualmente, o vírus da dengue vem ganhando destaque entre as doenças que são transmitidas por mosquito na região norte, devido ao crescente processo de urbanização que sofrem os Estados e pelas más condições de saneamento que permite o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti* em coleções de águas paradas em áreas domiciliares e peri-domiciliares, fazendo com que o número de casos de infecção pelo vírus da dengue supere os casos de malária. Durante o ano de 2005, foram atendidos no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), 31.111 pacientes com síndrome febril aguda, suspeitando-se de malária, porém somente 11.505 casos tiveram diagnóstico parasitológico positivo, ficando a esclarecer 19.606 casos, que eventualmente podem ser de infecção pelo vírus da dengue ou outras arboviroses, também não descartando casos febris provocados por outras infecções virais e bacterianas. Na região norte foram notificados 41.063 casos de dengue, havendo um aumento de 48,4% em relação ao ano de 2004. No Estado de Rondônia houve um aumento de 124% nos casos notificados de suspeita clínica de dengue entre os anos 2004 e 2005.

Em Rondônia, a criação e implantação de um grupo para pesquisa de arbovírus veio complementar as funções do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais – IPEPATRO, promovendo o desenvolvimento do estudo

de viroses na região ocidental da Amazônia. O Instituto Evandro Chagas, laboratório de referência nacional, absorvia até recentemente toda a investigação sobre arbovírus, o que causava atrasos inconvenientes nos diagnósticos etiológicos de casos suspeitos em Rondônia e outras Unidades da Federação pelo congestionamento de amostras. A Unidade de Virologia do IPEPATRO, criada em 2001, atualmente é capaz de isolar e identificar por métodos moleculares os arbovírus circulante em Rondônia; praticar a vigilância epidemiológica molecular e sorológica, principalmente em relação ao vírus da dengue. O IPEPATRO possui, além disso, uma equipe formada por um virologista, um médico e um entomólogo que se deslocam para atender os municípios com sinais de ocorrência de epidemias.

Nas cidades do interior do Estado de Rondônia relacionadas nessa tese, a integração entre os Laboratórios de Epidemiologia, o Laboratório de Entomologia e o Laboratório de Virologia, permitiu realizar uma investigação em várias áreas do Estado de Rondônia que culminou com o sucesso nos isolamentos e identificações realizados pelo Laboratório de Virologia. Foi possível separar os pacientes com infecções febris por infecções bacterianas ou por malária, daqueles que realmente mostravam quadro compatível com infecção pelo DENV ou outras infecções de origem viral. A anamnese física e prova do laço se revelaram úteis para estabelecer o diagnóstico diferencial. O Laboratório de Entomologia estudou e identificou criadouros do mosquito *Aedes aegypti*, inclusive em fossas sépticas, como ocorrido no município de Colorado D'Oeste. O Laboratório de Virologia se responsabilizou pela coleta, armazenamento e transporte do sangue coletado. Também, houve a participação da Secretaria Estadual de Saúde de Rondônia (SESAU), com

apoio logístico, fornecendo transporte, combustível e motorista. Dessa forma foi possível realizar buscas ativas de pacientes com suspeitas de dengue e verificar o nível de infestação por larvas e montar armadilhas para coleta de mosquitos nas periferias da cidade de Porto Velho e do interior do Estado.

No presente trabalho foi descrito o isolamento e identificação molecular dos vírus do dengue sorotipo 1, 2, 3 e do vírus Cacipacoré. Foi também realizado um trabalho de análise de seqüências codantes de vírus da família *Flaviviridae* e conseguiu-se eleger os *primers* para serem usados na identificação viral.

As coletas foram realizadas em cidades que se localizavam no eixo da BR 364, principal via de ligação terrestre do Estado de Rondônia e Acre com o sul do país. As cidades de Vilhena, Ouro Preto D'Oeste e Jacy-Paraná são pontos estratégicos para a vigilância epidemiológico-molecular de arbovírus, principalmente aqueles no qual sua dispersão é oriunda do sul do país. Em Vilhena, existe o Posto Fiscal do Estado, onde caminhoneiros ficam parados por até 12 horas esperando a liberação de cargas para entrarem no Estado. Ouro Preto D'Oeste, por se localizar na região central do Estado, é parada estratégica de carros e ônibus vindos do sul. Jacy-Paraná, cortada pela BR 364, no sentido Porto Velho-Rio Branco, também se constitui parada de carros e ônibus vindo do Acre.

