

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Departamento de Microbiologia

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Mestrado Profissional

Bruna Regina Diniz Souza

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO
SIMULTÂNEO PARA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EMPREGANDO A
METODOLOGIA DE RT-PCR EM TEMPO REAL COM A UTILIZAÇÃO DE
SONDAS FLUOROGÊNICAS**

Belo Horizonte

2022

BRUNA REGINA DINIZ SOUZA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO
SIMULTÂNEO PARA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EMPREGANDO A
METODOLOGIA DE RT-PCR EM TEMPO REAL COM A UTILIZAÇÃO DE
SONDAS FLUOROGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte

2022

043

Souza, Bruna Regina Diniz.

Desenvolvimento e validação de um sistema de detecção simultâneo para Dengue, Zika e Chikungunya empregando a metodologia de RT-PCR em tempo real com a utilização de sondas fluorogênicas [manuscrito] / Bruna Regina Diniz Souza. – 2022.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Dengue. 3. Infecção por Zika virus. 4. Febre de Chikungunya. 5. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 6. Aedes. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado Profissional de
BRUNA REGINA DINIZ SOUZA

Nº REGISTRO 2018715610

Às 09 horas do dia 01 de agosto de 2022, reuniu-se, de forma virtual, na plataforma TEAMS, a Comissão Examinadora composta pela Dra. Livia Maria Silva Ataíde, University of Florida – EUA, Dr. Alex Fiorinni de Carvalho, Centro de Tecnologia em Vacinas da UFMG e o prof. Flávio Guimarães da Fonseca, orientador do Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada, para julgar o trabalho final, “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM SISTEMA DE DETECÇÃO SIMULTÂNEO PARA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EMPREGANDO A METODOLOGIA DE RT-PCR EM TEMPO REAL COM A UTILIZAÇÃO DE SONDAS FLUOROGÊNICAS” da candidata, BRUNA REGINA DINIZ SOUZA, requisito final para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Curso, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Em seguida, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata, e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 01 de agosto de 2022.

Dra. Livia Maria Silva Ataíde

Dr. Alex Fiorini de Carvalho

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador)

Prof. Erna Geessien Kroon
Coordenadora



Documento assinado eletronicamente por Flávio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior, em 02/08/2022, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 02/08/2022, às 10:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por Alex Fiorini de Carvalho, Usuário Externo, em

AGRADECIMENTOS

Aqui agradeço a todos que foram diretamente responsáveis pelo apoio e assistência ao longo desses anos de trabalho.

A professora Erna Kroon, que tratou com carinho imenso e preocupação sincera todas as minhas questões. Por ter consciência de que não é possível colocar em poucas linhas o tamanho da minha gratidão, deixo aqui, pelo menos, a tentativa.

A Márcia Nepomuceno, que sempre disponibilizou sua ajuda e prontamente resolveu minhas incontáveis demandas. Muito obrigada pela paciência!

Ao meu orientador, Flavio Guimarães, uma das pessoas mais generosas, brilhantes e inspiradoras que tive a honra de conhecer. Lembrarei com enorme carinho de todas as vezes que fui surpreendida pela sua leveza, tratando minhas aflições e dúvidas com tamanha gentileza.

Ao Victor Maia, que certamente é a personificação de lealdade e companheirismo. Obrigada por tantas contribuições ao longo desses anos, esse trabalho tem muito de você. Torço para que o privilégio da convivência diária seja estendido por vários anos, afinal de contas, desconheço quem consiga trazer tanta alegria aos meus dias.

A Ecovec, que financiou este projeto e deu todo o suporte necessário para sua realização. Aos amigos que fiz pelo caminho, muito obrigada!

A Paula, a outra bióloga da família, que divide as dores e alegrias da profissão e é quem segura a barra quando tudo parece estar perdido.

Ao Bruno, pela fonte inesgotável de carinho e força, sorriso sincero e o melhor abraço do mundo.

Ao Vinícius, que sempre foi e sempre será a minha referência acadêmica, intelectual e profissional.

Ao Renan, que possui a inexplicável capacidade de trazer calma aos meus dias.

Ao Depentor, que é o melhor amigo que alguém pode ter.

Ao Igor, que a cada encontro me relembra o quanto é bom estarmos juntos.

Ao Caio, que não mede esforços para me ver feliz.

Aos amigos, os melhores amigos do mundo, que sempre me direcionam palavras de apoio e compreensão. Se existe sensação melhor que a de estar rodeada de pessoas incríveis assim, desconheço.

E, obviamente:

A minha família, que mesmo dividida entre Brasil e Inglaterra, vibra genuinamente por cada conquista. Decerto é de onde vem a força, os valores e os princípios. Pouca coisa realmente importa nessa vida, e uma delas é a integridade. A outra é o amor.

RESUMO

As arboviroses são consideradas uma séria ameaça à saúde pública em diversas partes do mundo, pois muitas são doenças graves aos seres humanos, como a dengue, zika e chikungunya, capazes de causar encefalites, dores persistentes nas articulações, febres hemorrágicas e estarem associadas a doenças neurológicas. Muitas doenças têm avançado a diferentes regiões onde sua circulação ainda não havia sido previamente documentada, causando novos surtos. Um importante vetor das arboviroses é o mosquito *Aedes aegypti*, que vem, ao longo dos anos, sendo encontrado em regiões não apenas tropicais, além de estar completamente adaptado ao ambiente urbano. O vírus dengue e o vírus zika pertencem ao gênero Flavivírus. O dengue vírus se distingue em quatro sorotipos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. O vírus chikungunya, que causa uma doença de mesmo nome, pertence ao gênero Alphavírus. No Brasil e em países em desenvolvimento, tais doenças são consideradas graves problemas de saúde pública e vêm se tornando um enorme desafio para os sistemas de saúde. A alta demanda de testes enviados aos laboratórios centrais e os métodos de detecção, por vezes laboriosos, criam um evidente obstáculo para confirmação de casos no país. A Ecovec, empresa brasileira e *spin-off* da Universidade Federal de Minas Gerais, com foco em saúde pública e com a intenção de preencher a lacuna da ineficiência de geração de dados para a tomada de decisão de gestores públicos, criou um sistema integrado de monitoramento do *Aedes*, que disponibiliza índices semanais de infestação do vetor e circulação viral, direcionando ações de combate ao mosquito, a fim de evitar epidemias. O presente trabalho propôs desenvolver um ensaio único para dengue, zika e chikungunya a partir do uso de sondas fluorogênicas para rt-PCR em tempo real, e que fosse capaz de detectar tais vírus em *Aedes aegypti* para implementá-lo na rotina das análises da Ecovec. A primeira fase do estudo, desenhada para padronizar reações *singleplex* em amostras controle, apresentou resultados satisfatórios, com limites de detecção de 1 UFP nos ensaios para detecção de DENV e 10 UFP para os ensaios de ZIKV e CHIKV. Análises em triplicata mostraram eficiência da reação acima de 97% para todos os ensaios. Foi verificada ausência de reação cruzada das sondas e iniciadores e foi possível avaliar a especificidade dos ensaios quando submetidas a testes utilizando-se controles de vírus febre amarela e

vírus mayaro. 30 amostras de campo contendo *Aedes aegypti* coletados em campo foram utilizados para a fase de validação dos ensaios, e todas apresentaram amplificação. RpL32 foi usado como controle endógeno da reação. Foram montadas 3 reações *biplex* com objetivo de detectar dois alvos em um único ensaio. Todas as reações apresentaram curvas de amplificação nos controles positivos da reação, mas não foi possível observar amplificação em amostras de campo. Conclui-se que mais testes se fazem necessários para permitir a detecção de 3 alvos em uma única reação, mas a padronização e validação *singleplex* já possibilitou a substituição da técnica de detecção no laboratório, anteriormente realizada por agentes intercalantes e hoje com uso de sondas fluorogênicas, com geração de resultados mais confiáveis e de maior qualidade, além de diminuição do tempo para entrega de resultados.

Palavras-chave: Dengue, zika, chikungunya. PCR em tempo real. *Aedes aegypti*. Ecovec. *Multiplex*

ABSTRACT

Arboviruses are considered a serious threat to public health in several parts of the world as many of them are serious diseases to human beings, such as dengue, zika and chikungunya. Those are capable to cause encephalitis, persistent joint pain, hemorrhagic fevers and being linked to neurological diseases. Many diseases have advanced to different regions where their circulation had not been previously documented, causing new outbreaks. An important vector of arboviruses is the *Aedes aegypti*, which has, over the years, been found in regions not only tropical, in addition to being completely adapted to the urban environment. Dengue virus and Zika virus belong to the Flavivirus genus and have four distinct antigenic types (DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4). Chikungunya virus, which cause the illness of the same name, belongs to Alphavirus genus. In Brazil and developing countries those diseases have been considered a serious public health problem and have become a huge challenge for health care systems. High demand for tests sent to central state laboratory and laborious detection methods create a huge obstruction to confirm positive cases. Ecovec is a Brazilian company and spin-off from Federal University of Minas Gerais, focused on public healthy and has the intention to fill the inefficient gap in generate data for decision-making by public managers. It has created and integrated monitoring systems of *Aedes* that provides weekly rates of vector infestation and viral circulation, pointing actions to combat the mosquito to avoid epidemics. The present work proposed to develop a unique assay for dengue, zika and chikungunya using fluorogenic probes for rt-PCR, capable to detect virus in *Aedes Aegypti* and implement it in the Ecovec routine analysis. The first part of the study, designed to standardize singleplex reactions in control samples, showed satisfactory results with detection limits of 1 PFU in DENV assays and 10 PFU for the ZIKV and CHIKV assays. Triplicate analyses has shown reaction efficiency above 97% for all assays. It was verified the absence of cross-reaction of the probes and primers and it was possible to evaluate the specificity of the assays when submitted to tests using controls of yellow fever virus and mayaro virus. 30 field samples containing *Aedes_aegypti* collected in the field were used for the validation phase and all showed amplifications. RpL32 was used as an internal control. Three biplex reactions were setup to detect two targets in a single assay. All reactions have shown amplification curves in the positive controls, but it was not possible to observe amplification in the field samples. It is concluded that more

tests are necessary to allow the detection of 3 targets in a single reaction but the standardization and singleplex validation has already made it possible to replace detection technique in our lab, which was previously performed by intercalating agents and nowadays the use of fluorogenic probes generate more reliable and and higher quality reducing the results delivery time.

