www.revistaft.com.br

Revista FT | ISSN 1678-0817 | v. 30, n. 164, 2026 | DOI: 10.69849/178x5955

# Divergências *in silico* nos sítios de anelamento de RT-qPCR do vírus da dengue e correção do conjunto afetado

*In silico* divergences at RT-qPCR annealing sites of dengue virus and correction of the affected primer-probe set

Ana Maria Nogueira Borges[1]
Carlos Eduardo Pimenta Dias[2]
Maria Bárbara de Holanda Cavalcante Ubaldo Monteiro e Barbosa[3]
Paulo Henrique da Silva Marques[4]
Matheus Martins Collicchio Daúde[5]

## Resumo

A dengue apresenta quatro sorotipos com ampla diversidade genética, e mutações nas regiões reconhecidas por *primers* e sondas podem comprometer a confiabilidade dos testes de RT-qPCR. Este estudo avaliou o impacto dessas divergências sobre os sítios de anelamento de um ensaio fourplex de RT-qPCR para detecção sorotipo-específica do DENV, publicado em 2005, e propôs um conjunto corrigido para o sorotipo mais afetado. Trata-se de estudo descritivo-analítico de abordagem *in silico*. Vinte e quatro genomas completos, seis por sorotipo, foram obtidos no NCBI e constituíram o painel principal, ampliado para 45 genomas de DENV-3 e 48 de DENV-2 nas análises detalhadas. Os doze oligonucleotídeos do ensaio foram localizados em cada genoma por alinhamento local

[1] Afya Faculdade de Porto Nacional – Porto Nacional – Tocantins – Brasil
[2] Afya Faculdade de Porto Nacional – Porto Nacional – Tocantins – Brasil
[3] Afya Faculdade de Porto Nacional – Porto Nacional – Tocantins – Brasil
[4] Afya Faculdade de Porto Nacional – Porto Nacional – Tocantins – Brasil
[5] Afya Faculdade de Porto Nacional – Porto Nacional – Tocantins – Brasil

nas duas fitas, com as coordenadas validadas contra as posições publicadas no protocolo original. Observaram-se divergências em todos os doze oligonucleotídeos. Sete eventos situaram-se nas cinco bases da extremidade 3′ de *primers*, distribuídos em DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sem ocorrência em DENV-1. O *primer* senso D3-F mostrou-se o componente mais comprometido, pois a substituição da posição 18, a duas bases da extremidade 3′, esteve presente em 45 dos 45 genomas de DENV-3 analisados, procedentes de diferentes países e períodos, de modo que o oligonucleotídeo publicado não apresenta pareamento perfeito em nenhum deles. O redesenho completo do conjunto de DENV-3 mostrou-se inviável. Das 10.707 posições do genoma, 8.268 (77,2%) são conservadas, mas apenas 23 trechos alcançam 18 nucleotídeos e somente três comportam oligonucleotídeo capaz de discriminar os demais sorotipos, separados entre si por milhares de bases. Na região 3′ não traduzida, os 25 conjuntos gerados apresentaram ao menos um componente idêntico a outro sorotipo. Optou-se, então, pela correção dos oligonucleotídeos existentes mediante introdução de bases degeneradas, o que elevou o pareamento perfeito de D3-F de nenhum para 44 dos 45 genomas. Conclui-se que conservação intra-sorotípica e especificidade de sorotipo competem pela mesma região do genoma e que o monitoramento dos sítios diagnósticos deve integrar a vigilância genômica de rotina.

**Palavras-Chave:** Dengue. Vírus da Dengue. Técnicas de Diagnóstico Molecular. Mutação. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

## Abstract

Dengue comprises four serotypes with wide genetic diversity, and mutations in the regions recognised by *primers* and probes may compromise the reliability of RT-qPCR assays. This study assessed the impact of such divergences on the annealing sites of a fourplex RT-qPCR assay for serotype-specific detection of DENV, published in 2005, and proposed a corrected set for the most affected serotype. This is a descriptive-analytical study with an *in silico* approach. Twenty-four complete genomes, six per serotype, were retrieved from NCBI and formed the main panel, expanded to 45 DENV-3 and 48 DENV-2 genomes for the detailed analyses. The twelve oligonucleotides of the assay were located in each genome by local alignment against both strands, with coordinates

validated against the positions published in the original protocol. Divergences were observed in all twelve oligonucleotides. Seven events fell within the five bases of the 3′ end of *primers*, distributed across DENV-2, DENV-3 and DENV-4, with none in DENV-1. The sense *primer* D3-F proved the most compromised component, since the substitution at position 18, two bases from the 3′ end, was present in 45 of the 45 DENV-3 genomes analysed, from different countries and collection periods, so that the published oligonucleotide shows perfect pairing in none of them. Complete redesign of the DENV-3 set proved unfeasible. Of the 10,707 genome positions, 8,268 (77.2%) are conserved, yet only 23 stretches reach 18 nucleotides and merely three can host an oligonucleotide able to discriminate the remaining serotypes, separated from one another by thousands of bases. In the 3′ untranslated region, all 25 sets generated contained at least one component identical to another serotype. Correction of the existing oligonucleotides through degenerate bases was therefore adopted, raising perfect pairing of D3-F from none to 44 of the 45 genomes. It is concluded that intra-serotypic conservation and serotype specificity compete for the same genomic region and that monitoring of diagnostic sites should be incorporated into routine genomic surveillance.
**Keywords:** Dengue. Dengue Virus. Molecular Diagnostic Techniques. Mutation. Real-Time Polymerase Chain Reaction.

## 1 Introdução

A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, e transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*. O DENV apresenta quatro sorotipos distintos, designados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e manifesta-se em geral como síndrome febril aguda (Costa; Façanha, 2011). A Organização Mundial da Saúde classifica a doença em dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave (OMS, 2009). Trata-se de infecção de rápida expansão, com estimativa de 100 a 400 milhões de novas infecções por ano (Kularatne; Dalugama, 2022), e permanece entre os principais desafios de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais (Gubler, 1997; World Health Organization, 2023).

A urbanização acelerada e a adaptação do *Aedes aegypti* aos ambientes urbanos intensificaram a circulação do vírus, e a incidência nas Américas cresceu de forma acentuada ao longo das últimas décadas (Murray; Quam; Wilder-Smith, 2013). No Brasil, a epidemia de 2024 foi a de maior magnitude já registrada no país (Gurgel-Gonçalves; Oliveira; Croda, 2024), com expansão espacial documentada para além das áreas historicamente mais afetadas (Souza *et al.*, 2024). Segundo o TABNET/DATASUS, em extração realizada em 18 de novembro de 2025, foram estimados 1.531.225 casos prováveis no país naquele ano, dos quais 1.916 no estado do Tocantins (Brasil, 2025). O impacto não se restringe ao número de casos. A presença de comorbidades eleva a mortalidade hospitalar por dengue no Brasil (Werneck *et al.*, 2018), e os custos diretos e indiretos da doença representam carga expressiva para os sistemas de saúde (Shepard *et al.*, 2016; Godói *et al.*, 2018), em um quadro de hospitalizações e óbitos crescentes ao longo da última década (Gonçalves *et al.*, 2025), o que mantém o controle da doença como prioridade de política pública (de Almeida *et al.*, 2024).

Nesse cenário, o diagnóstico precoce e específico orienta tanto o manejo clínico quanto às medidas de controle. Os testes rápidos baseados na detecção do antígeno NS1 são amplamente utilizados pela simplicidade de execução, mas apresentam sensibilidade variável conforme o dia de doença e o sorotipo envolvido, além de possibilidade de reatividade cruzada (Bisordi *et al.*, 2011; Ferraz *et al.*, 2013; de Souza; de Freitas; Correia Filho, 2024). Essa limitação tem consequência prática documentada, uma vez que proporção relevante de casos confirmados por outros métodos permanece negativa nos ensaios de NS1 (Acosta *et al.*, 2014). Abordagens sorológicas alternativas, como antígenos multiepítopo desenhados para reduzir reatividade cruzada, vêm sendo propostas (Pereira *et al.*, 2023), porém não substituem a detecção direta do genoma viral na fase aguda.

Os métodos moleculares despontam, assim, como alternativa mais robusta, aplicáveis a sangue e a outros fluidos biológicos (Ou *et al.*, 2020) e também a tecidos processados em parafina (Araújo *et al.*, 2024). Entre eles, a reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) é considerada o método de referência na fase aguda, por detectar diretamente o material genético viral e permitir a

identificação do sorotipo em uma única reação (Lura *et al.*, 2022). Em contextos de co-circulação de arbovírus, situação frequente no Brasil (de Jesus *et al.*, 2024), ensaios multiplex capazes de discriminar DENV, Zika e chikungunya tornaram-se ferramenta central da rede diagnóstica (Ribeiro *et al.*, 2021; Cuellar-Quimbaya *et al.*, 2024).