A dengue é a arbovirose mais importante da atualidade e nos últimos anos tem se mostrado em grandes surtos causando doenças graves aonde a forma clássica vem evoluindo e apresentando formas hemorrágicas. Durante as últimas décadas houve significativo aumento da transmissão do vírus em todo o mundo, resultando de uma expansão na sua distribuição geográfica

nas áreas de ocupação e também relacionado ao processo de urbanização e ausência de controle efetivo do mosquito vetor *Aedes aegypti*, que não existia na maioria dos países atingidos pela dengue. Para agravar a situação muitos países atingidos pela dengue têm uma estrutura de saúde pública precária. A falta de recursos financeiros e humanos vem resultando na negligência de ações para desenvolver um vasto programa de prevenção à doença. Países como o Brasil recorrem a medidas de emergência para combater a doença, raramente são implantadas medidas para prevenir futuras epidemias, refletindo assim, na transmissão contínua dos sorotipos virais (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e emergência do DHF (Febre do Dengue Hemorrágico) em áreas onde a doença não tem prevalência. Durante a epidemia de dezembro de 2004 e janeiro de 2005 foram relatados casos de encéfalo-mielite aguda causada pelo vírus do dengue sorotipo 3 nos municípios de Cacoal e Jarú. Foram identificados sete casos, sendo dois em Cacoal e cinco em Jarú. Não foi possível o isolamento viral, nem a identificação viral pela RT-PCR, somente relatado IgM positivo para os casos. A Secretaria de Vigilância em Saúde fez estudos descritivos da doença e busca retrospectiva dos prontuários dos pacientes com os sintomas de encéfalo-mielite nas cidades citadas a cima. A fisiopatologia das complicações neurológicas do dengue, embora raras, podem ser explicadas pelos seguintes eventos, isolados ou associados: edema cerebral, hemorragia cerebral, hipoatremia, falência hepática fulminante com encefalopatia porto-sistêmica, anóxia cerebral, hemorragia microcapilar e liberação de produtos tóxicos (LUM, et al., 1996).

A metodologia utilizada de semear amostras de soro de pacientes, suspeitos de infecções virais, em culturas de células C6/C36 para isolamento e posterior identificação viral revelou-se bastante eficaz. Das 266 culturas semeadas obteve-se 113 (43%) positivas para dengue na análise por IFI e por RT-PCR. A inoculação em cérebro de camundongo, atualmente não vista como ética, todavia, mostrou sua utilidade, pois permitiu distinguir uma das amostras provocando encefalite letal nos camundongos inoculados. Registre-se, entretanto que, mesmo nesse caso, a inoculação em camundongos não acrescentou informações originais, pois a referida amostra foi à única que provocou efeitos citopáticos nas células da cultura inoculada. O vírus contido na amostra de soro em questão, suspeito inicialmente de tratar-se de vírus da febre amarela, pela sintomatologia do paciente, revelou-se em seguida ser o CPCV, identificado por RT-PCR e seqüenciamento gênico. O CPCV foi isolado pela primeira vez em 1977, de um pássaro, no Estado do Pará, sem causar doença conhecida em seres humanos. O caso ocorrido em Rondônia, no qual isolamos e identificamos o vírus no Laboratório de Virologia do IPEPATRO, foi de um lavrador da cidade de Theobroma, A.S.S. de 34 anos, sexo masculino, atendido inicialmente no Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEMETRON). De acordo com prontuário clínico foi relatada a suspeita de hepatite. Exames laboratoriais identificaram: traços de sangue na urina, contagem de hemácias e dosagem de hemoglobina revelou anemia moderada. Na ficha individual de investigação foram assinalados os sintomas icterícia, hemorragia, febre, cefaléia, mialgia, congestão conjuntival, alterações respiratórias, insuficiência renal, náusea/vômito e diarréia. Iniciou-se a investigação como sendo quadro suspeito de leptospirose com

administração de orientação terapêutica correspondente. O paciente foi transferido para UTI do Hospital de Base do Estado de Rondônia “Dr. Ary Pinheiro”, aonde veio a óbito. Posteriormente, *pos mortem*, obteve-se resultado positivo para sorologia para Leptospirose, realizado pelo Instituto Evandro Chagas, em Belém, Pará. O Isolamento desse vírus se contitui em um resultado importante, pois demonstra que o vírus Cacipacoré, anteriormente isolado somente em aves, pode ser isolado em seres humanos. Esse caso em particular, foi isolado de um hospedeiro acidental. Os dados clínicos e laboratoriais não permitiram avaliar se a evolução clínica da infecção viral foi agravada pela Leptospirose ou vice versa, mas em qualquer caso, indica um efeito patogênico da infecção por CPCV. Estudos filogenéticos revelam que o vírus pertence ao ramo do vírus da Encefalite Japonesa (JEV), onde também são inclusos os vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), Bussuquara, Rocio, Ilhéus e Iguape, tidos como vírus causadores de encefalite (BATISTA, et al, 2001; BALEOTI, MORELI, FIGUEIREDO, 2005). Segundo Simões dos Santos, et al (2006), é importante enfatizar que as infecções causadas por arbovírus apresentam diversos sintomas que são negligenciados a menos que haja uma epidemia e geralmente são confundidos com dengue. Assim não há a investigação diagnóstica por parte dos médicos que estão em áreas epidêmicas. O estudo de epidemias de casos febris não maláricos é de relevante importância para a vigilância epidemiológica de arboviroses menos conhecidas e por tanto com um diagnóstico clínico incorreto.