Keywords: Dengue, zika, chikungunya. Real time PCR. *Aedes aegypti*. Ecovec. Multiplex.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grau celsius

ACE: Agentes de combate a endemias

BA: Bahia

CHIKV: Chikungunya virus

Cq: Cycle quantification

DENV: Dengue vírus

DENV1: Dengue vírus sorotipo 1

DENV2: Dengue vírus sorotipo 2

DENV3: Dengue vírus sorotipo 3

DENV4: Dengue vírus sorotipo 4

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: *Enzyme-linked Immuno sorbent assay*

ES: Espírito Santo

G: Força g

g: Gramas

Km²: Quilômetros quadrados

LirAa: Levantamento de Índice Rápido para *Aedes aegypti*

MAYV: Mayaro vírus

MI-Aedes: Monitoramento Integrado do Aedes

MI-Vírus: Monitoramento Inteligente do Vírus

mL: Mililitros

MS: Ministério da Saúde

nm: Nanômetros

OPAS: Organização Pan Americana da Saúde

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

PI: Propriedade intelectual

PNCD: Programa Nacional de Combate à Dengue

qRT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: Ácido ribonucleico

Rpm: Rotações por minuto

RS: Rio grande do Sul

SE: Semana epidemiológica

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SP: São Paulo

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFP: Unidade formadora de placa

μ L: Microlitros

WHO: Organização Mundial de Saúde

YFV: Vírus febre amarela

ZIKV: Zika vírus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Micrografia eletrônica da secção central de uma partícula esférica de DENV.....	21
Figura 2: Estrutura e expressão do genoma do DENV.....	22
Figura 3: Replicação viral do vírus da DENV.....	26
Figura 4: Desenho esquemático do <i>Aedes aegypti</i> com suas principais estruturas.....	37
Figura 5: Representação do ciclo biológico do <i>Aedes aegypti</i>	38
Figura 6. Etapas do Monitoramento Integrado do Aedes.....	41
Figura 7: Armadilha Mosquitrap® utilizada no estudo.....	50
Figura 8: Municípios brasileiros escolhidos para fase de validação em campo.....	51
Figura 9: Disposição das 916 armadilhas Mosquitrap® no município de Araraquara, SP.....	52
Figura 10: Disposição das 910 armadilhas Mosquitrap® no município de Porto Alegre, RS.....	53
Figura 11: Parte das armadilhas instaladas em Santos, SP.....	54
Figura 12: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 1.....	63
Figura 13: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 2.....	64
Figura 14: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 3.....	65
Figura 15: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 4.....	66
Figura 16: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus zika.....	67
Figura 17: Perfil linear da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus chikungunya.....	68
Figura 18: Perfil logarítmico da curva de amplificação de amostras de campo previamente testadas e positivas para dengue vírus.....	73
Figura 19: Perfil logarítmico da curva de amplificação a de amostra de campo previamente testada e positivas para zika vírus.....	74

Figura 20: Perfil logarítmico da curva de amplificação a de amostras de campo previamente testadas e positivas para chikungunya vírus.....	75
Figura 21: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR <i>duplex</i> para dengue e chikungunya vírus.....	76
Figura 22: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR <i>duplex</i> para dengue e zika vírus.....	78
Figura 23: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR <i>duplex</i> para zika e chikungunya vírus.....	79
Figura 24: Etapas do funcionamento do Monitoramento Integrado do Aedes.....	82

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV1 com utilização de 5 pontos em triplicata.....63
- Gráfico 2:** Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV2 com utilização de 6 pontos em triplicata.....64
- Gráfico 3:** Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV3 com utilização de 5 pontos em triplicata.....65
- Gráfico 4:** Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV4 com utilização de 5 pontos em triplicata.....66
- Gráfico 5:** Curva padrão de eficiência para detecção de vírus zika a partir de RT-qPCR.....67
- Gráfico 6:** Curva padrão de eficiência para detecção de vírus chikungunya a partir de RT-qPCR.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vírus utilizados como controles positivos.....	47
Tabela 2 – Amostras de campo selecionadas para validação dos ensaios.....	48
Tabela 3 – Sondas e iniciadores utilizados para detecção dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV.....	57
Tabela 4 – Reação duplex para detecção de DENV e CHIKV.....	61
Tabela 5 – Reação duplex para detecção de DENV e ZIKV.....	61
Tabela 6 – Reação duplex para detecção de ZIKV e CHIKV.....	61
Tabela 7 – Amostras de campo utilizadas para validação dos ensaios duplex.....	62
Tabela 8 – Valores gerados para curvas de eficiência das reações padronizadas.....	63
Tabela 9 – Médias dos valores de Cq obtidos através das análises de RT-qPCR para cada ensaio.....	70
Tabela 10 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de DENV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados.....	70
Tabela 11 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de CHIKV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados.....	71
Tabela 12 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de ZIKV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados.....	71
Tabela 13 – Cq obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de DENV em amostras de campo.....	73
Tabela 14 – Cq obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de ZIKV em amostra de campo.....	74
Tabela 15 – Cqs obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de CHIKV em amostras de campo.....	75
Tabela 16 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de DENV e CHIKV em amostras controle.....	77
Tabela 17 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de DENV e ZIKV em amostras controle.....	78
Tabela 18 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de ZIKV e CHIKV em amostras controle.....	79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
1 DENGUE	21
1.1 Histórico e epidemiologia	21
1.2 Características do vírus e estrutura do genoma	23
1.2.1 Proteínas estruturais	24
1.2.2 Proteínas não estruturais	25
1.3 Ciclo de replicação viral.....	26
1.4 Manifestações clínicas	28
1.5 Diagnóstico.....	28
2 ZIKA	29
2.1 Histórico e epidemiologia	29
2.2 Característica do vírus	30
2.3 Manifestações clínicas	30
2.3.1 Manifestações adversas.....	31
2.4 Diagnóstico.....	31
3 CHIKUNGUNYA.....	33
3.1 Histórico e epidemiologia	33
3.2 Característica do vírus	33
3.3 Manifestações clínicas	34
3.4 Diagnóstico.....	34
4 DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS METODOLOGIAS	35
4.1 ELISA	35
4.2 PCR.....	35
5 CICLO DAS ARBOVIROSES	36
5.1 O mosquito <i>Aedes</i>	36
5.2 Principais criadouros	38
5.3 Ciclo de vida.....	38
5.4 Ciclo de transmissão	39
6 A ECOVEC.....	39
6.1 O Monitoramento Integrado do <i>Aedes</i> (MI-AEDES®)	40
6.2 O Monitoramento Integrado do Vírus (MI- VÍRUS®)	42
JUSTIFICATIVA	42
MATERIAIS E MÉTODOS.....	47

7 Amostras	47
7.1 Amostras de vírus padrão	47
7.2 Vetores coletados em campo	47
7.3 MiAedes® como provedor das amostras de campo	49
7.3.1 Coletas em armadilhas Mosquitrap®	49
7.3.2 Coleta de dados e amostras, armazenamento, método de preservação e envio	49
7.4 Cidades contempladas no estudo para validação da técnica em <i>Aedes aegypti</i> capturados em campo	50
7.4.1 Araraquara	51
7.4.2 Porto Alegre	52
7.4.3 Santos	53
7.4.4 Bom Jesus do Norte, Cachoeiro de Itapemirim, Piúma e Vila Velha	54
7.5 Padronização da técnica de RT-qPCR em amostras controle	55
7.5.1 Amostra controle	55
7.5.2 Extração de RNA viral	55
7.6 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)	56
7.6.1 Sondas e iniciadores utilizados no estudo	56
7.6.2 Detecção e identificação viral (RT-qPCR)	57
7.6.3 Interpretação de resultados	58
7.6.4 Validação dos ensaios	58
7.7 Validação dos ensaios em amostras de campo	59
7.8 Testes de especificidade	60
7.9 RT-qPCR <i>duplex</i>	60
7.9.1 Padronização do ensaio em amostras controle	60
7.9.2 Validação RT-qPCR em amostras de campo	61
RESULTADOS	62
8 Padronização dos ensaios em amostras controle	62
8.1 Dengue vírus sorotipo 1	62
8.2 Dengue vírus sorotipo 2	63
8.3 Dengue vírus sorotipo 3	64
8.4 Dengue vírus sorotipo 4	65
8.5 Zika vírus	66
8.6 Chikungunya vírus	67
9 Limite de detecção	68
10 Avaliação de reação cruzada e análise de especificidade dos ensaios padronizados	69

11 Validação dos ensaios padronizados em amostras controle utilizando amostras de <i>Aedes aegypti</i>	71
11.1 Amostras de campo positivas para dengue vírus.....	71
11.2 Amostras de campo positivas para zika vírus.....	73
11.3 Amostras de campo positivas para chikungunya vírus.....	74
12 Reação duplex em amostras controle.....	75
12.1 Detecção dengue e chikungunya vírus.....	75
12.2 Detecção de dengue e zika vírus.....	76
12.3 Detecção de zika vírus e chikungunya vírus.....	78
13 Reação duplex em amostra de campo.....	79
DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	87

INTRODUÇÃO

As arboviroses, termo que deriva do inglês *arthropod-borne viruses*, são doenças transmitidas através da picada de um artrópode infectado. Durante as últimas décadas, a emergência de alguns arbovírus alterou a percepção de sua importância na Saúde Pública, graças à letalidade e/ou a morbidade que elas causam mundialmente (Gluber et al, 1995). A rápida dispersão do mosquito transmissor, juntamente à sua plasticidade, resulta em novas áreas de distribuição dos vírus, ocasionando, assim, possíveis novos vetores e novas manifestações clínicas, tanto em seres humanos quanto em animais (Cunha, 2018).

O esperado aumento da população mundial, resultando na maior mobilidade de migrações humanas, o desordenado processo de urbanização, as mudanças climáticas e a diminuição dos investimentos em infraestrutura, somados à fragmentação e extinção dos habitats para exploração desenfreada de recursos, resultou na aproximação do vetor com os seres humanos, o que contribuiu para o avanço das epidemias por arbovírus, com maior destaque para aqueles transmitidos pelos mosquitos do gênero *Aedes* (Cunha, 2018).

Com a finalidade de frear a evolução das doenças ocasionadas por mosquitos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) criaram, em conjunto, o Plano de ação sobre entomologia e controle de vetores, com o objetivo de fortalecer a capacidade regional e nacional de prevenção e controle dos principais vetores, a fim de reduzir a propagação das doenças. (Organização Pan Americana de Saúde, 2018)

Há décadas, a dengue constitui um enorme desafio de saúde pública no Brasil e no mundo, agravado por sua expansão geográfica, aumento do número e magnitude de epidemias, além de suas manifestações clínicas graves levando a milhares de óbitos anualmente. A este desafio, que por si só justificaria o empenho de recurso e esforços globais na tentativa de controle de vetores, sobreveio a emergência recente de duas outras arboviroses de particular importância: a zika e a febre chikungunya. Sua

introdução e disseminação pelas Américas levou-as a alcançarem uma escala epidêmica inédita (Ministério da Saúde, 2019).

A febre chikungunya teve sua importância para a saúde pública determinada em meados dos anos 2000, quando foram constatadas diversas epidemias na Ásia e em ilhas do Oceano Índico. Observou-se que as manifestações reumatológicas associadas à enfermidade ocasionam nos acometidos pela doença uma drástica redução na qualidade de vida e está diretamente ligada à diminuição da produtividade nas populações afetadas. No Brasil, os primeiros casos autóctones foram descritos em 2014, com ampla disseminação pelo território nacional (Cunha, 2018; Ministério da Saúde, 2021).

O ano de 2015 ratificou um surto de microcefalia em recém-nascidos no Brasil, e, a partir daí, surgiram hipóteses da associação entre a infecção por vírus zika em mulheres grávidas e malformações graves, que foram posteriormente reforçadas por estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. No ano seguinte, em 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou a zika como uma emergência em saúde.

Só no ano de 2022, ao longo das primeiras 24 semanas epidemiológicas, o Brasil registrou 1.172.882 casos prováveis de dengue. Quando comparado com o mesmo período de 2021, os dados mostram aumento de mais de 195%. O Ministério da Saúde já confirmou 585 óbitos por dengue, sendo 491 por critério laboratorial e 94 por critério clínico epidemiológico. O boletim epidemiológico disponibilizado pela Secretaria de Vigilância em Saúde mostra que ocorreram 122.075 casos prováveis de chikungunya no ano atual, que significa aumento de quase 94% em relação ao ano anterior. Já foram confirmados 23 óbitos e outros 50 seguem em investigação. Com relação aos dados de zika, ocorreram 5.699 casos prováveis até a semana epidemiológica 21 de 2022. Até o momento, ainda não foram identificados óbitos por zika no país (Ministério da Saúde, 2022).