O desempenho da RT-qPCR depende da complementaridade entre os oligonucleotídeos e a sequência-alvo. Os *primers* são oligonucleotídeos curtos que delimitam a região a ser amplificada e servem de ponto de partida para a DNA polimerase, e, nos formatos com sonda de hidrólise, um terceiro oligonucleotídeo marcado confere detecção específica do amplicon. Mutações nas regiões reconhecidas por esses oligonucleotídeos reduzem a estabilidade do híbrido formado e podem gerar resultados falso-negativos, razão pela qual o desenho criterioso e o monitoramento das variantes circulantes são considerados requisitos do método (Bustin; Huggett, 2017; Nunes *et al.*, 2018). Falhas análogas, decorrentes de interferentes da amostra, já foram descritas no diagnóstico molecular de outros vírus respiratórios e reforçam a necessidade de controles adequados (Fruehwirth *et al.*, 2020).

Essa vulnerabilidade é particularmente relevante no caso do DENV. Os quatro sorotipos compartilham entre 60% e 75% de identidade na sequência de aminoácidos (Touret *et al.*, 2019) e, dentro de cada sorotipo, há ampla diversidade expressa em genótipos, com pelo menos cinco descritos em DENV-1, seis em DENV-2 e quatro em DENV-3 e DENV-4 (Silva; Richtmann, 2006; Anumanthan; Sahay; Mergia, 2025). Essa diversidade não é estática. Eventos de substituição de linhagem documentados no país alteraram a composição genética das populações virais circulantes em poucos anos (de Jesus *et al.*, 2020), e a vigilância genômica tem revelado a introdução e a circulação simultânea de genótipos distintos em diferentes estados brasileiros (Souza *et al.*, 2023; Jeronimo, 2025). Oligonucleotídeos desenhados a partir de cepas disponíveis há duas décadas podem, portanto, não refletir as sequências atualmente em circulação (Costa *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, o presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de ferramentas de bioinformática, as regiões-alvo do genoma do DENV reconhecidas pelos oligonucleotídeos de um ensaio de RT-qPCR sorotipo-específico de referência,

identificando divergências capazes de comprometer o anelamento, caracterizando sua posição e sua consequência prevista para a amplificação, e propondo oligonucleotídeos corrigidos para os conjuntos afetados.

## 2 Material e Métodos

### Desenho do estudo

Trata-se de estudo descritivo-analítico de abordagem *in silico* e caráter metodológico-comparativo, conduzido integralmente em ambiente computacional a partir de genomas completos do vírus da dengue (DENV) depositados em banco público. O estudo não envolveu coleta de material biológico, experimentação em seres humanos ou em animais, nem acesso a dados identificáveis.

### Obtenção e seleção dos genomas

As sequências foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), banco Nucleotide, por meio da interface programática E-utilities. Para cada sorotipo adotou-se como referência o genoma RefSeq correspondente: NC_001477.1 (DENV-1), NC_001474.2 (DENV-2), NC_001475.2 (DENV-3) e NC_002640.1 (DENV-4).

Constituíram-se dois painéis. O painel principal, destinado à caracterização comparativa dos quatro sorotipos, reuniu seis genomas por sorotipo, a referência e cinco isolados, selecionados de modo a cobrir origens geográficas e períodos distintos, com prioridade para isolados das Américas. O painel ampliado, destinado ao exame detalhado dos sorotipos em que o painel principal indicou divergência relevante, reuniu 48 genomas de DENV-3 e 48 de DENV-2, escolhidos com limite de seis genomas por país para evitar sobrerrepresentação de surtos individuais.

Foram incluídos genomas completos, com 10.000 a 11.000 nucleotídeos, portadores de metadados de país e data de coleta. Aplicou-se ainda critério de qualidade, com exclusão dos genomas que apresentassem mais de 5% de bases indeterminadas, por impedirem distinguir divergência real de ausência de informação. Esse critério removeu

seis genomas do painel ampliado de DENV-3. Acessos duplicados entre os painéis foram consolidados, e um genoma de DENV-3 cuja divergência em relação à referência atingiu 12,7%, contra mediana de 4,1% no restante do painel, foi excluído por suspeita de cepa *sylvatic* ou de classificação incorreta. Após a consolidação dos painéis e a aplicação desses critérios, as análises detalhadas basearam-se em 45 genomas de DENV-3, incluída a referência, e em 48 genomas de DENV-2.

A composição final dos painéis consta do Quadro 1.

**Quadro 1** - Composição dos painéis de genomas analisados.

| Painel | Sorotipo | Genomas analisados | Faixa de tamanho (nt) |
|---|---|---|---|
| Principal | DENV-1 | 6 | 10.607 – 10.776 |
| Principal | DENV-2 | 6 | 10.676 – 10.725 |
| Principal | DENV-3 | 6 | 10.707 |
| Principal | DENV-4 | 6 | 10.606 – 10.652 |
| Ampliado | DENV-2 | 48 | janela do gene C/prM |
| Ampliado | DENV-3 | 45 | 10.659 – 10.707 |

**Fonte:** Elaborado pelos autores a partir de dados do NCBI.

## Oligonucleotídeos avaliados

Avaliou-se o ensaio sorotipo-específico de RT-qPCR descrito por Johnson, Russell e Lanciotti (2005), composto por doze oligonucleotídeos: para cada sorotipo, um *primer* senso, um *primer* antissenso e uma sonda de hidrólise. As sequências foram transcritas da publicação original e conferidas, uma a uma, contra o texto do artigo depositado no *PubMed Central* (PMC1248506), procedimento que confirmou identidade integral das doze sequências e afastou erro de transcrição como explicação para as divergências posteriormente observadas.

O ensaio comercial CDC DENV-1-4 Real-Time RT-PCR, embora de uso corrente na rede pública, não pôde ser incluído, uma vez que seus oligonucleotídeos são fornecidos liofilizados e as sequências não são divulgadas, o que inviabiliza qualquer verificação independente de pareamento. Pela mesma razão foi excluído o ensaio baseado

em *molecular beacons* descrito por Waggoner *et al.* (2013). Os protocolos de Lanciotti *et al.* (1992) e sua variante degenerada TS1bis (Reynes *et al.*, 2003) não integraram a análise por se tratarem de RT-PCR convencional do tipo *nested*, fora do escopo deste estudo, embora sejam retomados na discussão.

**Quadro 2** - Oligonucleotídeos do ensaio sorotipo-específico de RT-qPCR avaliados neste estudo.

| Conjunto | Componente | Sequência (5′→3′) | Posição | Fluoróforo/quencher |
|---|---|---|---|---|
| DENV-1 | Primer senso | CAAAAGGAAGTCGTGCAATA | 8973 | — |
| DENV-1 | Sonda | CATGTGGTTGGGAGCACGC | 8998 | FAM/BHQ-1 |
| DENV-1 | Primer antissenso | CTGAGTGAATTCTCTCTACTGAACC | 9084 | — |
| DENV-2 | Primer senso | CAGGTTATGGCACTGTCACGAT | 1605 | — |
| DENV-2 | Sonda | CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA | 1008 | HEX/BHQ-1 |
| DENV-2 | Primer antissenso | CCATCTGCAGCAACACCATCTC | 1583 | — |
| DENV-3 | Primer senso | GGACTGGACACACGCACTCA | 740 | — |
| DENV-3 | Sonda | ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG | 762 | TR/BHQ-2 |
| DENV-3 | Primer antissenso | CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT | 813 | — |
| DENV-4 | Primer senso | TTGTCCTAATGATGCTGGTCG | 904 | — |
| DENV-4 | Sonda | TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG | 960 | Cy5/BHQ-3 |
| DENV-4 | Primer antissenso | TCCACCTGAGACTCCTTCCA | 992 | — |

**Fonte:** Johnson, Russell e Lanciotti (2005). A posição corresponde à base 5′ do oligonucleotídeo no genoma de referência do respectivo sorotipo, conforme o protocolo original. As posições informadas na fonte para o conjunto DENV-2 não são mutuamente compatíveis com um amplicon, razão pela qual a Tabela 1 apresenta as coordenadas obtidas neste trabalho.