A RT-PCR é uma metodologia rápida, simples e eficiente na detecção e caracterização dos diferentes arbovírus em investigações epidemiológicas.

Para tanto, faz-se necessário o uso de *primers* adequados quanto à sensibilidade e a especificidade. Neste trabalho, para a identificação de vírus da dengue, inicialmente utilizou-se os *primers* selecionados por Lanciotti et al., (1992), porém foi encontrada uma grande dificuldade em obter *amplicons* para o sorotipo 1, dificuldade não observada na obtenção de *amplicons* dos outros sorotipos. Esses *primers*, entre outras metodologias de identificação do sorotipo do DENV como o método de restrição enzimática (DE PAULA, 2003), foram bastante úteis e adotados pelo laboratório para essa função.

A opção por *primers* universais para *Flavivirus*, *Alphavirus* e sorogrupo Simbú (Oropouche) foi eleita para tornar a identificação dos vírus mais eficientes. Os pares de *primers* Flavi1 e Flavi2 (FIGUEIREDO, et al., 1998) foram testados para diagnóstico preliminar de flaviviroses, tendo como base a identificação destas através do peso molecular do *amplicom* obtido após a corrida eletroforética. Assim, pode-se ter um resultado sugestivo com rapidez e economia de reagentes, sem a necessidade de realizar uma *nested-PCR*.

Outros dois pares de *primers* eleitos foram o FG1/FG2 e M2W/cMW3 (BRONZONI, 2005), que identificam *Flavivirus* e *Alphavirus* respectivamente. A vantagem desses *primers* é que podem ser utilizados como um *Multiplex-RT-PCR* ou separados, porém a identificação dos arbovírus ocorre apenas ao nível de gênero, necessitando de um *Hemi-nested-PCR* para identificação final do vírus. Os *primers* mostraram-se eficientes principalmente na identificação de sorotipos de dengue, superando os *primers* propostos por Lanciotti, et al., (1992).

A identificação do sorogrupo Simbú, ao qual pertence o vírus Oropouche também é realizada através de *Hemi-nested-PCR*, pois já

ocorreram epidemias desse vírus nas cidades de Jarú e Ouro Preto D'Oeste na década de 90.

A observação dos ciclos térmicos das RT-PCR e das Hemi-*nested*-PCR, mostrou uma pequena variação de temperatura, o que possibilitou incluir esses testes em um só programa no termociclador, evitando inserção indiscriminada de programas no aparelho, causando um congestionamento de programas que dificulta a procura do programa correto. Assim, com apenas dois programas é realizado a Hemi-*nested*-RT-PCR, o que facilita, além de tudo, o manuseio pelos técnicos.

A introdução de critérios de seleção dos pacientes com sintomas febris agudos, com suspeita de dengue, nos proporcionou a oportunidade de realizar a RT-PCR diretamente do soro de pacientes entre o primeiro e o terceiro dia de sintomas após a extração com o TRIzol e utilização do conjunto de *primers* para dengue. Com esse resultado, os testes para sorotipagem de DENV ou para identificação de outros arbovírus podem ser reduzidos de 15 dias para apenas um dia, eliminando os passos de inoculação em células C6/36 ou em cérebro de camundongos recém nascidos.

O seqüenciamento gênico das amostras de dengue sorotipo 1, 3 e Cacipacoré, isoladas no Laboratório de Virologia, confirmaram os dados obtidos pela Hemi-*nested*-RT-PCR e o alinhamento dessas seqüências, através do programa Clustal W, indicaram que os vírus isolados em Rondônia tiveram origem no país. Os DENV têm 98% de similaridade com outros vírus isolados no Brasil e o vírus Cacipacoré tem 91% de similaridade com a cepa Bean 4073. Como o Estado de Rondônia faz fronteira com a Bolívia e a

abertura da estrada de ligação com o Peru na cidade de Quinze de Novembro no Acre, torna-se importante à vigilância epidemiológico-molecular, pois o transporte vindo desse país, ou indo das regiões industrializadas do Brasil para esse país, obrigatoriamente passam pelo Estado de Rondônia. Assim para observar a origem de novos arbovírus que casualmente aparecerem, faz-se necessário o seqüenciamento gênico das amostras.