O pico de transmissão de arboviroses no país acontece nas primeiras 26 semanas epidemiológicas do ano, de janeiro a junho, devido as melhores condições de clima e pluviosidade para reprodução do vetor. Os esforços para o período estão dedicados na eliminação de possíveis criadouros, na intensificação de alertas à população e na

organização dos serviços de saúde. As ações de preparação para o período seguinte são intensificadas durante os meses de novembro e dezembro, para evitar o aumento expressivo de casos e óbitos. (Ministério da Saúde, 2020).

1 DENGUE

1.1 Histórico e epidemiologia

As primeiras epidemias de dengue caracterizadas foram descritas em 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte. A disseminação pelos trópicos pode ser claramente justificada pelos progressos de navegação de longo curso e comércio marítimo ocorridos em meados do século 18. A partir daí, a doença se tornou endêmica em países tropicais. Os picos de infecção se repetiam de tempos em tempos, à medida em que o número de habitantes sem imunidade aumentava, resultado em epidemias de maiores proporções (Chaturverdi et al, 2006).

A disseminação do vírus da dengue com casos de dengue grave nos grandes centros urbanos se justificou a partir da aglomeração de milhões de habitantes em moradias precárias, com insuficiente abastecimento de água, sem redes de esgoto e sem coleta de lixo. Este quadro de degradação urbana e social propicia a proliferação do *Aedes aegypti* em grandes aglomerados urbanos (Gibbons et al, 2002; Lidenback et al, 2003)

Albert Sabin, em 1944, identificou a existência de dois sorotipos distintos e, em 1956, Hammon identificou outros dois sorotipos (Gibbons et al, 2002). Hoje são identificados quatro sorotipos, diferenciados como DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, sendo que todos estão presentes no Brasil.

O sorotipo 3 do vírus da dengue (DENV3) reemergiu nas Américas em 1994, após ter desaparecido na década de 70, causando a maior epidemia documentada na Nicarágua, com efeitos no México e América Central. Por sua vez, o sorotipo 1 da dengue (DENV1) foi reintroduzido na Jamaica, Cuba, Porto Rico e Venezuela em 1977, posteriormente documentado em países do Caribe, México e Américas do Sul e Central. O sorotipo 2 do vírus (DENV2) foi introduzido, provavelmente, em Cuba, em

1981, e este foi responsável pela primeira epidemia da forma mais severa nas Américas, com 158 mortes pela Febre Hemorrágica da dengue (FHD). Por fim, ainda em 1981, o sorotipo 4 da dengue (DENV4) foi identificado na porção insular do Caribe e se espalhou por diversos países das Américas, de modo similar ao DENV1 (Schatzmayr, 2000).

Segundo estimativas, quase 4 bilhões de pessoas habitam áreas onde ocorre transmissão do vírus (WHO, 2012). Em 50 anos, a incidência aumentou cerca de 30 vezes, sendo endêmica em mais de 100 países das Américas, no Sudoeste Asiático, países do Pacífico Ocidental, na África e do Mediterrâneo Oriental. A ocorrência de casos anuais é presumida em mais de 390 milhões, com alto índice de casos sintomáticos. Apesar do alto número de casos, acredita-se que as estimativas para a doença sejam consideravelmente incertas e subnotificadas, levando-se em conta a fragilidade dos sistemas de vigilância. Em Salvador-BA, um estudo realizado em 2009 por Silva e colaboradores mostrou que apenas 5,7% dos casos cujo exame laboratorial foi positivo para dengue foram de fato notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

No Brasil, a dengue reemergiu em 1981, com casos pontuais no estado de Roraima, após décadas de controle propiciado pelo programa de erradicação do mosquito vetor da febre amarela humana. O estado do Rio de Janeiro notificou casos de dengue em 1986, confirmando a reintrodução da doença, e, pouco tempo depois, houve a disseminação de casos para vários outros estados. (Cunha, 2018).

Até a década de 2000, a doença predominava em adultos e em cidades populosas. A partir daí, houve uma mudança de padrões epidemiológicos no país: uma interiorização da doença, com aumento da proporção de crianças com febre da dengue e dengue grave com significativo aumento global de incidências nos ciclos epidêmicos. Houve um aumento da proporção, mortalidade e letalidade de dengue grave. A mortalidade por dengue aumentou 39 vezes de 2000 a 2011, enquanto a letalidade de dengue grave dobrou (Oliveira, 2018).

1.2 Características do vírus e estrutura do genoma

O dengue vírus pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Possui a característica de ser um vírus esférico, com nucleocapsídeo icosaédrico e circundado por uma bicamada lipídica, como demonstrado na figura 1.

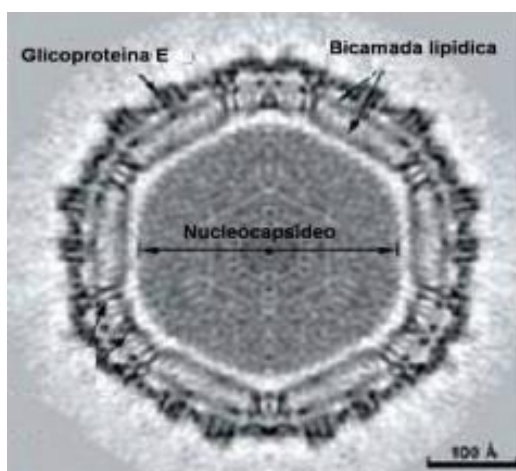


Figura 1 – Micrografia eletrônica da secção central de uma partícula esférica de DENV. Os componentes virais como glicoproteína E, a bicamada lipídica e o nucleocapsídeo estão indicados na figura. O nucleocapsídeo é denso e em formato icosaédrico em posição interna à bicamada lipídica. **Fonte:** Zhang et al, 2003

O RNA genômico de polaridade positiva do vírus da dengue possui aproximadamente 11 quilobases (Kb). Contém apenas uma ORF (do inglês *open read frame*, ou janela aberta de leitura), diretamente usado como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese de proteínas. Essa ORF codifica uma única poliproteína, que após clivagens gera 10 polipeptídeos individuais: três proteínas estruturais que geram o vírus maduro - capsídeo C, membrana M e envelope E- e sete não estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Chambers et al, 1990, Falgout et al, 1995). Sua representação está mostrada na figura 2.

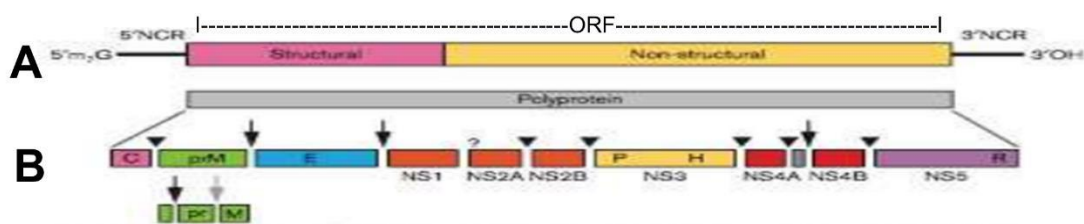


Figura 2: Estrutura e expressão do genoma do DENV. **A** – Desenho do genoma viral. A ORF corresponde a 95% do genoma do vírus, a qual contém as regiões que se traduzem em genes estruturais e não estruturais. Além da janela de leitura, há também a estrutura CAP e as porções não traduzidas, 5' e 3'. **B**- Desenho esquemático da poliproteína viral e seus produtos gênicos (C, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). **Fonte:** ICTV Vírus Taxonomy, 2017. Com adaptações.

A ORF, que corresponde a 95% do tamanho do genoma, está situada entre as regiões 5' e 3', que não são traduzidas. A região 5' UTR (do inglês *untranslated region*) é curta, com aproximadamente 100 pb e possui uma estrutura CAP, que confere estabilidade à molécula. A região 3'UTR é longa, com 450 pb e não apresenta cauda com poliadenilação. Entretanto, as estruturas de RNA conservadas que influenciam diretamente na tradução do genoma e são requeridas para a replicação viral estão contidas na região (Markoff, 2003).

1.2.1 Proteínas estruturais

O gene E é o mais estudado, devido à importância da glicoproteína E na ligação e entrada do vírus na célula, e, principalmente, na resposta humoral do hospedeiro humano. A proteína E tem importantes atividades biológicas como montagem da partícula viral, ligação ao receptor celular, fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Chambers et al, 1990). Estudos apontam que as mutações nesse gene estão relacionadas com o aumento da virulência dos sorotipos e genótipos virais (Leitmeyer et al, 1999).

A proteína C é pequena e seu papel está relacionado com a interação do RNA genômico do vírus para formar o nucleocapsídeo. Os resíduos carregados estão concentrados nas extremidades N e C-terminal da proteína C, separados por uma região interna hidrofóbica que medeia a associação com a membrana (Lindenbach et al, 2007). A proteína C madura forma um dímero com cada monômero contendo

quatro alfa-hélices, e é essencial para a correta estruturação dos vírions (King et al., 2001).

A proteína M é produzida durante a maturação de partículas de vírus nascentes dentro de vias de secreção celular, a partir da clivagem proteolítica da proteína precursora prM. O segmento “pr”, localizado na porção N-terminal, é clivado por uma protease durante a exocitose do vírus, permitindo que a proteína forme um dímero e fique ancorada no envelope viral e o fragmento “pr” seja liberado no meio extracelular (Lindenbach et al, 2007).

1.2.2 Proteínas não estruturais

As proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação do RNA viral e auxiliam na montagem viral e na evasão da resposta imune do hospedeiro (Lindenbach et al, 2007). Desempenham também as funções reguladoras e de expressão do vírus como virulência e patogenicidade (Lindenbach et al, 2007).

A proteína NS1 é uma glicoproteína localizada no interior do retículo endoplasmático, mas também pode ser encontrada associada à membrana celular e livre no meio extracelular- na forma solúvel. É produzida em grandes quantidades nas primeiras 48 horas após a infecção, sendo alvo da resposta imune do hospedeiro (Chambers et al, 1990; Lindenbach et al, 2007). A glicoproteína está altamente relacionada aos processos iniciais de replicação viral (Lindebach et al, 2003).

As proteínas NS2A e NS2B são pequenas e hidrofóbicas. A glicoproteína NS2A possui um papel fortemente atrelado à NS1 para seu processamento, enquanto a NS2B está associada à membrana, com dois domínios hidrofóbicos, que rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com NS3 e é um cofator necessário para a função serina protease de NS3 na clivagem pós traducional da poliproteína viral. (Lindenbach et al, 2003).

A glicoproteína NS3 é altamente conservada entre os flavivírus com estreita relação nas funções enzimáticas da replicação e no processamento da poliproteína (Chambers et al, 1990).

NS4A e NS4B também são hidrofóbicas e estão associadas à membrana. Supõe-se, pela forte interação com a proteína NS1, que a proteína NS4A esteja associada a complexos de replicação viral, funcionando como cofatores (Lindenbach et al, 2007).

A maior proteína entre os flavivírus é a NS5, sendo altamente conservada. Atua como RNA polimerase e RNA polimerase dependente (Chambers et al, 1990). A proteína NS5 também apresenta homologia com metiltransferases envolvidas na formação do cap do RNA viral (Lindenbach et al, 2007).