## Localização dos sítios de anelamento

A localização de cada oligonucleotídeo em cada genoma foi feita por alinhamento local, no modo *infix*, entre a sequência do oligonucleotídeo e as duas fitas do genoma, com equivalências conforme o código IUPAC, de modo que base degenerada do oligonucleotídeo é compatível com qualquer base genômica contida em seu conjunto. Optou-se por essa estratégia, em lugar de alinhamento múltiplo, porque ela detecta

inserções e deleções de forma nativa, é robusta a genomas com extremidades incompletas e dispensa a suposição de colinearidade entre sequências de genótipos distintos. Para cada oligonucleotídeo reteve-se o melhor sítio, aceito apenas quando a distância de edição não excedeu um quinto do comprimento do oligonucleotídeo. Acima desse limite o alinhamento foi considerado ruído e o sítio, ausente.

Bases ambíguas do genoma foram excluídas das equivalências de alinhamento, providência necessária para impedir que trechos não sequenciados capturassem sítios falsos com distância nula. Em oligonucleotídeos antissenso, as bases observadas foram convertidas ao complemento reverso, de modo que todas as posições são relatadas na orientação 5′→3′ do próprio oligonucleotídeo.

Em extremidade livre do alinhamento, substituir ou suprimir uma base têm custo idêntico para o alinhador, que pode devolver lacuna onde há substituição. Como essa ambiguidade recai justamente sobre a extremidade 3′, onde se concentra o maior impacto funcional, ela foi resolvida sempre em favor da substituição, leitura conservadora que não cria deleção inexistente e preserva o sinal posicional.

## Classificação das divergências

Cada posição de cada oligonucleotídeo, em cada genoma, foi classificada em cinco categorias mutuamente exclusivas, a saber, pareamento correto, substituição, deleção, base ambígua e região não sequenciada. A distinção entre as três últimas é essencial e frequentemente negligenciada. Base ambígua não constitui divergência, e sim resultado inconclusivo. Lacuna terminal não constitui deleção, e sim ausência de dado, razão pela qual se calculou a cobertura efetiva de cada genoma e se marcou como não sequenciado tudo que recai fora dela. Deleções e substituições foram contabilizadas separadamente e, quando somadas, designadas diferenças, nunca *mismatches*.

Divergência presente em todos os genomas de um sorotipo não foi tratada como mutação de variante, e sim como característica do próprio oligonucleotídeo tal como publicado, sendo assinalada com duplo obelisco (‡) e excluída da contagem por genoma. Cumpre registrar que o critério de universalidade depende do tamanho do painel: posição

divergente em seis de seis genomas pode não sê-lo em painel maior, razão pela qual toda divergência classificada como universal no painel principal foi reexaminada no painel ampliado.

## Critério de criticidade

Atribuiu-se criticidade a cada evento segundo sua posição no oligonucleotídeo. Classificou-se como alta a divergência situada nas cinco bases da extremidade 3′ de um *primer*, região em que o pareamento condiciona o início da extensão pela DNA polimerase. Classificou-se como moderada a deleção em qualquer posição e a substituição no terço central de uma sonda, onde o efeito sobre a temperatura de desnaturação é maior. As demais posições foram classificadas como de criticidade baixa.

Esse critério é aplicado por evento e, por construção, subestima a carga acumulada: três substituições na porção 5′ de um *primer* são classificadas como baixa três vezes, embora, somadas, reduzam de modo apreciável a temperatura de desnaturação do híbrido. Por essa razão, relatou-se sempre, ao lado da criticidade, o número total de diferenças do oligonucleotídeo naquele genoma.

## Mapa de conservação e viabilidade de redesenho

Para avaliar a possibilidade de redesenho, construiu-se mapa de conservação do genoma de DENV-3 por alinhamento de cada genoma do painel contra a referência, com registro da composição de bases em cada posição. Adotou-se critério conservador, considerando-se conservada apenas a posição em que todos os genomas apresentam base idêntica, sem lacuna, sem base ambígua e dentro da cobertura efetiva. Bases ambíguas foram tratadas como dado ausente, e não como divergência, pois o tratamento oposto distorce o mapa e chega a anular trechos inteiros quando o painel contém genomas de menor qualidade.

A especificidade de sorotipo foi verificada confrontando-se cada sequência candidata com os genomas dos demais sorotipos, exigindo-se no mínimo quatro diferenças. Para medir a viabilidade de redesenho, percorreram-se todos os trechos

conservados de comprimento igual ou superior a 18 nucleotídeos e, em cada um, avaliaram-se todas as janelas de 20 nucleotídeos, retendo-se a de maior discriminação.

O desenho propriamente dito empregou o Primer3, com as regiões não conservadas declaradas simultaneamente como regiões excluídas para *primers* e para a sonda, uma vez que a primeira restrição, isolada, não protege a sonda. Admitiu-se conteúdo mínimo de guanina e citosina de 30%, dado que exigência de 35% inviabiliza o desenho em regiões virais ricas em adenina e timina, e sondas de até 32 nucleotídeos. A busca percorreu pisos decrescentes de temperatura de desnaturação da sonda, de 69 °C em diante, de modo a reter o maior valor viável.

## Correção dos oligonucleotídeos

Verificada a inviabilidade de conjunto inteiramente novo, procedeu-se à correção dos oligonucleotídeos existentes, estratégia já empregada por Reynes *et al.* (2003) ao proporem a variante TS1bis. A correção foi derivada dos próprios dados: cada posição recebeu a base majoritária do painel e, nas posições em que variante minoritária alcançou pelo menos 5% dos genomas, introduziu-se o código IUPAC degenerado correspondente. Os oligonucleotídeos resultantes foram então reavaliados, um a um, contra todo o painel de DENV-3 e contra os genomas dos demais sorotipos.

## Verificação de especificidade por alinhamento em banco de dados

A especificidade dos oligonucleotídeos corrigidos foi verificada em duas etapas complementares. Na primeira, submeteu-se o par de *primers* ao Primer-BLAST contra a coleção não redundante de nucleotídeos (nt), com os organismos restritos a *Flaviviridae* (taxid 11050), tamanho de produto entre 70 e 200 pares de bases e rigor de ao menos duas diferenças em relação a alvo não pretendido, sendo ao menos uma nas cinco bases da extremidade 3′. Como o Primer-BLAST não aceita bases degeneradas distintas de N, submeteu-se a variante majoritária do par corrigido, aquela formada pelas bases mais frequentes do painel em cada posição degenerada. Na segunda etapa, os três oligonucleotídeos corrigidos foram submetidos, já na forma degenerada, a BLASTN contra a mesma coleção, com palavra de sete nucleotídeos e valor esperado de 1.000,

parâmetros adequados a sequências curtas, restringindo-se a busca a *Flaviviridae* e excluindo-se DENV-3 (taxid 11069), de modo a recuperar qualquer alinhamento fora do sorotipo-alvo, inclusive os das variantes minoritárias.

## Reprodutibilidade

A análise foi implementada em Python. As rotinas de carregamento das sequências, localização dos oligonucleotídeos, classificação das divergências e anotação gênica foram reunidas em um único módulo, do qual derivaram todas as figuras e tabelas aqui apresentadas, de modo que nenhuma grandeza foi recalculada de forma independente em peças distintas do trabalho. Antes da aplicação aos genomas reais, as rotinas de localização e classificação foram validadas contra genomas sintéticos de controle, construídos com substituição em extremidade 3′, substituição em extremidade 5′, deleção interna, sítio em fita negativa, base ambígua, sítio ausente e lacuna terminal, verificando-se em todos os casos a classificação esperada. A anotação do genoma de referência foi obtida do registro RefSeq e validada contra a própria sequência quanto a comprimento múltiplo de três, códon de iniciação, códon de terminação, ausência de códon de terminação interno e manutenção do quadro de leitura em todos os peptídeos maduros. Os parâmetros empregados em cada etapa estão descritos nas seções anteriores e os números de acesso de todos os genomas analisados constam do Apêndice A, de modo que a análise pode ser reconstruída a partir das informações apresentadas neste artigo.

## Aspectos éticos

O estudo foi conduzido exclusivamente com genomas de domínio público, depositados em banco de dados internacional de acesso livre, sem qualquer intervenção em seres humanos ou em animais e sem acesso a informações que permitam identificação individual. Enquadra-se, portanto, entre as pesquisas que não são registradas nem avaliadas pelo sistema CEP/CONEP, conforme os incisos II e III do parágrafo único do art. 1º da Resolução nº 510, de 7 de abril de 2016, do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, 2016).