A experiência adquirida com essa tese permitiu a Unidade de Virologia estabelecer protocolos adequados para o isolamento e identificação viral. O uso de *primers* previamente confeccionados mostrou-se eficiente, mesmo no trabalho de campo, pois em sua maioria nunca foram testados com vírus isolados em células a partir do soro humano, ou até mesmo diretamente do soro humano. Assim, fica este trabalho, não só como material acadêmico, mas como um manual prático para ser usado na Unidade de Virologia. O apoio à vigilância epidemiológica, ao diagnóstico clínico não cessa com o final dessa tese e sim tem início, pois as técnicas estabelecidas aqui, cada vez serão mais apuradas dentro do Laboratório de Virologia. Também; a implantação do próprio laboratório foi necessária para a formação de virologistas na Amazônia Ocidental.

A utilização de tecnologias mais avançadas como o PCR em tempo real na identificação e caracterização, inicialmente do vírus da dengue, será o próximo passo para a identificação e caracterização mais rápidos desse vírus. Pretende-se ainda, elaborar novos *primers* para identificação de outras arboviroses.

A nova fronteira para o aumento no isolamento de vírus se dará no momento da construção do Laboratório de Segurança de Nível 3, onde poderemos ampliar os diagnósticos de arbovírus, incluindo a família *Arenaviridae*, os Hantavírus. Também no isolamento e diagnósticos de vírus de interesse econômico como o vírus da febre aftosa e raiva canina e humana, pois o estado ainda depende do diagnóstico feito por Instituições de outros estados.

CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

- Foi possível isolar, identificar e obter a seqüência nucleotídica dos vírus DENV-1 e DENV-3, assim como o CPCV.
- O DENV-2 foi apenas identificado através da *nested*-RT-PCR
- Padronizou-se a RT-PCR utilizando uma seleção de *primers* universais para Flavivírus, Alphavírus e Sorogrupo Simbu, usados na identificação dos principais arbovírus como os quatro sorotipos do DENV, YFV, MAYV e OROV, através da *Multiplex*-RT-PCR e *nested*-RT-PCR.
- Os *primers* específicos para identificação do vírus da dengue, em testes de *nested*-RT-PCR foram testados com sucesso, podendo ser utilizado na identificação desses vírus.
- A identificação do vírus da dengue pôde ser feita diretamente do soro do paciente, poupando tempo na divulgação do diagnóstico.
- O isolamento viral foi realizado para a manutenção da cepa viral e confirmar o resultado obtido através da RT-PCR do soro.
- Foi formada uma equipe, composta de um médico, um entomologista e um virologista para atuar na pesquisa de arbovírus nos municípios de Rondônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALEOTTI, F. G., MORELI, M. L., FIGUEIREDO L. T. M., 2003. Brazilian *Flavivirus* Phylogeny Based on NS5. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(3): 379-382, April.
- BARBOSA, M. L. 1996. Dengue: revisão. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.56, p.27-45,.
- BATISTA, W. C, KASHIMA, S., MARQUES, A. C., FIGUEIREDO, L. T. M., 2001
Phylogenetic analysis of Brazilian *Flavivirus* using nucleotide sequences of parts of NS5 gene and 3' non-coding regions. Virus Research 75, 35–42
- BRONZONI, R. V. M, BALEOTTI, F. G, NOGUEIRA, R. M. R; NUNES, M; FIGUEIREDO, L. T. M. 2005. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. J.Clin. Microbiol. p. 696–702 vol. 43, no. 2
- CALISHER, C. H.; KARABATSOS, N.; DALRYMPLE, J. M.; SHOP, R. E.; PORTIFIELD, J. S.; WESTAWAY, E. G.; BRET, W. E. Antigenic Relationships between Flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J. Gen. Virol, v.70, p.37-43, 1989.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C.S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression and replication. Ann. Rev. Microbiol, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHOMCZYNSKI, P. and SACCHI, N. Singer-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanati-phenol-chroform extraction. Anal. Biochem, 162:156-159, 1987.
- DE PAULA, S. O., PIRES NETO, R. J. CORREA, J. A., ASSUMPÇÃO, S. R., COSTA, M.L., LIMA, D.M. and FONSECA, B.A.L. 2002. The use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for the rapid detection and

identification of dengue virus in an endemic region. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 96: 266-269..

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; HERVÉ, I.-P.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; SÁ FILHO, G. C. & PINHEIRO, E. P., 1989. Modifications of arbovirus ecoepidemiology in Tucuruí, Pará, Brazilian Amazonia, related to the construction of a hydroelectric dam. In: Arbovirus Research in Australia. Proceedings of the 5th Symposium of the Queensland Institute of Medical Research (Queensland Institute of Medical Research, ed.), pp. 124-135, Brisbane: Queensland Institute of Medical Research.

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; HERVE, J.-P.; SÁ FILHO, G. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S. & RODRIGUES, S. G., 1992a. Modifications of arbovirus transmission in relation to construction of dams in Brazilian Amazonia. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, 44:124-135.

DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; SÁ FILHO, G. C. & TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S., 1992b. New Entomological and Virological Data on the Vectors of Sylvatic Yellow Fever in Brazil. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Sciences, 44: 136-142.

DEUBEL, V.; NOGUEIRA, R.M.R.; DROUET, M.T. 1993. Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 viruses. Arch. Virol. 129: 197-210.

- DEUBEL, V., M. HUERRE, G. CATHOMAS, M. T. DROUET, N. WUSCHER, B. LE-GUENNO, AND A. F. WIDMER. 1997. Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. *J. Med. Virol.* 53:212–217.
- DUNN EF, PRITLOVE DC, JIN H, ELLIOTT RM. 1995. Transcription of a recombinant bunyavirus RNA template by transiently expressed bunyavirus proteins. *Virology* 211:133-43.
- FELDMANN, H. 2000. Hantaviruses. In *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net>, Nature Publishing Group, London.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; BATISTA, W. C.; IGARASHI, A. Detection and identification of dengue virus isolates from Brazil by a simplified reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) method. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, n. 39, v. 2, março/abril, 79-83, 1997.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; BATISTA, W. C.; KASHIMA, S. and NASSAR, E. S. 1998. Identification of Brazilian Flaviviruses by a Simplified Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method Using Flavivirus Universal Primer. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v 59, n. 3, p 357-362,.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Os Arbovirus do Brasil. *Anais da Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III- Virologia, São Paulo, 16 de agosto de 1994, p. 45-58, 1994.*
- FIGUEIREDO, L.T.M. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *bunyaviridae* e *Rhabdoviridae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 23, n. 1, p. 13-18. 1990.

- FRANK, R. I.; FAUQUET, G.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification e nomenclature of viruses: Fifth report of the international Committee on Taxonomy of viruses. Arch Virology, suppl. 2, p. 223-233, 1991.
- GUBLER, D. J. Dengue. In MONATH, T.P. (ed.), Epidemiology of Arthropod-Borne Viral Disease, Vol II CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.1988. p.223-260.
- GUBLER, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev. Jul;11(3):480-96
- HACKER JK & HARDY JL. 1997. Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. Virology. 235:40-7.
- HAHN CS, HAHN YS, RICE CM, LEE E, DALGARNO L, STRAUSS EG, STRAUSS JH. 1987. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. J Mol Biol. Nov 5;198(1):33-41
- HENCHAL, E.A., MC COWN, J.M SEGUIN, M.K., GENTRY, M.K and BRANDT, W.E. Rapid identification of dengue viruses isolates by using monoclonal antibodies in indirect immunofluorescence assay. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 164-169, 1983.
- HENCHAL EA, POLO SL, VORNDAN V, YAEMSIRI C, INNIS B, HOKE CH. 1991 Sensitivity and specificity of a universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. Am J Trop Med Hyg. 45: 418–428
- HOWE, D. K., M. H. VODKIN, R. J. NOVAK, R. E. SHOPE, AND G. L. MCLAUGHLIN. 1992. Use of the polymerase chain reaction of the sensitive detection of St. Louis encephalitis viral RNA. J. Virol. Methods 36:101–110.

- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. 2000. Senso Populacional.
- IEC – INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, 1996. Relatório Quinquenal, 1991-1995. Belém: Instituto Evandro Chagas.
- IEC – INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, 1999. Annual Report: 1995-1998. Belém: Instituto Evandro Chagas.
- KARABATSOS N. 1985. International Catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 3th ed., American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio.
- KHROMYKH A. A.; KENNEY, M. T.; WESTAWAY, E. G. Trans-complementation of Flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kujin Virus replication-expressing BHK cells. J. Virol, v 72, no 9, p 7270-7279. 1998.
- KUNO, G., CHANG, G.-J.J., TSUCHIYA, K. R., N., CROOP, C.B., 1998. Phylogeny of the Genus Flavivirus. Journal of Virology. V. 72, pp. 73-83.
- LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G-W; VORNDAM, A.V. 1992. Rapid detection and typing of dengue virus from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J. Clinical Microbiology, Mar, p. 545-551.
- LÊ DUC, J. W. & PINHEIRO, F. P., 1988. Oropouche fever. In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology (T- R Monath, ed.), pp. 1-14, v. IV, Boca Ratón: CRC Press
- LINLEY, J. R.; HOCH, A. L. & PINHEIRO, F. R, 1983. Biting midges (Diptera: Caratopogonidae) and human health. Journal of Medical Entomology, 20:347-364.