1. 3 Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação viral é iniciado após o vírus entrar em contato com o hospedeiro, desencadeando uma série de eventos dentro da célula hospedeira permissiva: a adsorção, penetração, desnudamento, biossíntese, montagem e liberação das partículas virais (Anderson, 2003; Clyde et al, 2006). A figura 3 mostra os processos de forma esquemática.

Após contato com as células dendríticas da derme, a proteína E se liga aos receptores da superfície celular. A interação da proteína E com a superfície induz a entrada do vírus por endocitose. Os endossomos que contêm as partículas virais fundem-se com os lisossomos, levando a diminuição do pH intra endossômico, que então acaba por promover uma mudança conformacional na proteína E, resultando em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e, conseqüentemente, a desmontagem da partícula viral (WU et al, 2000).

Como a maquinaria de replicação viral não se encontra empacotada na partícula viral, o primeiro evento realizado pelo vírus no citoplasma da célula se dá pela tradução de seu genoma, a fim de gerar o complexo de RNA replicase viral, para estabelecer uma infecção produtiva. Tanto a tradução dos RNAs quanto a replicação do genoma do

vírus ocorrem em associação com membranas derivadas do retículo endoplasmático e, como o genoma viral exerce o papel de RNA mensageiro, há a tradução das proteínas virais produzindo uma longa poliproteína. O genoma viral também atua como fita molde para sua replicação, então sua tradução inicial é iniciada pela produção do RNA viral, que envolve a síntese de fita de RNA negativa, servindo, assim, de molde para a síntese de novas fitas de RNA genômico de polaridade positiva (Clyde et al, 2006).

A montagem das partículas virais ocorre em associação com o retículo endoplasmático rugoso (RER) da célula hospedeira. Após a liberação das partículas virais para a superfície do RER, elas são transportadas para o complexo de Golgi, onde serão realizadas as modificações pós-traducionais das glicoproteínas do envelope: glicosilação da proteína E e clivagem da proteína prM em proteína M e peptídeo pr. O processo de replicação é finalizado com a liberação das partículas virais maduras pelo mecanismo de exocitose (Chambers et al, 1990; Clyde et al, 2006).

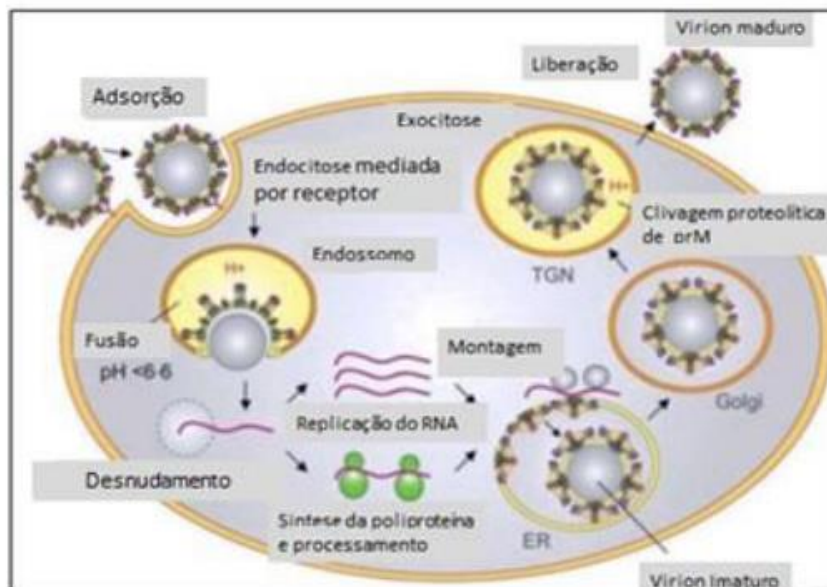


Figura 3: Replicação viral do vírus da DENV. Os processos de adsorção, fusão, desnudamento, montagem e liberação são mostrados de maneira esquemática no interior de uma célula humana. **Fonte:** Stiansy, 2006. Com adaptações.

1.4 Manifestações clínicas

O DENV produz uma doença febril aguda com espectro clínico variado, desde apresentações assintomáticas e sintomáticas, e esta última pode se manifestar por meio das seguintes formas clínicas: Dengue, dengue com sinais de alerta e dengue grave. (WHO, 2012).

Após o período de incubação, que pode durar de 4 a 7 dias, a doença é percebida e passa por três fases distintas: febril, crítica e de recuperação.

A primeira fase é marcada por febre elevada, de duração de 2 a 7 dias, associada à cefaleia, dor retro orbitária, mialgias e artralguas, podendo haver presença de exantema. Alguns sintomas como náuseas, vômitos e diarreias podem estar presentes no quadro do doente. A fase crítica tem início entre o terceiro e sétimo dia e coincide, em geral, com a declínio do quadro febril. É marcada pela ocorrência de aumento da permeabilidade capilar, além de leucopenia e plaquetopenia. O grau de extravasamento plasmático varia e é, na maior parte das vezes, transitório. Quando intenso, o paciente apresenta a forma grave da doença, geralmente com sinais de alarme, podendo evoluir para choque, disfunções orgânicas, com ou sem hemorragias. A fase de recuperação se dá com a reabsorção gradual do conteúdo extravasado e progressiva melhora clínica (Gubler, 1995).

1.5 Diagnóstico

A viremia da doença se manifesta na fase aguda e dura aproximadamente 5 dias, acompanhada do quadro febril. O diagnóstico é possível por técnicas que permitam a detecção do vírus a partir de amostras de soro. O isolamento viral em cultura celular, a detecção da presença de RNA viral a partir da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR e RT-PCR em tempo real) e detecção do antígeno NS1 através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são as técnicas utilizadas para confirmação do diagnóstico.

Na infecção primária, a detecção de imunoglobulina M (IgM) ocorre a partir do quinto a sexto dia após o início da febre, com pico em 2 semanas e desaparecimento em 2-3 meses. Já os títulos de imunoglobulina G (IgG) começam a se elevar, gradualmente,

após a primeira semana, com persistência por muitos anos ou por toda a vida. Desta forma, o diagnóstico de infecção recente pode ser feito através da detecção de IgM, a partir do quinto dia, e de IgG em amostras pareadas.

Nas infecções secundárias, os títulos de IgG sobem rapidamente após o início da infecção, seguido de reaparecimento de IgM em títulos usualmente baixos, na fase de recuperação, não sendo possível, em alguns casos, a detecção de IgM. O ELISA está entre as técnicas sorológicas mais comumente utilizadas, com seus diferentes formatos, como o ELISA de captura (MAC-ELISA) e ELISA indireta.

2 ZIKA

2.1 Histórico e epidemiologia

O vírus foi isolado em 1947 em uma floresta em Uganda, durante um projeto de pesquisa que utilizava macacos Rhesus como animais sentinelas para o estudo do vírus da Febre Amarela, e em 1948 foi isolado de mosquitos do gênero *Aedes* (Simpson, 1964).

Em 1954, o primeiro caso humano foi descrito durante uma epidemia de icterícia na Nigéria, onde o vírus foi isolado de um paciente com suspeita de febre amarela (Duffy et al, 2009). No final da década de 70, na Indonésia, sete pacientes foram infectados pelo vírus da Zika. A doença reemergiu em 2007 na Micronésia, onde um surto infectou quase 50 pacientes, sendo a primeira detecção fora da África e da Ásia. Em 2013, centenas de novos casos reapareceram na Polinésia Francesa, provavelmente introduzida a partir do Sudeste Asiático. Na sequência, disseminou-se por diversas outras ilhas do Pacífico Sul, como Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (Cao Lormeau, 2014).

No Brasil, a confirmação inicial de casos da doença se deu em 2015, a partir da identificação do vírus nos Estados da Bahia e Rio Grande do Norte (Ministério da Saúde, 2015). No final do mesmo ano, casos autóctones se acumulavam em dezoito estados do Brasil. É importante salientar que, em períodos epidêmicos, o Ministério

da Saúde (MS) recomenda que o diagnóstico de casos não-complicados e em não-gestantes se limite a critérios clínico-epidemiológicos, o que de um lado reduz o custo e impõe prioridade à confirmação laboratorial para os casos de maior morbidade, e de outro reduz a precisão diagnóstica. Além disso, sabe-se que em torno de 80% das infecções por ZIKV são assintomáticas, o que sem dúvida leva a subestimação de casos pelos sistemas de notificação. (Oliveira, 2018).

A epidemia mais recente por ZIKV ocorreu em 2018 na Índia e estudos filogenéticos retratam que os casos foram decorrentes de uma cepa asiática do vírus, atribuindo potencial epidêmico a essa cepa que pode circular em outras regiões (YADAV et al., 2019). Levantamentos epidemiológicos relatam que 87 países e territórios apresentam evidências de transmissão autóctone de ZIKV por mosquitos ao longo das Américas, África, sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental. Outros 61 países e territórios, correspondentes a países de todas as regiões cobertas pela OMS, têm evidências de vetores competentes estabelecidos do *Aedes aegypti*, mas ainda não documentaram a transmissão do ZIKV (Salvador, 2021).

2.2 Característica do vírus

O zika vírus, assim como o vírus da dengue, é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Seu material genético também é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com tamanho aproximado de 11kb. Seu genoma é traduzido em uma poliproteína que é clivada em sete proteínas não estruturais, semelhantes as descritas para o dengue vírus, e três proteínas estruturais, sendo elas: proteína C, que constitui o capsídeo viral que envolve a fita de RNA, a proteína E, formadora do envelope viral, que está diretamente ligada à montagem, ligação, entrada e fusão do vírus e a proteína precursor de membrana, que impede a fusão prematura do vírus com a membrana da célula hospedeira (Kazmi et al, 2020).

2.3 Manifestações clínicas

A porcentagem de casos sintomáticos é baixa, cerca de 20%, e apresentam-se comumente com exantema, febre baixa ou ausente, artrite ou artralgia, podendo haver conjuntivite não purulenta, mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, edema e vômitos. Seu curso é quase sempre benigno, não determinando hospitalização.

A ocorrência de formas assintomáticas acarreta, em larga medida, uma subnotificação da doença na população e pode levar ao diagnóstico tardio de síndrome congênita por zika vírus em fetos e bebês expostos (Oliveira et al, 2016).

2.3.1 Manifestações adversas

Na região nordeste do Brasil, o aumento incomum do número de recém-nascidos com microcefalia começou a ser detectado após os surtos por zika vírus se iniciarem, o que resultou em alarme mundial de emergência em saúde pública (Schuler-Faccini et al, 2016). Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais, envolvendo células-tronco neurais e modelos animais, vêm endossando a associação causal entre a infecção pelo ZIKV na gravidez e o desenvolvimento de malformações fetais, embora ainda existam relevantes lacunas de conhecimento (Ministério da Saúde, 2016). Possíveis cofatores ainda não identificados poderiam concorrer para tais desfechos e explicar a concentração de casos de microcefalias em determinadas regiões geográficas, em contraste com outras. Dado a relevância dos estudos e de casos suspeitos, em 2015 o Ministério da Saúde passou a monitorar os casos de microcefalia por sistema de notificação compulsória.

Além da ligação da microcefalia com o zika, a infecção adquirida pelo vírus vem sendo associada a complicações neurológicas pouco frequentes, porém potencialmente graves, como a síndrome de Guillain-Barré (Kassavetis et al, 2016). Esta síndrome manifesta-se como uma paralisia flácida ascendente, sendo uma condição imunomediada e frequentemente deflagrada por variados agentes infecciosos (virais e bacterianos), dias ou semanas após a infecção.