# 3 Resultados e Discussão

## Validação do mapeamento dos sítios de anelamento

Antes de qualquer análise de divergência, confrontaram-se as coordenadas obtidas computacionalmente com as posições informadas no protocolo original. As coordenadas reproduziram com exatidão os limites publicados. Em DENV-1, o *primer* senso inicia na posição 8.973 e o antissenso termina na 9.084. Em DENV-3, o senso inicia na 740 e o antissenso termina na 813. Em DENV-4, o senso inicia na 904 e o antissenso termina na 992. A concordância confirma a correção do mapeamento e autoriza as análises subsequentes (Tabela 1).

**Tabela 1** - Coordenadas dos sítios de anelamento obtidas nos genomas de referência, comparadas às posições publicadas por Johnson, Russell e Lanciotti (2005).

| Oligo | Tipo | Fita | Sítio obtido | Amplicon publicado |
|---|---|---|---|---|
| D1-F | Primer senso | + | 8.973 – 8.992 | 8.973 – 9.084 |
| D1-P | Sonda | + | 8.998 – 9.016 | 8.973 – 9.084 |
| D1-R | Primer antissenso | – | 9.060 – 9.084 | 8.973 – 9.084 |
| D2-F | Primer senso | + | 1.463 – 1.484 | 1.008 – 1.605 |
| D2-P | Sonda | + | 1.491 – 1.517 | 1.008 – 1.605 |
| D2-R | Primer antissenso | – | 1.519 – 1.540 | 1.008 – 1.605 |
| D3-F | Primer senso | + | 740 – 759 | 740 – 813 |
| D3-P | Sonda | + | 761 – 786 | 740 – 813 |
| D3-R | Primer antissenso | – | 788 – 813 | 740 – 813 |
| D4-F | Primer senso | + | 904 – 924 | 904 – 992 |
| D4-P | Sonda | – | 935 – 960 | 904 – 992 |
| D4-R | Primer antissenso | – | 973 – 992 | 904 – 992 |

**Fonte:** Dados da pesquisa.

## Panorama das divergências nos quatro sorotipos

A análise dos 24 genomas do painel principal revelou divergência em todos os doze oligonucleotídeos, com distribuição desigual entre sorotipos e entre componentes do ensaio (Figura 1). Nenhum sítio de anelamento esteve ausente, não se observou deleção em qualquer sítio e não houve base ambígua nos genomas desse painel, de modo que a totalidade dos eventos corresponde a substituições.

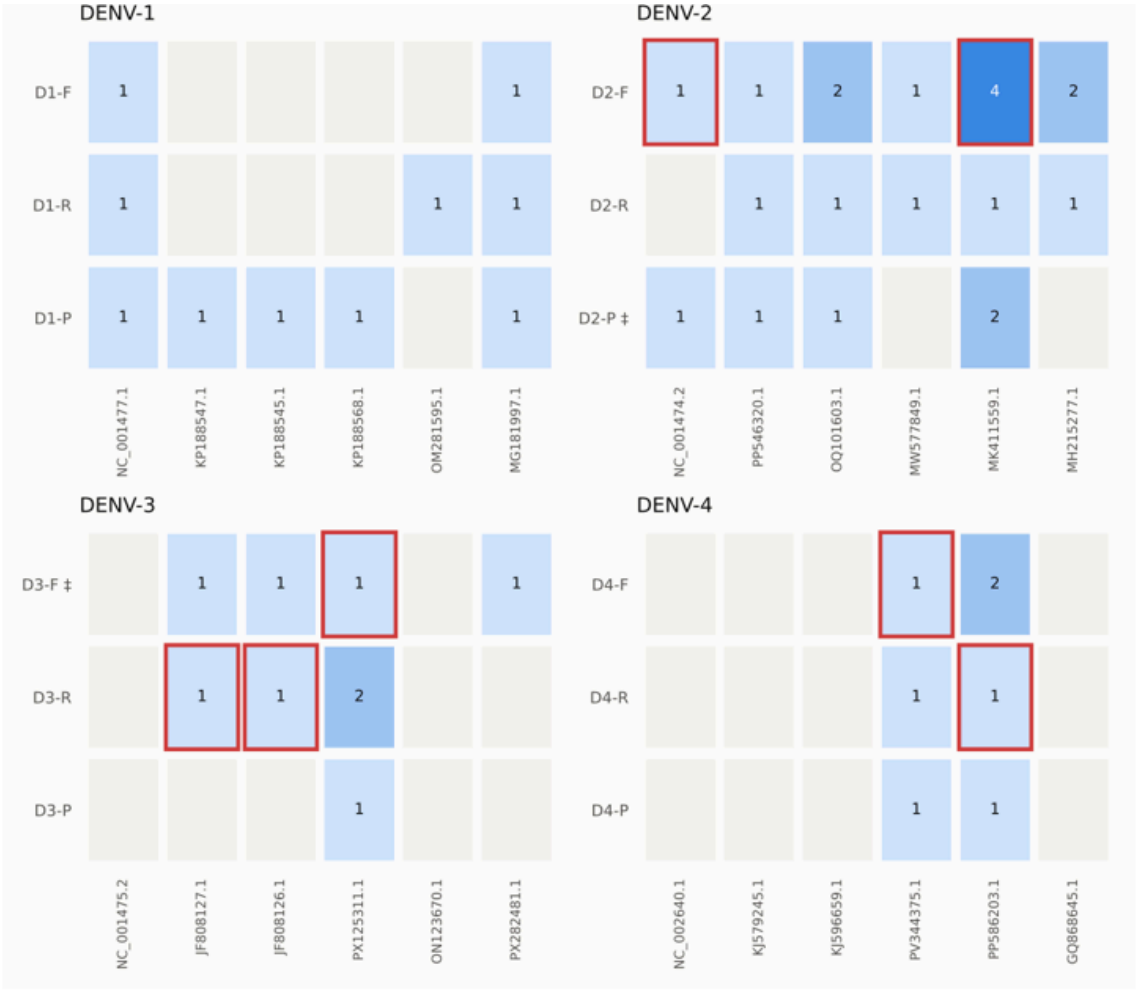



**Figura 1 - Diferenças nos sítios de anelamento do ensaio de Johnson, Russell e Lanciotti (2005) nos quatro sorotipos do DENV. Cada célula indica o número de diferenças, substituições ou deleções, entre um oligonucleotídeo e um genoma, e célula clara sem número indica ausência de diferença. O contorno vermelho assinala ao menos uma diferença nas cinco bases da extremidade 3′ de um *primer*, região em que o pareamento condiciona a extensão pela polimerase. O duplo obelisco (‡) junto ao nome do oligonucleotídeo indica divergência presente em todos os genomas daquele sorotipo, atribuível ao desenho do oligonucleotídeo e não a mutação de variante, e essas posições não integram a contagem das células.**

**Fonte:** Dados da pesquisa.

Sete eventos de criticidade alta foram identificados, isto é, substituições situadas nas cinco bases da extremidade 3′ de um *primer*. Esses eventos concentraram-se nos sorotipos DENV-2, DENV-3 e DENV-4, estando ausentes em DENV-1. Merece registro que dois isolados brasileiros de DENV-3, procedentes de Cuiabá e de Porto Velho, compartilham a mesma substituição na antepenúltima posição do *primer* antissenso D3-R, e que o isolado tailandês mais recente do painel, coletado em janeiro de 2024,

apresenta substituição equivalente no *primer* antissenso D4-R. A distribuição completa consta da Tabela 2.

**Tabela 2** - Diferenças por oligonucleotídeo no painel principal, em seis genomas por sorotipo.

| Oligo | Tipo | nt | Genomas com diferença | Eventos 3′ críticos | Divergência universal |
|---|---|---|---|---|---|
| D1-F | Senso | 20 | 2 / 6 | 0 | — |
| D1-R | Antissenso | 25 | 3 / 6 | 0 | — |
| D1-P | Sonda | 19 | 5 / 6 | 0 | — |
| D2-F | Senso | 22 | 6 / 6 | 2 | — |
| D2-R | Antissenso | 22 | 5 / 6 | 0 | — |
| D2-P | Sonda | 27 | 4 / 6 | 0 | posição 13 ‡ |
| D3-F | Senso | 20 | 4 / 6 | 1 | posição 18 ‡ |
| D3-R | Antissenso | 26 | 3 / 6 | 2 | — |
| D3-P | Sonda | 26 | 1 / 6 | 0 | — |
| D4-F | Senso | 21 | 2 / 6 | 1 | — |
| D4-R | Antissenso | 20 | 2 / 6 | 1 | — |
| D4-P | Sonda | 26 | 2 / 6 | 0 | — |

**Fonte:** Dados da pesquisa. ‡ divergência presente em todos os genomas do sorotipo, atribuível ao desenho do oligonucleotídeo e excluída da contagem por genoma.