- LOPEZ N, MULLER R, PREHAUD C, BOULOY M. 1995. The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol.* 69:3972-9.
- LUM L. C. S, LAM S. K, CHOY S, GEORGE R, HARUN F., 1996. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg*; 54: 256–59.
- MASON, P.W., MCADA, P.C. and MASON, T.L. 1987. Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins e the major nonstructural protein NS1. *Virology*, v. 161 p. 262-7.
- MARSH M, & HELENIUS A. 1980. Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J Mol Biol.* 142:439-54.
- MAXAM, A & GILBERT, W. A New Method for Sequencing DNA. 1977. *Proc Natl Acad Sci U S A.* February 1, vol. 74 no. 2. 560-564
- MERTZ GJ. 1997. Bunyaviridae: bunyaviruses, phleboviruses, nairoviruses, and hantaviruses. In: Richmann DD; Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology*, Churchill-Livingstone, New York, p. 943-972.
- MONATH, T. P. and HEINZ, F.X. Flaviviruses. In FIELDS, B. N., D. M. KINIPPE, P. M. (ed.), *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, Pa, 1996. Cap 31, p. 961-1034.
- MORELI, L. M.; AQUINO, V. H.; CRUZ, A. C. R.; FIGUEIREDO, L. T. M. 2002. Diagnosis of Oropouche Vírus Infection by RT-Nested-PCR. *Journal of Medical Virology.* 66: 139-142.
- MORITA, K.; MAEMOTO, T.; HONDA, S.; ONISHI, S.; MURATA, M.; IGARASHI, A. A rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase reaction chain. *J. Med. Virol*, v. 44, p.54-58, 1994.

- MONROY, A. M., T. W. SCOTT, AND B. A. WEBB. 1996. Evaluation of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the detection of Eastern equine encephalomyelitis virus during vector surveillance. *J. Med. Entomol.* 33:449–457.
- OBIJESKI JF, BISHOP DH, PALMER EL, MURPHY FA. 1976. Segmented genome and nucleocapsid of La Crosse virus. *J Virol.* 20:664-75.
- OBIJESKI JF, MURPHY FA. 1977. Bunyaviridae: recent biochemical developments. *J Gen Virol.* 37:1-14.
- OSATOMI, K. & SUMIYOSHI, H. 1990. Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*, v. 176, p. 643-7,
- OU J-H, STRAUSS EG, STRAUSS JH. The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses. *J Mol Biol* 1983;168:1–15.
- PETERS, C. J., SIMPSON, G. L., AND LEVY, H., 1999. Spectrum of hantavirus infection: Hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu. Rev. Med.* 50, 531:545.
- PFEFFER M, PROETZEL G, KINNEY RM. 1997. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*;57:709–718.
- PINHEIRO, F. P.; BENSABATH, G.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; FRAIHA, H.; MORAES, M. A. P.; GUEIROS, Z. M.; LINS, Z. C.
- & MENDES, R., 1977. Public health hazards among workers along the Trans-Amazon Highway. *Journal of Occupational Medicine*, 19:490-497.
- PINHEIRO, F. P. TRAVASSOS DA ROSA, A P A; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ISHAK, R.; FREITAS, R.B.; GOMES, M. L.; LE DUC, J.W. & OLIVA, O F.

- P., 1981a. Oropouche vírus. I. A Review Of Clinical, Epidemiological, and Ecological Findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 30: 149-160.
- PINHEIRO, F. P.; FREITAS, R. B.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.S.; GABBAY, Y. B.; MELLO, W. A. & LE DUC, J. W., 1981b. A Outbreak of Mayaro Vírus Disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and Virological Findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30:674-681.
- PINHEIRO, F. P. Situação das arboviroses na região amazônica. *International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers*, Belém. 1982. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 27-48..
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. & VASCONCELOS, P. F. C., 1994. Oropouche Fever. In: *CRC Handbook Series in Zoonoses; Section B. Viral Zoonose* (G. W. Beran, Ed.), pp. 214-217, Boca Raton: CRC Press.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. & VASCONCELOS, P. F. C., 1998. An Overview of Oropouche Fever Epidemics in Brazil and Neighbour Countries. In: *An Overview of Arbovirology in Brazil an Neighbouring Countries* (A. P. A. Travassos da Rosa, P. F. C. Vasconcelos & J. F. S. Travassos da Rosa, eds.), pp. 186-192, Belém: Instituto Evandro Chagas.
- PINHEIRO. F. P. & LÊ DUC, J.W., 1998. Mayaro Fever, In: *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* (T. P. Monath, ed.), v. III, pp. 137-150, Boca Raton: CRC Press.
- PLETNEV, A. G.; BRAY, M.; LAI, C.J. Chimeric tick-borne encephalitis e dengue 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J. Virol.*, v. 67,p. 4956-4963, 1993.