2.4 Diagnóstico

O material para análise usado na fase aguda da doença é preferencialmente o soro, no entanto, em 2016, a Organização Mundial da Saúde sugeriu o uso de outros materiais biológicos como plasma, urina, líquido cefalorraquidiano, fluido amniótico, sêmen e saliva para realização do diagnóstico.

Assim como para a dengue, técnicas moleculares que permitam a detecção do RNA viral a partir da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e na detecção de anticorpos IgM através de técnicas sorológicas como MAC-ELISA, são preconizados para detecção da zika. A positividade de testes moleculares no soro oferece um diagnóstico definitivo, contudo a infecção aguda por ZIKV produz viremia transitória, do quinto ao décimo primeiro dia. Isso acarreta um limite a esta técnica, considerando que muitos pacientes chegam tardiamente ou sequer procuram atendimento, uma vez que podem ser acometidos por quadros assintomáticos. Existem, contudo, estudos que se baseiam na existência de positividade mais longa em amostras de urina, o que poderia aumentar a capacidade diagnóstica dessas técnicas (Ministério da Saúde, 2016).

Baseando-se em outros Flavivirus, estima-se que os anticorpos IgM surjam após a primeira semana do início dos sintomas e persistam por vários meses. Assim sendo, a detecção destes anticorpos por meio de testes sorológicos oferece a possibilidade de diagnóstico após o período da viremia. No entanto, as reações cruzadas com anticorpos de outros flavivírus é frequente, o que acaba por ser um fator limitador em zonas de cocirculação. A detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, é mais específica e útil para diferenciação de vírus muito próximos, podendo ter maior utilidade para confirmação em caso de ELISA positivo.

Buscando atender a específica demanda para esta arbovirose, o Ministério da Saúde distribuiu para o Sistema Único de Saúde um teste rápido para detecção qualitativa de anticorpo contra zika vírus em pacientes com sintomas com mais de cinco dias. Se trata de um teste imunocromatográfico que implica em um dispositivo que contém dois cassetes no qual cada um detecta um tipo de anticorpo, IgM e IgG contra o zika.

3 CHIKUNGUNYA

3.1 Histórico e epidemiologia

A febre chikungunya é uma doença infecciosa, causada por um vírus de mesmo nome e está presente em mais de 60 países (Organização Mundial em Saúde, 2014). O vírus foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, em 1952. Chikungunya, em *swalli*, a língua local, significa “aqueles que se dobram”, e refere-se à postura curvada dos pacientes durante o primeiro surto documentado no país onde ele foi primeiramente descoberto.

A doença permaneceu por alguns anos sem ser detectada pelos sistemas de vigilância, e em 2004, o vírus chikungunya reemergiu na África Ocidental, e, a partir daí, se disseminou globalmente. Desde sua descoberta, três genótipos do CHIKV foram descritos: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano e Asiático (Donalísio & Freitas, 2015). A partir do genótipo Leste-Centro-Sul africano, emergiu uma linhagem responsável por epidemias explosivas nas Ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011, denominada linhagem do Oceano Índico. Diversas cepas desta linhagem desenvolveram mutações na proteína do envelope viral E1, que aumentaram a transmissibilidade e infectividade em mosquitos *Aedes albopictus*, o que foi associado a surtos explosivos em alguns países. Uma notável epidemia em meados de 2005 atingiu as Ilhas Reunião, território francês no Oceano Índico, onde não haviam descritos previamente pacientes com chikungunya vírus (Donalísio & Freitas, 2015).

No Brasil, ao final de 2014, já haviam sido notificados alguns casos importados, e casos autóctones em alguns estados brasileiros, o que permitiu atingir todos os estados nos anos seguintes.

3.2 Característica do vírus

O vírus pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. O vírus consiste em partículas virais icosaédricas, com tamanho de 70 nm de diâmetro revestidas por um invólucro lipídico onde estão inseridas glicoproteínas virais. Seu genoma é composto por uma molécula de RNA de fita simples, senso positivo e aproximadamente 11,8kb.

Seu genoma possui um cap no extremo 5' e cauda poli-A na região 3'. Os genes codificadores das proteínas não estruturais encontram-se próximas a porção 5' do genoma, sendo elas NS1, NS2, NS3 e NS4. É descrita uma região de junção seguida de genes estruturais, como C, E3, E2, 6K e E1. A região codificante é flanqueada nos extremos 5' e 3' por sequências não traduzidas, respectivamente 5'NTR e 3'NTR.

3.3 Manifestações clínicas

Diferentemente do Zika vírus, a febre chikungunya possui altos índices de casos sintomáticos. As manifestações agudas da doença são caracterizadas por febre alta de início abrupto, artralgias, mialgias, cefaleia, dor lombar e prostração. Artralgia e artrite são bastante frequentes e marcantes nos pacientes acometidos pela chikungunya. A evolução para uma fase tardia, com manifestações reumatológicas subagudas e crônicas, pode ocorrer em mais da metade dos casos, com alto impacto na qualidade de vida e produtividade. Nesse caso, as manifestações mais comuns são poliartralgia, poliartrite e mialgias.

3.4 Diagnóstico

A exemplo da dengue e zika, o Ministério da Saúde recomenda que, em zonas de transmissão, o diagnóstico de casos se baseie em critérios clínicos-epidemiológicos.

O diagnóstico laboratorial de chikungunya é baseado na detecção direta do vírus por isolamento viral, técnicas de PCR para identificação do RNA viral ou em testes para identificação de anticorpos específicos. A viremia da doença, que compreende o período de até sete dias após o início dos sintomas, o diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é de mais fácil e rápida execução, além de permitir a contagem da carga viral. A utilização das técnicas sorológicas é indicada após o período de viremia.

O diagnóstico de infecção recente ocorre através da detecção de anticorpos IgM e/ou aumento dos títulos de IgG em 4 vezes. A titulação de IgM costuma zerar após seis meses da infecção, já os títulos de IgG costumam persistir por muitos anos.

É importante, para liberação de um diagnóstico preciso em áreas de cocirculação de arboviroses, a pesquisa de anticorpos neutralizantes, já que pode existir a possibilidade de reação cruzada quando há infecção por outros alfavírus.

4 DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS METODOLOGIAS

Com o avanço da ciência, vários testes para sorodiagnóstico são utilizados atualmente, podendo ser citados o ELISA e PCR.

4.1 ELISA

O ELISA, sigla para *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, é o método mais empregado para diagnóstico sorológico, possuindo diferentes variações técnicas.

Na técnica ELISA indireta, microplacas são primariamente revestidas por antígenos virais, os quais se ligam às imunoglobulinas específicas, IgM ou IgG, caso presentes no soro. Após a etapa de lavagem, os anticorpos ligados serão então detectados por outros anticorpos adicionados e conjugados a enzimas, as quais permitirão a reação colorimétrica clássica sobre um substrato, medida por espectrometria.

Na técnica ELISA de captura, as microplacas são revestidas por anticorpos antiimunoglobulina humana, os quais capturam inicialmente imunoglobulinas inespecíficas, IgM ou IgG, do soro do paciente. Em seguida, antígenos do vírus de interesse são acrescentados e se ligam às imunoglobulinas específicas, IgM ou IgG, caso estejam presentes no soro. Após lavagem, os antígenos ligados serão, então, detectados por anticorpos do conjugado enzimático adicionado, repetindo os passos finais comuns a todas as variedades de ELISA.

4.2 PCR

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica de detecção de ácidos nucleicos que se baseia na amplificação específica de segmentos do genoma. A geração de novas cópias *in vitro* utiliza os mesmos elementos e princípios básicos do processo de replicação natural do DNA. Para que a reação ocorra, é necessário que alguns reagentes específicos estejam presentes na amostra. O uso de um tampão, a enzima Taq polimerase, iniciadores (*forward e reverse*) específicos para o alvo, nucleotídeos, Mg⁺⁺ e água em quantidades e concentrações específicas são essenciais para o sucesso da reação. A amostra é então submetida a um termociclador, que, com a mudança de temperatura e repetição em vários ciclos, é capaz de abrir a fita de DNA, acoplar os iniciadores e estender a nova fita, criando milhões de cópias do segmento desejado. A análise, se for pela metodologia convencional de PCR, é realizada por meio de gel de agarose ou poliacrilamida. Uma variação da técnica, a PCR em tempo real, utiliza fluoróforos intercalantes de DNA ou sondas que se hibridizam no alvo, e sua análise ocorre a partir de gráficos de amplificação exponencial.

5 CICLO DAS ARBOVIROSES

5.1 O mosquito *Aedes*

O principal vetor da dengue, zika e chikungunya, no Brasil, é o culicídeo *Aedes aegypti*. Na Ásia e na Oceania outras espécies como *A. albopictus*, *A. scutellaris*, e o *A. polyniensis* são os maiores transmissores. O mosquito é antropofílico, domiciliado e adaptado ao ambiente urbano (Oliveira, 2018)

Visto que sua presença é mais comum em áreas urbanas e a infestação é mais intensa em regiões com alta densidade populacional, o mosquito exibe comportamento de predileção em espaço urbano com ocupação desordenada, onde as fêmeas têm maior oferta para alimentação e dispõem de mais criadouros para desovar. Sua infestação é sempre mais intensa nos primeiros meses do ano, em função da elevação da temperatura e da intensificação das chuvas, por serem fatores que propiciam a eclosão de ovos do mosquito (Oliveira, 2018).

A figura 4 mostra, em formato ilustrativo, as características morfológicas do *A. aegypti*. O mosquito possui tamanho menor que 1 centímetro, suas asas são recobertas por escamas escuras, e o abdômen, juntamente aos três pares de patas, são listrados. A principal diferenciação para outras espécies está no tórax: o *A. aegypti* apresenta quatro linhas brancas em sua porção superior, duas dispostas paralelamente ao centro e duas linhas curvas na periferia (Eiras e Resende, 2009).

As antenas, nos machos, possuem cerdas em maior volume, com anatomia plumosa, enquanto as fêmeas possuem em menor quantidade e tamanho, denominadas pilosas. Enquanto os machos utilizam as cerdas para localizar possíveis parceiras, a partir da vibração da asa, as cerdas nas fêmeas têm função tátil, ajudando o animal a reconhecer se a superfície é ideal para a picada (Eiras e Resende, 2009).

Os palpos do *Aedes* são essenciais para a manutenção do equilíbrio na hora do pouso, além de criar estabilidade para inserção da probóscide. Os machos possuem palpos maiores que os da fêmea (Eiras e Resende, 2009).

A probóscide é a estrutura que contém a mandíbula do mosquito, crucial para a fêmea penetrar a pele em busca de sangue. Internamente, é separada por dois canais: a hipofaringe, que insere a saliva – podendo estar contaminada com o vírus, e o labro que suga o sangue. A saliva injetada no momento da picada contém substâncias anticoagulantes, que mantém o fluxo constante de sangue e propriedade anestésica, para bloquear a sensação de dor (Eiras e Resende, 2009).

O *Aedes* pode se alimentar em mais de um hospedeiro a cada ciclo gonotrófico (Mackenzie et al, 2004). Apesar de não voar à longas distâncias a partir do ponto de emergência da fase adulta, sabe-se que o *Aedes aegypti* tem capacidade fisiológica de voar mais de 10km por dia (Rowley E Graham, 1968). Porém, devido à grande quantidade de criadouros e hospedeiros próximos ao ponto de nascimento, esse mosquito tende a formar conglomerados, ou seja, sua distribuição não é homogênea no espaço e costuma se concentrar em raios de 10 a 30m (Harrington et al, 2005).