## Divergência fixa no *primer* senso de DENV-3

Duas posições apresentaram divergência em todos os seis genomas do respectivo sorotipo no painel principal: a posição 13 da sonda D2-P e a posição 18 do *primer* senso D3-F. Ambas foram reexaminadas no painel ampliado, com desfechos opostos.

No *primer* D3-F, a divergência mostrou-se invariável. A timina da posição 18 corresponde a citosina em 45 dos 45 genomas de DENV-3 analisados, provenientes de diferentes países e períodos de coleta. A posição situa-se a duas bases da extremidade 3′, dentro, portanto, da região em que o pareamento condiciona a extensão pela polimerase. Soma-se a ela a posição 16, igualmente compreendida nas cinco bases terminais, que

diverge em 7 dos 45 genomas. O *primer* senso de DENV-3 reúne, assim, uma divergência fixa e uma variável, ambas na região de maior consequência funcional (Figura 2).

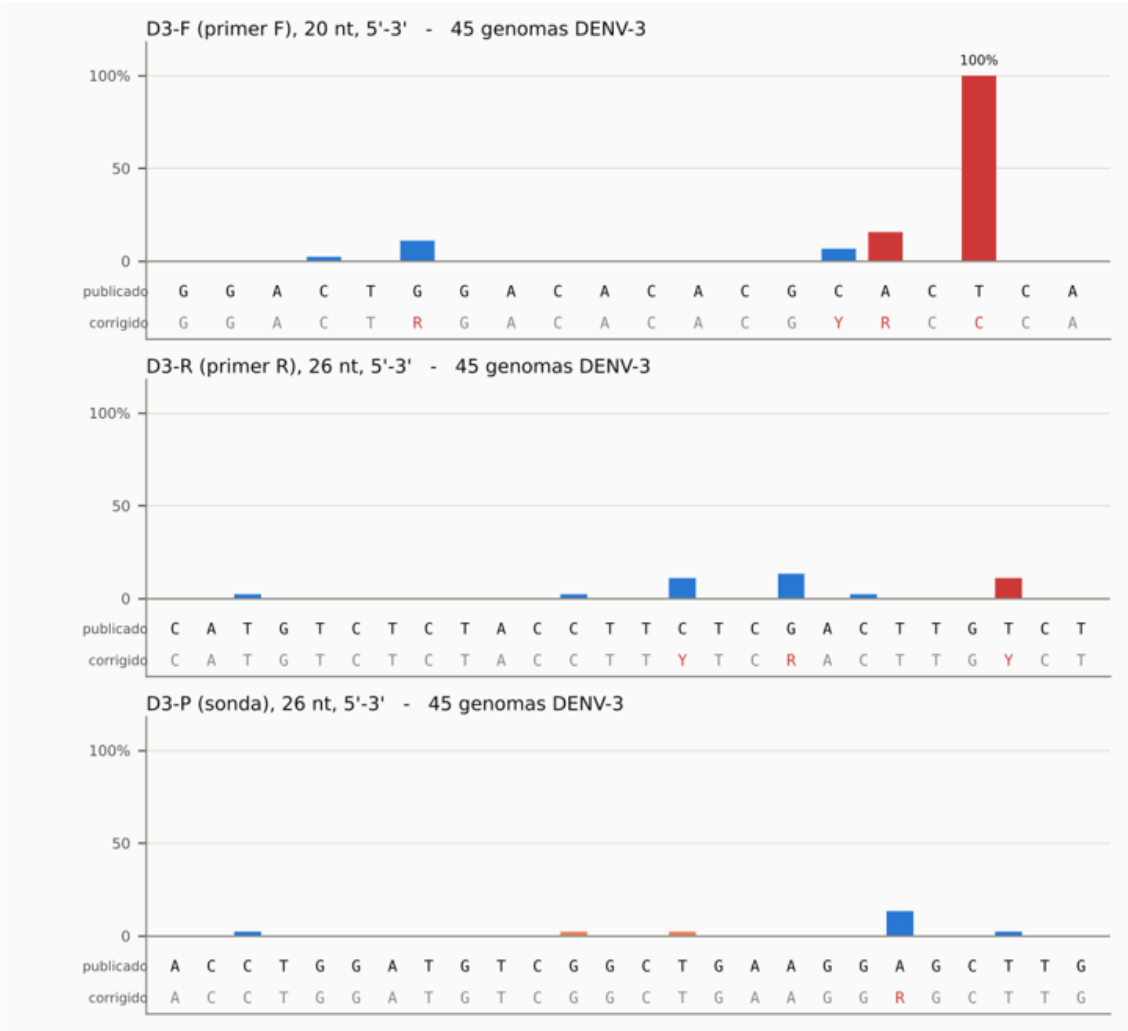



**Figura 2** - Divergência por posição nos oligonucleotídeos de DENV-3 e correção proposta, em 45 genomas. As barras indicam a proporção de genomas que divergem da base publicada em cada posição. O vermelho assinala posição situada nas cinco bases da extremidade 3′ de um *primer*, o laranja indica o terço central da sonda e o azul, as demais posições. Sob cada painel, a primeira linha reproduz a sequência publicada e a segunda, a sequência corrigida, com as bases alteradas em vermelho (R = A/G; Y = C/T).

**Fonte:** Dados da pesquisa.

Em consequência, o *primer* D3-F tal como publicado não apresenta pareamento perfeito em nenhum dos 45 genomas examinados. Os demais componentes do conjunto de DENV-3 mostraram-se menos comprometidos: o *primer* antissenso D3-R pareia integralmente em 32 dos 45 genomas e a sonda D3-P, em 35.

## Carga acumulada na sonda de DENV-2

A sonda D2-P seguiu trajetória distinta. A divergência da posição 13, universal nos seis genomas do painel principal, mostrou-se frequente, porém não invariável no painel ampliado, presente em 41 dos 48 genomas. O achado ilustra a dependência do critério de universalidade em relação ao tamanho do painel e justifica, retrospectivamente, a decisão de reexaminar no painel ampliado toda divergência assim classificada.

Mais relevante do ponto de vista diagnóstico é a concentração de divergências frequentes nessa única sonda: além da posição 13, observaram-se substituições nas posições 16, em 34 dos 48 genomas, e 7, em 16 dos 48. Trata-se precisamente da situação em que o critério posicional de criticidade subestima o efeito real, uma vez que avalia cada evento isoladamente, ao passo que o comprometimento da hibridização decorre da soma das divergências presentes em um mesmo genoma.

Nos *primers* de DENV-2, por sua vez, a divergência mais frequente localiza-se na posição 5 de ambos, em 47 dos 48 genomas no *primer* senso e em 45 dos 48 no antissenso, posição próxima à extremidade 5′, onde o efeito sobre a eficiência de amplificação é reduzido.

## Conservação e especificidade competem pela mesma região

A caracterização das divergências conduz naturalmente à questão do redesenho. Mapeou-se, para tanto, a conservação ao longo de todo o genoma de DENV-3, considerando-se conservada apenas a posição idêntica em todos os 45 genomas do painel. Satisfazem esse critério 8.268 das 10.707 posições, ou 77,2% do genoma. Os trechos conservados, contudo, são curtos e fragmentados, pois apenas 23 alcançam 18 nucleotídeos ou mais, extensão mínima para acomodar um oligonucleotídeo.

O exame desses 23 trechos revela o achado central deste estudo. Para cada um deles avaliou-se a maior discriminação alcançável por um oligonucleotídeo de 20 nucleotídeos, isto é, o número de diferenças em relação aos genomas dos demais sorotipos. Apenas três trechos permitem oligonucleotídeo que satisfaça o critério de

quatro diferenças, e eles se localizam nas posições 3.604, 7.421 e 10.540, separados por 3.797 e 3.091 nucleotídeos, distâncias que excedem em mais de uma ordem de grandeza o comprimento de um amplicon de RT-qPCR. Nas condições adotadas, portanto, não existe trio de trechos simultaneamente conservado, discriminante e mutuamente próximo o bastante para constituir um ensaio sorotipo-específico com sonda de hidrólise (Figura 3).