- PROUTSKI, V.; GOULD, E. A.; HOLMES, E. C. Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: similarities and differences. *Nucl. Acids Res.*, v. 25, n. 6, p. 1194-1202, 1997.
- RICE, C.M., LENCHES, E.M., EDDY, S. R., SHIN, S.J., SHEETS, R.L. and STRAUSS, J.H. 1985. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for Flavivirus gene expression and evolution. *Science*, Aug, v. 23; n. 229 (4715), p. 726-33.
- RICE, C. M.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. In: SCHLESINGER, S and SCHLESINGER, M., 1986. *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York: Plenum, p 279-327.
- RICO-HESSÉ, R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue type 1 and 2 in nature. *Virology*, 174: 479-493.
- RONKA, H, HILDEN, P, VON BONSDORFF, C. H., KUISMANEN, E. 1995. Homodimeric association of the spike glycoproteins G1 and G2 of Uukuniemi virus. *Virology*. 211:241-50.
- SÁNCHEZ-SECO, M. P.; ROSARIO, D.; DOMINGO, C.; HERNÁNDEZ, L.; VALDÉS, K.; GUZMÁN, M.G.; TENÓRIO, A. 2005. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *J. Virol. Methods*. Vol 126, pp 101–109.
- SANGER, S. NICKLEN, AND A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;74(12):5463-7.
- SEPLAN – SECRETARIA DE ESTADO DO PLANEJAMENTO DE RONDÔNIA. 1998. Diagnóstico Sócio-Econômico-Ecológico do Estado de Rondônia e

Assistência técnica para formulação da segunda aproximação do zoneamento sócio-econômico-ecológico do Estado de Rondônia. Relatório de sócio econômico.de Rondônia.

SCHMALJOHN, CS. 1996. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: Fields B; Knipe DM, Howley (eds). Fundamental Virology. Lipincott-Raven, Philadelphia, p. 649-673.

SCHMALJOHN CS & HJELLE B. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. Emerging Infectious Diseases 3: 95-104.

SCHMALJOHN, C. S, & LE DUC, J. W. 1998. Bunyaviridae. In Topley and Wilosn's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. (L. H. Collier, Ed.), pp. 601-628. Edward Arnold, London.

SCHMALJOHN, C. S., & NICHOL, S. T. 2001. Hantaviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 256, 1- 196.

SIMÕES DOS SANTOS, C. L., SALLUM, M. A. M., FRANCO, H. M., OSHIRO, F. M., ROCCO, I. M., 2006. Genetic characterization of St. Louis encephalitis vírus isolated form humam in São Paulo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Vol 101 (1): 57-63, February.

STRAUSS EG, STEC DS, SCHMALJOHN AL, et al. Identification of antigenically important domains in the glycoproteins of Sindbis virus by analysis of antibody escape variants. J Virol 1991;65:4654–4664)

SUDIRO, T. M.; ISHIRO, H.; GREEN, S.; VAUGHN, D. W.; NISALAK A.; KALAYANAROOJ, S.; ROTHMAN, A. L.; RAENGSAKULRACH, B.; JANUS, J.; KURANE I.; ENNIS, F. A. rapid diagnoses of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'noncoding region universal primers. Am. J. Trop. Med. Hyg, v. 56, n.4, p 424-429,1997.

- TANAKA, M. Rapid identification of Flavivirus using the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 41:311-322, 1993.
- TESH, R.B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 28: 1053-1059, 1979.
- THEILER, M.; SMITH, H.H. Effect of prolonged cultivation in vitro upon pathogenicity of yellow fever virus. *J. Exp. Med*, v. 65, p.767-786, 1937.
- TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; DÉGALUER, N. & VASCONCELOS, P. F. C., 1992b Caracterização e relacionamento antigênico de três novos Bunyavirus do grupo Anopheles A (Bunyaviridae) dos arbovirus- *Revista de Saúde Pública*, 26:173-178.
- VASCONCELOS PFC, TRAVASSOS DA ROSA JFS, GUERREIRO SC, DÉGALLIER N, TRAVASSOS DA ROSA ES, TRAVASSOS DA ROSA APA. 1989. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo* 31:271-278.
- VASCONCELOS, P .F. C.; ROSA, A.P.A.T.; DÉGALLIER, N.; Rosa, J. F. S. T., PINHEIRO, F. P. 1992. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science (Ciência e Cultura)*, v. 44, March/June, p. 117-124,.
- VASCONCELOS, P. F. C.; RODRIGUES, S. G.; DÉGALLIER, N.; MORAES, M. A. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; MONDET, B.; BARROS, V. L. R. S. & TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A., 1997. An epidemic of sylvatic yellow fever in the southeast region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57:132-137.

- VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS da ROSA, A.P.A.; PINHEIRO, F.P.; SHOPE, R.E., TRAVASSOS da ROSA, J.F.S.; RODRIGUES, S.G.; DÉGALLIER, N. TRAVASSOS DA ROSA, E.S. 1998. Arboviruses Pathogenic for Man in Brazil. 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. Instituto Evandro Chagas, Pará Belém, Brasil. 1º. Ed, pp 72-99
- VASCONCELOS, P.F.C, TRAVASSOS da ROSA, A.P.A; RODRIGUES, S.G.; TRAVASSOS da ROSA, E. S.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS da ROSA, J.F.S. 2001. Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro. 17 (suplemento): 155-164.
- VASCONCELOS, P. F. C., 1999a. Emergence of arboviruses in Brazilian Amazon region. *Vírus Review and Research*, 4:48-49
- VASCONCELOS, P. F. C.; BRYANT J. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TESH, R. B.; RODRIGUES, S. G.; and BARRETT, A. D. T. 2004. Genetic Divergence and Dispersal of Yellow Fever Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 10, No. 9
- WENGLER, G., Family Flaviviridae. In Francki Rib, ed. Classification and nomenclature of viruses – Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.*, v. 2, p.230-231, 1991.
- WHO (World Health Organization), 1985. Arthropod-Born and Rodent Viral Diseases. World Health Organization - Technical Report Series 719: 1-116 Geneva..

WOODALL, J. P., 1987. Virus Research in Amazonia. In: Atlas do Símpósio sobre a Biota Amazônica (Patologia) (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ), V. 6, pp 31. Rio de Janeiro: CNPQ.

QUESTIONÁRIO PARA PESQUISA DE DENGUE

Paciente n°. _____

Nome: _____

Idade: ____anos

Sexo: M () F ()

Etnia:

Procedência: _____

Naturalidade: _____

Tempo de vida em Rondônia: ____anos ____meses

Telefone: _____

Profissão: _____

Endereço: (Rua, Av, Trv): _____ n°:

_____ Bairro: _____ Entre Ruas:

Ponto de

Referência: _____

Faz uso de algum medicamento

() Sim Qual? _____

() Não

Tem febre?

() Sim Qual a temperatura? _____

() Não

Há quanto tempo demonstra esses sintomas?

() 1 a 4 dias () 5 a 7 dias () 8 a 15 dias () mais de 15 dias

Quais os sintomas?

() Cefaléia

() Gengivorrágia

() Dor ocular

() Epistaxe

() Mialgias

() Vômitos

() Artralgias

() Diarréia

() Calafrio

() Exantema

() Prurido

Qual o último episódio de Malária?

() abaixo de 1 mês () entre 1 e 3meses () acima de 6 meses

Qual? () *P. falciparum*() *P. vivax*() *P. malarie*

ANEXO II



UNIDADE LABORATORIAL DE
VIROLOGIA
BR 364/KM 4,5
CEP - 78900-970 CAIXA POSTAL 87
PORTO VELHO - RO

CEPEM
CENTRO DE PESQUISA
EM MEDICINA TROPICAL

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____
____ como paciente atendido pela equipe da Unidade de Virologia do
CEPEM/IPEPATRO e com suspeita de dengue, fui informado da justificativa,
objetivos e procedimentos que serão utilizados no trabalho de pesquisa intitulado
*“Identificação e Caracterização do Vírus da Dengue Circulante em Áreas Urbanas
e Peri-Urbanas do Estado de Rondônia”*. Meu nome e endereço serão mantidos
em absoluto sigilo, não divulgados sem minha prévia autorização, tanto em
publicações, quanto em outros trabalhos de pesquisa. Também, terei a liberdade de
me recusar a participar ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa
sem penalização e nem prejuízo ao meu cuidado.

Porto Velho, _____ de _____ de 200_

M.Sc. Weber Cheli Batista
Responsável pela Unidade de Virologia e
Pesquisador Responsável.

Assinatura do Paciente

TERMO DE COMPROMISSO

O paciente, abaixo assinado, foi informado verbalmente e por escrito, através do presente termo de compromisso, que será coletada uma amostra de seu sangue pelo Centro de Pesquisa em Medicina Tropical – CEPPEM em sua Unidade Laboratorial de Virologia, para o desenvolvimento do estudo denominado **“Estudos clínicos e laboratoriais sobre o dengue em pacientes da área de Porto Velho (Rondônia). Isolamento e caracterização molecular dos vírus do dengue”**. O sangue será processado e usado somente o soro, no qual será titulada a quantidade de anticorpos do tipo IgM e IgG pelo método do Micro ELISA e o vírus será tipado molecularmente pelo método da RT-PCR. Os resultados dos exames serão divulgados apenas para o paciente. De forma alguma serão revelados seu nome e endereço nesse ou em outros trabalhos. Também, o CEPPEM se compromete em fornecer todo o suporte clínico, laboratorial e hospitalar ao paciente afetado tanto pela febre do dengue, quanto pela DHF/DSS. Este suporte se constitui em tratamento sintomático para o pronto restabelecimento do paciente.

Porto Velho, _____ de _____ de 200__

M. Sc. Weber Cheli Batista

Responsável pela
Unidade Laboratorial de Virologia

Assinatura do Paciente



Polegar Direito