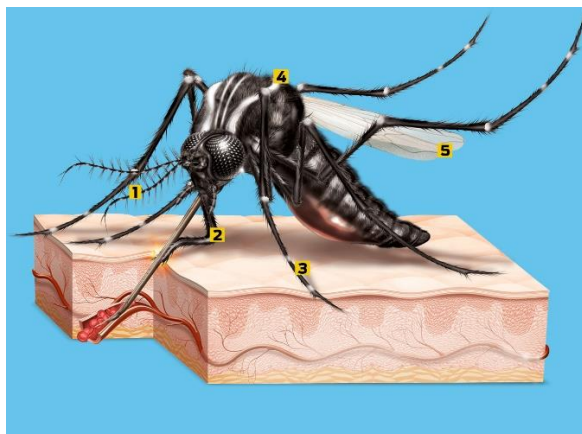


Figura 4: Desenho esquemático do *Aedes aegypti* com suas principais estruturas. 1 – Cerdas. 2 – Palpo. 3 – Patas e escamas. 4 – Tórax e linhas. 5 – Asas. Fonte: Superinteressante. Com adaptações.

5.2 Principais criadouros

O mosquito, totalmente adaptado a ambientes urbanos, possui uma vasta gama de criadouros, onde a fêmea realiza o depósito de seus ovos. Grandes reservatórios como caixas d'água, galões e tonéis – muito presentes em locais com pouco ou nenhum saneamento básico -, são criadouros que mais produzem *A. aegypti*, e onde se encontram as melhores condições para o desenvolvimento do ovo ao adulto. Depósitos móveis e fixos, como vasos de plantas, garrafas, pneus, piscinas, calhas e bandejas de ar-condicionado, igualmente importantes no combate ao mosquito, também são considerados criadouros ideais para a ovoposição (Ministério da Saúde, 2013).

5.3 Ciclo de vida

Os mosquitos do gênero *Aedes* têm um ciclo de vida complexo, com mudanças morfológicas e de habitat. As fêmeas colocam seus ovos nas paredes interiores de recipientes, próximos a superfície d'água, utilizado como criadouros. Estes ovos podem resistir ao dessecamento por até 450 dias, e logo no primeiro contato com a água, proveniente da chuva ou depositada por humanos, eclodem em larvas. Uma única fêmea é capaz de produzir cerca de 100 ovos a cada ciclo reprodutivo. As larvas alimentam-se de microrganismos e outras partículas, realizando três ciclos de ecdíase para que seja possível o crescimento do primeiro ao quarto estágio larval. A fase

seguinte inicia-se quando a larva sofre uma metamorfose, alterando para uma pupa, que não se alimenta, até que se torne mosquito adulto. Na fase final, há o rompimento da pupa para que o mosquito adulto possa emergir para superfície da água, como mostrado na figura 5. Todo ciclo de vida dura entre 8 a 10 dias à temperatura ambiente, dependendo do nível de alimentação e clima (Fundação Oswaldo Cruz, 2009).

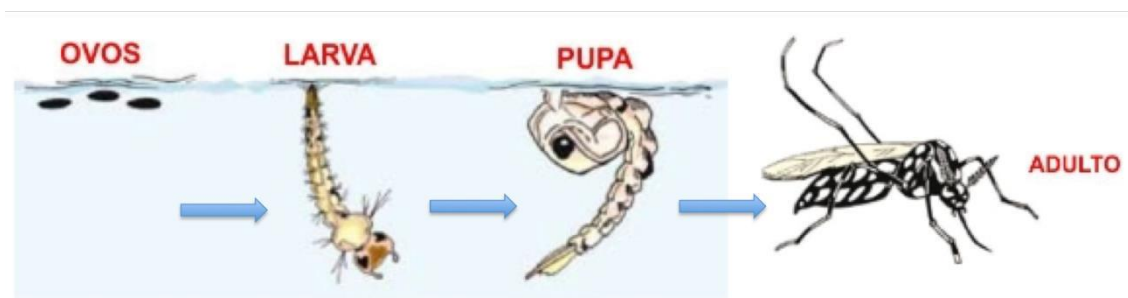


Figura 5: Representação do ciclo biológico do *Aedes aegypti*. Os ovos eclodem ao entrarem em contato com a água, se transformando em larva, que passa por quatro estágios diferentes. A pupa é o estágio de amadurecimento do mosquito, para finalmente chegar em sua forma adulta. **Fonte:** Fiocruz, 2009. Com adaptações.

5.4 Ciclo de transmissão

As arboviroses são transmitidas a partir da picada do mosquito infectado. Após o repasto sanguíneo o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação (Ministério da Saúde, 2002) e pode ser dividido em dois ciclos: o intrínseco, que ocorre no ser humano e o extrínseco, que ocorre no vetor.

Durante o período intrínseco, que se inicia um dia antes do aparecimento dos sintomas e vai até o sexto dia da doença, o vírus está presente no sangue, podendo infectar o mosquito, caso haja picada.

Já no período extrínseco, os vírus ingeridos juntamente com o sangue são multiplicados por cerca de dez dias nas glândulas salivares do mosquito. A partir daí o mosquito vetor é capaz de transmitir a doença e assim permanece até o final de sua vida, cerca de seis a oito semanas (Ministério da Saúde, 2005).

6 A ECOVEC

A Ecovec, uma spin-off da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e adquirida em 2019 pelo grupo Rentokil, é uma empresa de biotecnologia com grande foco em saúde pública. Criada em 2002, a empresa se especializou no desenvolvimento de

produtos e serviços de informação com aplicações no monitoramento e controle do vetor transmissor de diversas arboviroses.

No Brasil, as ações de monitoramento e controle do vetor seguem as diretrizes do Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que preconiza a pesquisa larvária do mosquito para levantar o índice de infestação do inseto. Sabe-se que esta metodologia é lenta, trabalhosa, onerosa e, acima dos obstáculos para sua execução, não prevê o aparecimento de casos de doenças (Arboleda et al, 2012; Coelho et al, 2008; Eiras & Resende, 2009).

Visando solucionar o problema do atraso no levantamento dos indicadores de infestação por meio da metodologia larvária do PNCD e da ineficiência em fornecer informações com alto grau de confiabilidade para os gestores de saúde, a UFMG, em parceria com a Ecovec, desenvolveu e patenteou um sistema de monitoramento integrado do *Aedes aegypti* adulto, o MI Aedes® (Eiras, 2006).

O sistema, premiado nacional e internacionalmente, é capaz de monitorar o vetor e a circulação viral na área urbana, além de medir a abundância de mosquitos do gênero *Aedes* capturados pelas armadilhas Mosquitrap®, gerando índices de infestação do vetor adulto (Eiras e Resende, 2009).

Adicionalmente, os mosquitos capturados pela Mosquitrap® são enviados ao laboratório da empresa para detecção dos arbovírus circulantes. Em posse de todos os dados, como de infestação e circulação viral, há o compartilhamento das informações geradas no *website* da empresa, permitindo que gestores de saúde direcionem ações de combate em áreas de maior risco de transmissão de doenças.

6.1 O Monitoramento Integrado do *Aedes* (MI-AEDES®)

O MI-Aedes® é um sistema de monitoramento em tempo real que monitora a infestação de fêmeas grávidas do *Aedes aegypti* em larga escala (Eiras & Resende, 2009). O sistema consiste em distribuir armadilhas MosquiTRAP® para captura de fêmeas de *A. aegypti* por toda a área urbana do município.

A Mosquitrap® é uma armadilha é uma patente da UFMG com a Ecovec, e, por meio de um atraente sintético de ovoposição, o AtrAedes®, e um adesivo colante localizado em seu interior, captura as fêmeas do mosquito.

Todas as armadilhas utilizadas para monitoramento são georreferenciadas e vistoriadas semanalmente por agentes de endemias do município, que são treinados para identificar e contabilizar a espécie e o sexo dos mosquitos capturados.

Toda informação referente a armadilha, como localização, semana epidemiológica e número de vetores capturados é registrada em um dispositivo móvel e fica disponível em tempo real para o gestor de saúde, permitindo o acesso das informações na forma de mapas e gráficos.

Em caso de captura de *A. aegypti*, estes são coletados pelos agentes e enviados ao laboratório da Ecovec para análise da presença do vírus. Assim, a informação sobre a população do vetor e a circulação viral são disponibilizadas para que, rapidamente, os gestores direcionem as equipes de controle para áreas prioritárias (Figura 6).

Durante o desenvolvimento do MI-Aedes foi proposto um novo índice: o Índice Médio de Fêmeas de Aedes (IMFA), que representa uma média das fêmeas adultas capturadas por armadilha (Eiras & Resende, 2009), um contraponto ao índice larvário utilizado pelo Ministério da Saúde. A partir deste índice, foram estabelecidos níveis de infestação por área, desencadeando ações de controle do mosquito pelo município, se a infestação atingir níveis elevados (de Melo et al., 2012; Ferreira et al., 2017; Pepin et al., 2013).

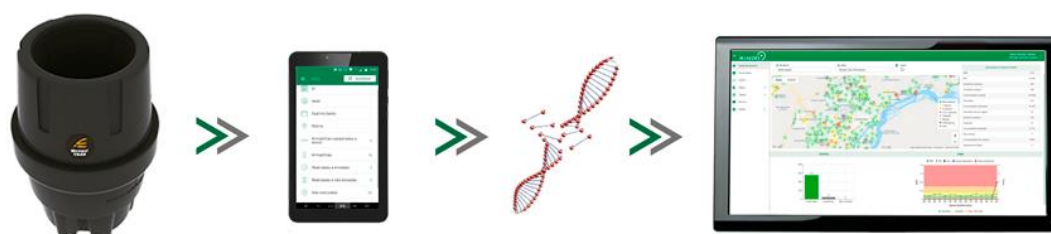


Figura 6. Etapas do Monitoramento Integrado do Aedes. Os mosquitos são capturados em armadilhas MosquiTRAP, um celular disponibilizado ao agente de endemias é utilizado para informar, em tempo real, a quantidade, a espécie e o sexo dos mosquitos capturados. Os mosquitos coletados são enviados para o laboratório da empresa e analisados quanto à presença de vírus. A informação da infestação do vetor e da circulação viral fica disponível na forma de gráficos e mapas que direcionam as equipes de controle para as áreas prioritárias. Fonte: Ecovec. Com adaptações.

6.2 O Monitoramento Integrado do Vírus (MI- VÍRUS®)

O monitoramento viral através da detecção de mosquitos naturalmente infectados tem ganho grande importância e tem sido sugerido como um sistema de alerta precoce de epidemias (Chow et al, 1998; Lourenço-De-Oliveira et al, 2009). A partir desta ideia, foi idealizado e acoplado ao MI-Aedes® um sistema de detecção e mapeamento de populações de mosquitos contaminados com os vírus da dengue, zika, chikungunya e febre amarela.

O MI-Vírus® consiste na coleta em solução conservante do mosquito identificado nas armadilhas em campo como *Aedes aegypti*, que são geolocalizados com auxílio do MI-Aedes®, e em seguida enviados para o laboratório da empresa Ecovec onde são analisados para os vírus: dengue e seus sorotipos, zika, chikungunya e febre amarela. Os resultados obtidos a partir da detecção e identificação do vírus são geoprocessados, e integrados aos mapas, gráficos e tabelas do MI. Aedes®.