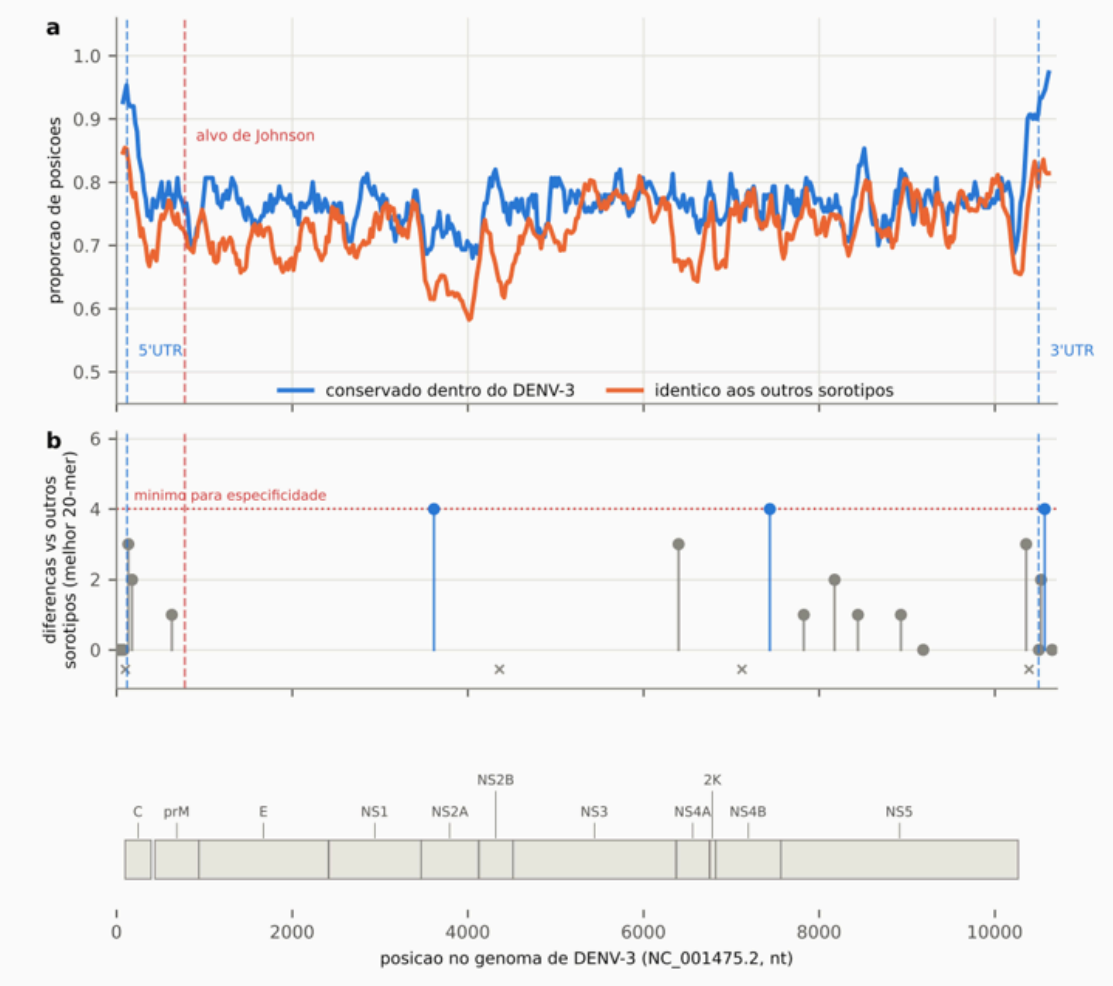



**Figura 3** - Conservação intra-sorotípica e identidade entre sorotipos ao longo do genoma de DENV-3. (a) Janela deslizante de 150 nucleotídeos sobre 45 genomas: proporção de posições idênticas em todos eles (azul) e proporção idêntica também aos genomas dos demais sorotipos (laranja). (b) Cada marca corresponde a um trecho conservado de 18 nucleotídeos ou mais, únicas posições em que um oligonucleotídeo pode ser alocado, e a altura indica a maior discriminação alcançável por um oligonucleotídeo de 20 nucleotídeos naquele trecho. Em azul, os trechos que satisfazem o critério de quatro diferenças, e o símbolo × assinala trecho curto demais para acomodar 20 nucleotídeos. Apenas três dos 23 trechos satisfazem o critério, e estão separados por milhares de nucleotídeos, distância incompatível com a formação de um amplicon.

**Fonte:** Dados da pesquisa.

As duas regiões mais conservadas do genoma ilustram o conflito de modo direto. A região 3′ não traduzida abriga o maior trecho conservado de todo o genoma, com 108 nucleotídeos ininterruptos, e a região 5′ não traduzida apresenta conservação igualmente elevada. Ambas, porém, são conservadas em razão de restrições estruturais comuns aos flavivírus, o que as torna semelhantes entre sorotipos. Dos 25 conjuntos completos que o Primer3 produziu na região 3′ não traduzida, a totalidade apresentou ao menos um componente com pareamento perfeito, isto é, zero diferenças, contra genoma de outro sorotipo. Nenhum conjunto novo foi, portanto, aprovado sob os critérios aqui adotados. Cabe ressalvar que esse resultado é condicionado à química escolhida, visto que Waggoner *et al.* (2013) obtiveram discriminação de sorotipo em ensaio dirigido à região 5′ não traduzida e ao gene do capsídeo empregando *molecular beacons*, cuja capacidade de distinguir pareamentos imperfeitos é superior à de sondas lineares de hidrólise.

Esse resultado oferece interpretação para a divergência fixa do *primer* D3-F. O alvo escolhido no protocolo original situa-se no gene do capsídeo, região que discrimina sorotipos mas apresenta conservação intra-sorotípica modesta. A divergência invariável do *primer* não configura, sob essa leitura, falha de desenho, e sim contrapartida inevitável da escolha de uma região discriminante. A distribuição completa consta da Tabela 3.

**Tabela 3** - Trechos conservados do genoma de DENV-3 com 18 nucleotídeos ou mais e discriminação máxima alcançável em cada um.

| Posição | Extensão (nt) | Diferenças vs. outros sorotipos | Apto |
|---|---|---|---|
| 14 – 36 | 23 | 0 | Não |
| 40 – 61 | 22 | 0 | Não |
| 66 – 85 | 20 | 0 | Não |
| 91 – 108 | 18 | curto para 20 nt | Não |
| 113 – 149 | 37 | 3 | Não |
| 151 – 197 | 47 | 2 | Não |
| 620 – 639 | 20 | 1 | Não |
| 3.604 – 3.624 | 21 | 4 | Sim |
| 4.350 – 4.368 | 19 | curto para 20 nt | Não |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6.383 – 6.408 | 26 | 3 | Não |
| 7.115 – 7.132 | 18 | curto para 20 nt | Não |
| 7.421 – 7.449 | 29 | 4 | Sim |
| 7.811 – 7.833 | 23 | 1 | Não |
| 8.165 – 8.184 | 20 | 2 | Não |
| 8.429 – 8.448 | 20 | 1 | Não |
| 8.918 – 8.940 | 23 | 1 | Não |
| 9.173 – 9.192 | 20 | 0 | Não |
| 10.335 – 10.378 | 44 | 3 | Não |
| 10.381 – 10.399 | 19 | curto para 20 nt | Não |
| 10.488 – 10.509 | 22 | 0 | Não |
| 10.517 – 10.537 | 21 | 2 | Não |
| 10.540 – 10.594 | 55 | 4 | Sim |
| 10.600 – 10.707 | 108 | 0 | Não |

**Fonte:** Dados da pesquisa. Critério de aptidão: pelo menos quatro diferenças em relação aos genomas dos demais sorotipos.

## Conjunto corrigido para DENV-3

Inviabilizado o conjunto inteiramente novo, procedeu-se à correção dos oligonucleotídeos existentes. A correção consistiu em substituir, em cada posição, a base publicada pela base majoritária observada no painel e, nas posições de variação relevante, introduzir código degenerado. O *primer* senso recebeu quatro alterações, entre elas a correção da posição 18, o *primer* antissenso recebeu três e a sonda, uma.

O ganho é expressivo no componente mais comprometido. O *primer* senso D3-F passa de pareamento perfeito em nenhum dos 45 genomas para pareamento perfeito em 44 deles. O *primer* antissenso passa de 32 para 43 genomas e a sonda, de 35 para 41 (Tabela 4).