JUSTIFICATIVA

O conceito de monitoramento do vetor *Aedes aegypti* faz parte do processo denominado vigilância entomológica. De acordo com a OMS (WHO, 2016, p.39):

Vigilância entomológica é o processo de coleta sistemática, contínua, ordenada e planejada de dados de vetores de doenças e do seu ambiente, para descrever, analisar, avaliar, interpretar e tomar decisões relacionadas ao controle do vetor [...] devendo ser realizada igualmente nas estações seca e chuvosa, abrangendo os estágios imaturos e adultos do vetor.

Adicionalmente, os objetivos específicos da vigilância entomológica proposta pela OMS revelam a importância do monitoramento do vetor como atividade central do processo. Para a OMS (WHO, 2016, p. 39), que apresentou as diretrizes para a vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no contexto da introdução do ZIKV nas Américas, tais objetivos são:

Detecção da presença do vetor em uma dada área geográfica; avaliação da densidade da população do vetor; determinação das áreas de maior risco entomológico, incluindo pesquisas por mosquitos infectados; identificação dos criadouros mais importantes e mais produtivos; avaliação do grau de resistência do vetor aos inseticidas;

e monitoramento da qualidade e efetividade das intervenções em andamento.

O documento ainda destaca a importância da vigilância entomológica como ferramenta para intensificar a educação em saúde para que a própria sociedade obtenha conhecimento e possa realizar, por conta própria, o trabalho de eliminação de criadouros e prevenção de epidemias (Zanandrez, 2019). Segundo a OMS, as boas práticas para a vigilância entomológica consistem em uma série de atividades de monitoramento do vetor em sua fase larvária e adulta, com o objetivo de obter dados que possam dar suporte às decisões de controle do vetor, além da organização de ações para mobilização da sociedade (WHO, 2016).

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD) existe com o objetivo de reduzir os impactos causados pelas epidemias de dengue, a partir da utilização de diversas metodologias de levantamento de índices larvários, que buscam estratificar as áreas de maior risco entomológico, direcionar ações de controle e monitorar sua eficácia (Ministério da Saúde, 2009).

É preconizado que seja realizado o levantamento dos índices larvários bimestralmente em 100% dos imóveis e quinzenalmente em pontos estratégicos, considerados assim, por possuírem alto risco de introdução do vetor. No entanto, esse levantamento é laborioso, pois depende de recursos humanos capacitados e infraestrutura para identificação das larvas em laboratório (Zanandrez, 2019). Devido à falta de recursos, tanto operacionais quanto financeiros nos municípios brasileiros e à necessidade de informações entomológicas em tempo hábil, foi proposto e colocado em prática o Levantamento de Índice Rápido para *Aedes aegypti* (LIRAa), que é realizado de forma amostral e utiliza os índices larvários.

A partir dos dados obtidos, são estabelecidos os riscos de transmissão de arboviroses. Porém, ainda é necessário que o LIRAa seja realizado quatro vezes ao ano, o que dependendo das condições do município, também pode ser um fator complicador (Ministério da Saúde, 2009). Os índices larvários têm sido questionados não apenas pelo esforço necessário para obtê-los, mas também por aspectos técnicos, como a baixa sensibilidade em detectar a presença do vetor e a incapacidade de estimar a

população de mosquitos adultos, bem como representar o risco de transmissão de arboviroses (Gomes, 1998; Focks, 2003)

Um dos objetivos primordiais da vigilância entomológica é realizar a medição da infestação de *Aedes aegypti*, de forma a antecipar o aparecimento de casos humanos de arboviroses (WHO, 2016). Por conseguinte, a utilização de armadilhas de captura para vetores adultos desponta como um método de maior sensibilidade em relação à pesquisa larvária para identificação da presença do vetor e estabelecimento do risco de epidemias, uma vez que com armadilhas, “o esforço de busca por criadouros é transferido dos agentes de saúde para os próprios mosquitos”, além de permitir que as armadilhas forneçam indicadores quantitativos, como número de capturas, e indicadores qualitativos (porcentagem de armadilhas com vetores capturados) (Codeço et al, 2015).

Pressupõe-se que um sistema de vigilância entomológica seja capaz de coletar dados sobre presença e densidade do vetor em determinada área, analisar e distribuir essa informação para as autoridades de saúde pública, que deverão aproveitar-se das tecnologias disponíveis para controlar o vetor (WHO, 2016).

Entretanto, espera-se que a integração de elementos que possam auxiliar no levantamento e uso de dados mais robustos, como sistemas de monitoramento do vetor que utilizem estratégias sensíveis para detecção e medição da população do mosquito e da circulação viral, de detecção de criadouros ocultos e áreas de risco, rapidez na transmissão de informação entre os agentes de vigilância e controle e monitoramento da qualidade das intervenções e da resistência do *Aedes aegypti* sejam capazes de enriquecer a vigilância entomológica (Fournet et al, 2018).

A Ecovec, buscando entregar aos municípios informações rotineiramente atualizadas sobre a real situação epidemiológica nos locais em que atua, investiu na criação de um laboratório de biologia molecular, com o propósito de identificar, no *Aedes aegypti*, a presença de vírus causadores de arboviroses. O objetivo do serviço é dar subsídios ao gestores de saúde a partir da disponibilização de informações semanalmente renovadas sobre a existência da circulação viral em determinadas regiões.

Atualmente o fluxo de trabalho para detectar dengue, zika e chikungunya em *Aedes aegypti* capturados pelas armadilhas Mosquitrap® já está bem delineado na rotina do laboratório, e a escolha da técnica de RT-PCR em tempo real se deu pela rapidez na entrega de resultados e pela sensibilidade do ensaio frente a outras variações de RT-PCR. No momento presente, a escolha pela utilização de agentes intercalantes no DNA dupla fita para detecção de patógenos propicia resultados confiáveis, ao passo que novas metodologias como uso de sondas fluorogênicas conferem resultados ainda mais específicos, além de possibilitarem a análise de vários alvos em ensaio único.

A substituição da metodologia de detecção pode gerar um efetivo ganho na qualidade do ensaio, redução no tempo de entrega do resultado, eliminação de dímeros nas amostras analisadas, diminuição no custo direto da reação, além de ter um grande potencial para se tornar um novo produto para o portfólio da empresa.

OBJETIVO

Estabelecer um protocolo de detecção para DENV, ZIKV e CHIKV baseado na metodologia de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estabelecer um protocolo de detecção multiplex a partir do uso de sondas fluorogênicas para DENV, ZIKV e CHIKV;

Validar o protocolo estabelecido para as arboviroses em mosquitos adultos coletados pela armadilha Mosquitrap®.

MATERIAIS E MÉTODOS

7 Amostras

7.1 Amostras de vírus padrão

Para a fase de padronização dos ensaios de PCR em tempo real para detecção de dengue, zika e chikungunya, foram utilizados vírus dengue sorotipos 1, 2, 3 e 4, vírus zika, vírus chikungunya, vírus febre amarela e vírus mayaro, todos gentilmente cedidos pelo laboratório de Imunofarmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, liderado pelo professor Mauro Teixeira.

Os vírus disponibilizados para os testes desta fase do estudo foram previamente preparados a partir da inoculação de isolados de vírus em monocamadas de células VERO. Após a propagação viral, o sobrenadante da cultura celular foi fracionado em alíquotas de 400 µL e armazenados em freezer -80°C, e então cedidos para o Laboratório de Biologia Molecular da Ecovec. A tabela 1 mostra os vírus utilizados no presente estudo. Todos os testes foram realizados para se obter as curvas padrão de eficiência e análise de especificidade dos ensaios.

Tabela 1 – Vírus utilizados como controles positivos

Vírus	Amostra	Fonte	Título	Ano de obtenção
Dengue sorotipo 1	NI	C6/36	1,24 x 10 ⁶ UFP/mL	2017
Dengue sorotipo 2	Singapura	C6/36	2,33 x 10 ⁶ UFP/mL	2017
Dengue sorotipo 3	NI	C6/36	2,18 x 10 ⁶ UFP/mL	2017
Dengue sorotipo 4	NI	C6/36	1,1 x 10 ⁶ UFP/mL	2017
Chikungunya vírus	NI	C6/36	1,8 x 10 ⁶ UFP/mL	2017
Zika vírus	NI	C6/36	1,4 x 10 ⁶ UFP/mL	2018
Vírus febre amarela	17D	C6/36	1,23 x 10 ⁷ UFP/mL	2018
Vírus mayaro	NI	C6/36	1,36 x 10 ⁶ UFP/mL	2019

NI: Não informado; UFP/mL: Unidade formadora de placa por mililitro.

7.2 Vetores coletados em campo

Os mosquitos *Aedes aegypti* capturados pelas armadilhas Mosquitrap® (Ecovec, Belo Horizonte, Brasil; Patente PI 0203907-9 B1) foram utilizados para a fase de validação em campo. Na impossibilidade de conduzir o estudo utilizando todas as amostras recebidas pelo Laboratório de Biologia Molecular da Ecovec, foram selecionadas 30 amostras de diferentes cidades do Brasil coletadas em anos distintos, com o objetivo

de tornar o estudo mais abrangente. A prevalência de amostras para dengue vírus é explicada pela atual situação epidemiológica dos municípios selecionados, que têm apresentado elevado número de casos para a doença.

Todas as amostras de campo utilizadas estão demonstradas na tabela 2. Os *Aedes aegypti* foram identificados por equipes de campo ou agentes de combate a endemias (ACE) no momento da coleta, e todos os profissionais foram preliminarmente treinados para realizar a exata diferenciação dos mosquitos, e assim garantir o envio correto dos vetores para o laboratório. As amostras de anos anteriores estavam preservadas em freezer -80°C para assegurar a viabilidade do material a ser testado.

Tabela 2 – Amostras de campo selecionadas para validação dos ensaios

ID	Ano	SE da coleta	Município	UF	Vírus na amostra	Nº de <i>Aedes</i> no tubo
1	2017	28	Piúma	ES	ZIKV	3
2	2019	24	Bom Jesus do Norte	ES	CHIKV	1
3	2019	24	Vila Velha	ES	CHIKV	1
4	2019	25	Cachoeiro de Itapemirim	ES	CHIKV	1
5	2019	30	Vila Velha	ES	CHIKV	1
6	2022	6	Santos	ES	CHIKV	2
7	2022	16	Porto Alegre	RS	DENV	4
8	2022	16	Porto Alegre	RS	DENV	2
9	2022	16	Araraquara	SP	DENV	2
10	2022	16	Araraquara	SP	DENV	1
11	2022	16	Araraquara	SP	DENV	3
12	2022	16	Araraquara	SP	DENV	2
13	2022	16	Araraquara	SP	DENV	2
14	2022	17	Porto Alegre	RS	DENV	1
15	2022	17	Porto Alegre	RS	DENV	5
16	2022	17	Araraquara	SP	DENV	4
17	2022	17	Araraquara	SP	DENV	3
18	2022	17	Araraquara	SP	DENV	1
19	2022	17	Araraquara	SP	DENV	1
20	2022	17	Araraquara	SP	DENV	1
21	2022	18	Porto Alegre	RS	DENV	2
22	2022	18	Porto Alegre	RS	DENV	4
23	2022	18	Araraquara	SP	DENV	3
24	2022	18	Araraquara	SP	DENV	2
25	2022	18	Araraquara	SP	DENV	1
26	2022	18	Araraquara	SP	DENV	3
27	2022	18	Araraquara	SP	DENV	2
28	2022	19	Porto Alegre	RS	DENV	1
29	2022	19	Porto Alegre	RS	DENV	1
30	2022	19	Araraquara	SP	DENV	2

ID: Identificação; SE: Semana epidemiológica; UF: Unidade Federativa; ZIKV: Vírus zika; CHIKV: Vírus chikungunya; DENV: Vírus dengue

7.3 MiAedes® como provedor das amostras de campo

7.3.1 Coletas em armadilhas Mosquitrap®

Todas as armadilhas implementadas nas cidades contempladas no estudo foram instaladas em pontos estratégicos no peridomicílio dos municípios. A localização foi registrada utilizando GPS do celular disponibilizado ao agente de combate a endemias ou técnico de campo, o qual contém o sistema MIAedes®. Os locais foram selecionados de acordo com a logística de trabalho e acesso facilitado, em áreas com maior concentração de focos e casos de arboviroses.