**Tabela 4** - Conjunto corrigido para DENV-3 e desempenho comparado ao conjunto publicado, em 45 genomas.

| Oligo | Sequência (5′→3′) | Pareamento perfeito | Diferenças mínimas vs. outros sorotipos |
|---|---|---|---|
| D3-F publicado | GGACTGGACACACGCACTCA | 0 / 45 | — |
| D3-F corrigido | GGACTRGACACACGYRCCCA | 44 / 45 | 3 |
| D3-R publicado | CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT | 32 / 45 | — |
| D3-R corrigido | CATGTCTCTACCTTYTCRACTTGYCT | 43 / 45 | 4 |
| D3-P publicado | ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG | 35 / 45 | — |
| D3-P corrigido | ACCTGGATGTCGGCTGAAGGRGCTTG | 41 / 45 | 4 |

**Fonte:** Dados da pesquisa. Códigos IUPAC: R = A/G e Y = C/T.

A verificação de especificidade identificou um ponto que não deve ser omitido. O *primer* senso corrigido mantém apenas três diferenças em relação ao genoma de referência de DENV-1, nenhuma delas situada nas cinco bases da extremidade 3′. A especificidade do conjunto completo apoia-se, nesse caso, na sonda e no *primer* antissenso, ambos com quatro diferenças, e a combinação requer confirmação experimental em bancada.

A verificação por alinhamento em banco de dados confirmou a especificidade do conjunto corrigido. O Primer-BLAST recuperou produtos previstos em 1.000 sequências de *Flaviviridae*, todas de DENV-3, e não retornou qualquer produto em molde não pretendido. O BLASTN dos três oligonucleotídeos em forma degenerada, com DENV-3 excluído da busca, produziu alinhamentos significativos restritos a dois grupos de registros. O primeiro reúne sequências depositadas sob o táxon genérico Dengue virus (taxid 12637) que trazem, em seus próprios metadados, a qualificação de sorotipo 3, a exemplo de KY586754.1. O segundo compreende dois registros da mesma origem, ON115026.1 e ON127551.1, anotados como DENV-1 e provenientes de Bangladesh, cujo trecho correspondente às posições 723 a 768 reproduz integralmente a região-alvo de DENV-3, incluindo a sequência exata da sonda, o que é incompatível com o sorotipo

declarado. Em ambos os casos, portanto, os alinhamentos recuperados decorrem da anotação taxonômica dos registros, e não de reatividade cruzada entre sorotipos.

Esse episódio ilustra uma limitação pouco discutida da avaliação *in silico* de especificidade. A exclusão de um sorotipo por identificador taxonômico pressupõe que a anotação dos registros esteja correta, pressuposto que o próprio resultado desmente. Avaliações desse tipo devem, portanto, inspecionar os alinhamentos recuperados em vez de confiar apenas na contagem de acertos fora do alvo.

Registre-se, por fim, que a degeneração introduzida tem custo próprio: com quatro posições degeneradas, o *primer* senso corrigido corresponde a uma mistura de dezesseis sequências distintas, o que reduz a concentração efetiva de cada variante e pode exigir ajuste da concentração total, além de cálculo da temperatura de desnaturação por variante no momento da síntese.

## Interpretação dos achados e implicações

O confronto dos doze oligonucleotídeos do ensaio de Johnson, Russell e Lanciotti (2005) com genomas atuais dos quatro sorotipos revelou divergências em todos os componentes. A leitura desse resultado exige recuperar o contexto em que o ensaio foi construído. Os autores validaram cada conjunto contra um painel de sete a dez isolados representativos por sorotipo, conjunto necessariamente limitado às sequências disponíveis em 2005. O que aqui se observa não é falha de execução daquele trabalho, e sim o efeito acumulado de duas décadas de evolução viral sobre sítios definidos a partir de uma amostra restrita.

Sete eventos atingiram as cinco bases da extremidade 3′ dos *primers*, região em que o pareamento condiciona o início da extensão pela polimerase, e ocorreram em DENV-2, DENV-3 e DENV-4. O número de genomas analisados não autoriza estimativas de prevalência nas populações virais circulantes, mas a ocorrência de alterações equivalentes em isolados de origens e períodos distintos indica que tais divergências não se restringem a linhagens isoladas. Essa dinâmica é documentada no Brasil, onde a substituição de linhagem de DENV-2 descrita por de Jesus *et al.* (2020) alterou em

poucos anos a composição genética das populações circulantes, e onde a vigilância genômica têm identificado a introdução independente de genótipos distintos em diferentes estados, incluindo o Tocantins (Souza *et al.*, 2023).

A divergência mais consistente ocorreu em D3-F, cuja posição 18 apresentou substituição em todos os 45 genomas de DENV-3 examinados. Por manter-se invariável no painel e situar-se a duas bases da extremidade 3′, essa alteração é mais bem interpretada como característica do próprio oligonucleotídeo tal como publicado do que como marca de uma variante específica. Um segundo aspecto merece atenção. O critério posicional de criticidade avalia cada evento isoladamente e, por construção, subestima a carga acumulada, situação exemplificada pela sonda D2-P, que reúne três divergências frequentes no mesmo sítio. O comprometimento da hibridização decorre da soma das divergências presentes em um mesmo genoma, e não do evento isolado de maior criticidade.

A tentativa de redesenho expôs uma restrição de natureza estrutural. As regiões suficientemente conservadas dentro do DENV-3 para acomodar um oligonucleotídeo são poucas, e as mais conservadas de todas, as regiões não traduzidas, devem essa conservação a restrições comuns aos flavivírus, o que as torna igualmente semelhantes entre sorotipos. Conservação intra-sorotípica e capacidade de discriminar sorotipos competem, portanto, pela mesma porção do genoma. Sob essa leitura, a divergência fixa de D3-F deixa de ser anomalia e passa a ser contrapartida previsível da escolha de um alvo discriminante no gene do capsídeo. A restrição, contudo, é relativa às condições adotadas neste trabalho, e não uma propriedade absoluta do genoma, conforme já discutido a propósito dos resultados da região 3′ não traduzida. Estratégias que ampliam a tolerância a variação, como os *primers* degenerados desenhados por Fraenkel *et al.* (2024) sobre sequências globalmente representativas do gene do envelope, oferecem caminho alternativo ao redesenho integral.

Diante dessa restrição, a correção dos oligonucleotídeos existentes mostrou-se a estratégia mais produtiva. Ela preserva a região amplificada pelo protocolo original, o que permite comparabilidade com séries históricas, e recupera o pareamento na quase

totalidade do painel. A abordagem tem precedente consolidado, uma vez que Reynes *et al.* (2003) corrigiram por degeneração o *primer* de tipagem TS1 de Lanciotti *et al.* (1992) após identificarem variantes de DENV-1 não detectadas, e Fraenkel *et al.* (2024) adotaram princípio equivalente ao desenhar *primers* degenerados para o gene do envelope dos quatro sorotipos. A degeneração, porém, não é gratuita. Com quatro posições degeneradas, o *primer* senso corrigido corresponde a uma mistura de dezesseis sequências, o que reduz a concentração efetiva de cada variante e exige ajuste da concentração total e cálculo da temperatura de desnaturação por variante no momento da síntese.

Cabe situar o alcance prático desses achados. O ensaio aqui analisado não é o único em uso, e a rede pública brasileira emprega ensaio multiplex próprio, avaliado com desempenho analítico e clínico adequado para discriminar DENV, Zika e chikungunya (Ribeiro *et al.*, 2021). As sequências desse e de outros ensaios comerciais não são divulgadas, o que impede verificação independente como a conduzida neste trabalho e constitui, por si, limitação relevante para a vigilância da qualidade diagnóstica. O que os resultados sustentam é que a comparação periódica entre os oligonucleotídeos em uso e as sequências efetivamente circulantes é exequível com ferramentas computacionais de acesso livre e deveria integrar a vigilância genômica de rotina, como já apontado para o cenário brasileiro por Jeronimo (2025).

## Limitações do estudo

Os achados devem ser interpretados à luz de quatro limitações. A abordagem é integralmente computacional e prevê o comportamento esperado do híbrido oligonucleotídeo-molde sem medi-lo, de modo que as divergências identificadas não foram relacionadas de forma direta à sensibilidade, à eficiência de amplificação ou ao limite de detecção, parâmetros que exigem ensaio laboratorial. A verificação de especificidade por alinhamento em banco de dados restringiu-se a *Flaviviridae*, não tendo abrangido o transcriptoma humano nem outros agentes causadores de síndrome febril aguda. Os painéis foram montados a partir de depósitos públicos, que não constituem amostra aleatória da diversidade circulante, razão pela qual as proporções relatadas

descrevem os genomas examinados e não estimam frequências populacionais, ressalva especialmente pertinente para DENV-1 e DENV-4, representados por seis genomas cada. Por fim, a correção proposta foi derivada e avaliada no mesmo conjunto de genomas, o que tende a superestimar seu desempenho e torna indispensável a validação em painel independente e em bancada antes de qualquer emprego de diagnóstico.

## 4 Conclusão

A análise *in silico* do ensaio de RT-qPCR descrito por Johnson, Russell e Lanciotti (2005) mostrou que os doze oligonucleotídeos apresentam divergências em relação aos genomas de DENV atualmente disponíveis. O DENV-3 foi o sorotipo mais afetado, e o *primer* senso D3-F não apresentou pareamento perfeito em nenhum dos 45 genomas avaliados. A validação das coordenadas contra as posições publicadas e a conferência das sequências contra o artigo original afastaram erro de transcrição ou de localização como explicação. Sete eventos atingiram as cinco bases da extremidade 3′ dos *primers*, em DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sem ocorrência em DENV-1.

A substituição invariável na posição 18 de D3-F indica característica do próprio oligonucleotídeo, e não efeito de variante específica. A tentativa de redesenho mostrou que conservação intra-sorotípica e especificidade de sorotipo competem pela mesma porção do genoma, de modo que a escolha original de um alvo discriminante no gene do capsídeo implicava, desde o início, conservação intra-sorotípica modesta. A correção dos oligonucleotídeos existentes por meio de bases degeneradas elevou o pareamento perfeito de D3-F de nenhum para 44 dos 45 genomas, preservando a região amplificada pelo protocolo original.

Os conjuntos corrigidos constituem resultado *in silico* e requerem validação laboratorial antes de qualquer emprego diagnóstico, com determinação de eficiência de amplificação, limite de detecção e especificidade analítica. Em conjunto, os achados sustentam que a conservação global do genoma do DENV não assegura a integridade dos sítios efetivamente utilizados no diagnóstico molecular e que a comparação periódica entre os oligonucleotídeos em uso e as sequências circulantes deve integrar a vigilância genômica de rotina, e não ser conduzida apenas em resposta a falhas já observadas.

## Referências


ACOSTA, Pablo O. A. et al. False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 Ag kits. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 447-450, 2014.

ANUMANTHAN, Govindaraj; SAHAY, Bikash; MERGIA, Ayalew. Current dengue virus vaccine developments and future directions. Viruses, v. 17, n. 2, p. 212, 2025.

ARAÚJO, L. J. T. de et al. Monitoramento laboratorial da dengue através de tecidos parafinizados por RT-qPCR. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 83, p. e40602, 2024.

BISORDI, Ivani et al. Evaluation of dengue NS1 antigen detection for diagnosis in public health laboratories, São Paulo State, 2009. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, p. 315–320, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. TABNET: Sistema de Informações em Saúde. Brasília, DF, 2025. Disponível em: https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/. Acesso em: 18 nov. 2025.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 510, de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 maio 2016. **TABNET: Sistema de Informações em Saúde**. Brasília, 2025.

BUSTIN, Stephen; HUGGETT, Jim. qPCR primer design revisited. Biomolecular Detection and Quantification, v. 14, p. 19-28, 2017.

COSTA, Cristóvão Alves da; FAÇANHA, Grecilane Palheta. Sorotipos virais de dengue identificados em crianças de Manaus, Estado do Amazonas, 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 249–251, 2011.

COSTA, Dacylla Sampaio et al. A importância da utilização de técnicas moleculares no diagnóstico laboratorial de Dengue virus: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e271101220261, 2021.

CUELLAR-QUIMBAYA, Andrés F. et al. Quantitative detection of chikungunya, Zika, and dengue viruses by one-step real-time PCR in different cell substrates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1083–1090, 2024

DE ALMEIDA, Bárbara Luiza Cearence Caetano et al. Desafios e estratégias no combate à dengue no Brasil: uma análise da saúde pública e da resposta integrada. **Studies in Health Sciences**, v. 5, n. 3, p. e6170, 2024.

DE JESUS, Augusto César Parreiras et al. Retrospective epidemiologic and genomic surveillance of arboviruses in 2023 in Brazil reveals high co-circulation of chikungunya and dengue viruses. **BMC Medicine**, v. 22, n. 1, p. 546, 2024.

DE JESUS, Jaqueline Goes et al. Genomic detection of a virus lineage replacement event of dengue virus serotype 2 in Brazil, 2019. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e190423, 2020.

DE SOUZA, João Victor Gaia Aguiar; DE FREITAS, Felipe Lopes; CORREIA FILHO, Éverton Chaves. Análise dos possíveis vieses de confundimento dos testes diagnósticos para COVID-19 e dengue: uma revisão bibliográfica de literatura. **RECIMA21 – Revista Científica Multidisciplinar**, v. 5, n. 5, p. e555177, 2024.

FERRAZ, Fernanda Oliveira et al. Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 58, n. 1, p. 41–46, 2013.

FRAENKEL, Stefania et al. The development of new primer sets for the amplification and sequencing of the envelope gene of all dengue virus serotypes. **Microorganisms**,

TOURET, Franck et al. Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery. Antiviral Research, v. 168, p. 109-113, 2019.

WAGGONER, Jesse J. et al. Single-reaction, multiplex, real-time RT-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 4, p. e2116, 2013.

v. 12, n. 6, p. 1092, 2024.

FRUEHWIRTH, Marcelo et al. Resultado falso negativo no diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 em amostras com inibidores de amplificação. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. e3582020, 2020.

GODÓI, Isabella Piassi et al. Economic and epidemiological impact of dengue illness over 16 years from a public health system perspective in Brazil to inform future health policies including the adoption of a dengue vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 12, p. 1123–1133, 2018.

GONÇALVES, Ananda Ingrid et al. Dengue in Brazil: an ecological study of burden, hospitalizations, and mortality trends (2019–2024). **Discover Public Health**, v. 22, n. 1, p. 317, 2025.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (eds.). **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. New York: CAB International, p. 1–22, 1997.

GURGEL-GONÇALVES, Rodrigo; OLIVEIRA, Wanderson Kleber de; CRODA, Julio. The greatest dengue epidemic in Brazil: surveillance, prevention, and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 57, p. e00203-2024, 2024.

JERONIMO, Pedro Miguel Carneiro. Monitoramento da evolução viral e aprimoramento de estratégias de sequenciamento para o vírus da dengue no Brasil. 2025. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2025.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977-4983, 2005.

KULARATNE, Senanayake Abeysinghe; DALUGAMA, Chamara. Dengue infection: global importance, immunopathology and management. **Clinical Medicine**, v. 22, n. 1, p. 9–13, 2022.

LANCIOTTI, R. S. *et al*. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LURA, Taylor et al. A validated triplex RT-qPCR protocol to simultaneously detect chikungunya, dengue and Zika viruses in mosquitoes. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 59, n. 3, p. 198–205, 2022.

MURRAY, Natasha Evelyn Anne; QUAM, Mikkel B.; WILDER-SMITH, Annelies. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, p. 299–309, 2013.

NUNES, Allan R. D. et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e170393, 2018.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Diretrizes de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle da dengue**. Genebra, 2009.

OU, Tey Putita et al. Improved detection of dengue and Zika viruses using multiplex RT-qPCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 282, p. 113862, 2020.

PEREIRA, Samuel Santos et al. Multi-epitope antigen for specific serological detection of dengue viruses. **Viruses**, v. 15, n. 9, p. 1936, 2023.

REYNES, J. M. *et al*. Improved molecular detection of dengue virus serotype 1 variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3864-3867, 2003.

RIBEIRO, Marisa O. et al. Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, dengue and

chikungunya viruses in blood. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101542, 2021.

SHEPARD, Donald S. et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 935–941, 2016.

SILVA, Luiz Jacintho da; RICHTMANN, Rosana. Vacinas em desenvolvimento: estreptococo do grupo B, herpes-zóster, HIV, malária e dengue. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. S115–S124, 2006.

SOUZA, Carlos Dornels Freire de et al. Space-time dynamics of the dengue epidemic in Brazil, 2024: an insight for decision making. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1056, 2024

SOUZA, Ueric José Borges de et al. Circulation of dengue virus serotype 1 genotype V and dengue virus serotype 2 genotype III in Tocantins state, Northern Brazil, 2021–2022. **Viruses**, v. 15, n. 11, p. 2136, 2023.

WERNECK, Guilherme L. et al. Comorbidities increase in-hospital mortality in dengue patients in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, p. e180082, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue – global situation. **WHO**, 2023. Disponível em: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON498.