As armadilhas foram vistoriadas semanalmente e os agentes de combate a endemias realizaram, além da manutenção, a busca de larvas e mosquitos adultos de *Aedes aegypti*.

7.3.2 Coleta de dados e amostras, armazenamento, método de preservação e envio

No momento da coleta, a presença de larvas, mosquitos adultos de *Culex sp*, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* foi registrada no sistema MIAedes®, bem como qualquer dano na armadilha ou substituição de algum componente. A figura 7 mostra todas as peças da armadilha Mosquitrap®.



Figura 7: Armadilha Mosquitrap® utilizada no estudo.

A: parte superior (tampa); B: parte inferior (bojo) onde se coloca água; C: Cartão adesivo colocado no interior da armadilha; D: Funil para direcionamento do vetor no cartão adesivo; E: suporte de sustentação para o cartão adesivo; F: Atraedes® (atraente de ovoposição sintético; Patente PI 0106701-0).

Após o registro de dados no sistema, larvas e mosquitos adultos de *Culex sp* e *Aedes albopictus* foram descartados. Os mosquitos *Aedes aegypti* adultos, machos e fêmeas, foram coletados em micro tubos identificados com código de barras, sendo este código utilizado para que o sistema fosse capaz de rastrear a armadilha provedora da amostra, sendo que cada micro tubo identificado só poderia receber mosquitos de uma única armadilha.

Cada um dos microtubos possuía 250 μ L de uma solução conservante adaptada de Boom e colaboradores, de 1990: 8,2 M de tiocianato de guanidina, 80 mM de Tris-HCl, 70 mM de EDTA, água milli-q e pH=8.

Após o término das vistorias semanais, os microtubos contendo mosquitos *Aedes aegypti* foram reunidos em uma caixa própria para armazenamento, com identificação da semana epidemiológica e município. Todas as caixas foram enviadas para o Laboratório de Biologia Molecular da Ecovec.

7.4 Cidades contempladas no estudo para validação da técnica em *Aedes aegypti* capturados em campo

As coletas de mosquitos foram realizadas em diferentes cidades do Brasil, nos anos de 2017, 2019 e 2022 em diferentes semanas epidemiológicas. Tais exemplares já haviam sido previamente analisados e positivados para dengue, zika ou chikungunya vírus, pois são amostras provenientes do MI Aedes®, um serviço de monitoramento integrado do vetor, amplamente ofertado pela Ecovec a diferentes municípios. A figura 8 mostra a disposição geográfica dos municípios de Araraquara (SP), Bom Jesus do Norte (ES), Cachoeiro de Itapemirim (ES), Piúma (ES), Porto Alegre (RS), Santos (SP) e Vila Velha (ES), escolhidos para este estudo.



Figura 8: Localização dos municípios brasileiros escolhidos para fase de validação em campo.

7.4.1 Araraquara

Situada no interior do estado de São Paulo, Araraquara é um município com população total de 238.339 habitantes e área urbana de 1004 km² (IBGE, 2020). No ano de 2022, até o mês de maio, o município registrou mais de 10 mil casos de dengue, vivendo a segunda maior crise causada pela doença, contabilizando, até o momento, 17 óbitos (Prefeitura Municipal de Araraquara, 2022).

Para realizar o Monitoramento Integrado do Aedes, MIAedes®, Araraquara mantém contrato com a Ecovec para que a empresa realize o levantamento de dados epidemiológicos semanais do município, além de análise de circulação viral em mosquitos.

Ao todo, 916 armadilhas Mosquitrap® estão distribuídas em toda mancha urbana da cidade, como está mostrado na figura 9. Para realização do monitoramento semanal de todas as armadilhas instaladas, 7 agentes de monitoramento da Ecovec ficam responsáveis por realizarem as vistorias.

Para o presente estudo foram escolhidas 5 amostras de cada semana, do período da semana epidemiológica 16 até a semana 19 de 2022. Os 16 exemplares foram previamente analisados e todas eram positivos para dengue vírus. Tanto as amostras

contendo mosquitos infectados quanto o produto da extração de RNA viral foram armazenados em freezer -20°C .

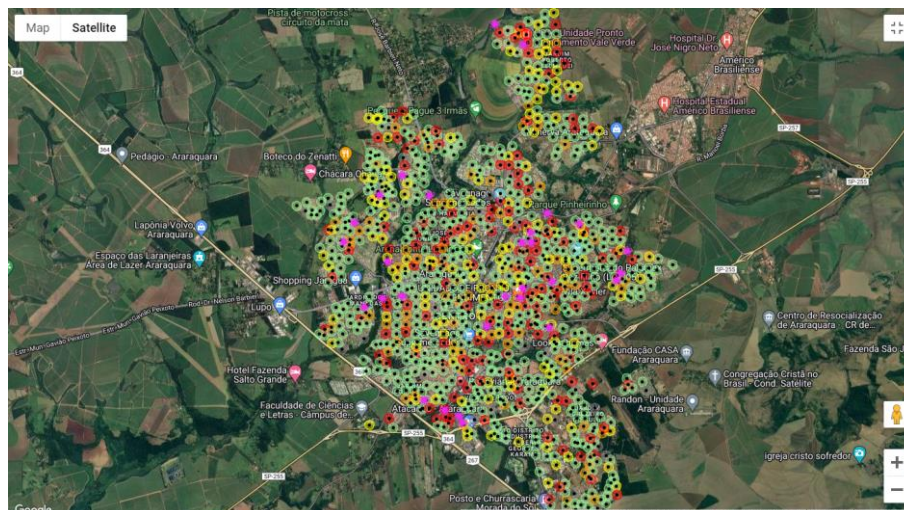


Figura 9: Disposição das 916 armadilhas Mosquitrap® no município de Araraquara, SP. Captura de tela realizada na semana epidemiológica 16/2022.

7.4.2 Porto Alegre

Porto Alegre, capital do estado do Rio Grande do Sul, é um município com área total de 497 km^2 e população de 1,488,522 habitantes (IBGE, 2020). Em 2022 já foram notificados mais de 2000 casos de dengue na cidade, três vezes mais se comparado ao mesmo período do ano anterior (Prefeitura Municipal de Porto Alegre, 2022).

O município, cliente da Ecovec há mais de 10 anos, tem em sua mancha urbana 910 armadilhas Mosquitrap® instaladas, como pode ser visto na figura 10, para que semanalmente sejam gerados dados epidemiológicos de alta relevância e informações atualizadas sobre a presença de vírus em *Aedes aegypti*.

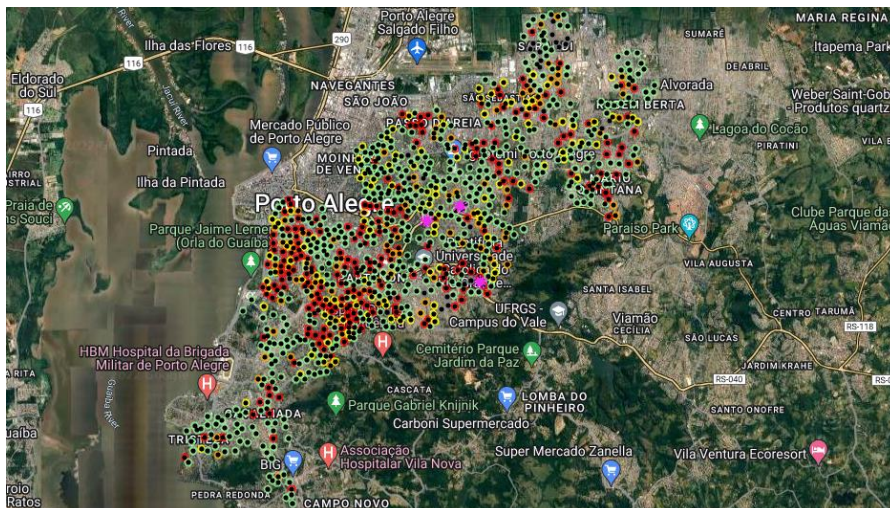


Figura 10: Disposição das 910 armadilhas Mosquitrap® no município de Porto Alegre, RS. Captura de tela realizada na semana epidemiológica 16/2022.

Em um período de 4 semanas, iniciado na semana epidemiológica 16 até a semana 19, foram separadas para o estudo de validação em campo 8 amostras, 2 a cada semana. Todas eram positivas para dengue vírus e foram armazenadas no freezer - 20°C para posterior análise.

7.4.3 Santos

Santos é um município portuário localizado no litoral do estado de São Paulo e sede da Região Metropolitana da Baixada Santista. Segundo os dados do IBGE atualizados em 2020, é uma cidade com população de 433,656 habitantes e área de 281 km². Santos tem, ao todo, 480 armadilhas Mosquitrap® espalhadas em pontos de interesse do município, e nos locais onde existem armadilhas instaladas, a Ecovec presta o serviço de monitoramento do vetor. Algumas das armadilhas instaladas são mostradas na figura 11.

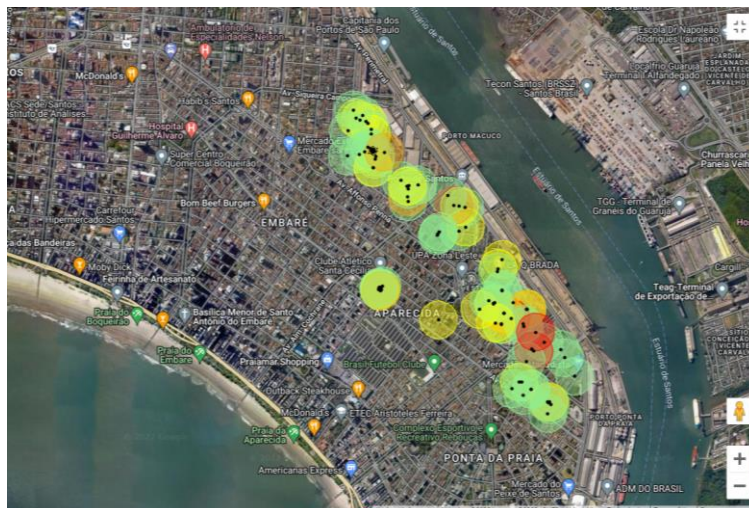


Figura 11: **Parte das armadilhas instaladas em Santos, SP.** Captura de tela realizada na semana epidemiológica 06/2022.

Os dados disponibilizados pela Prefeitura de Santos mostram que em 2022 já foram notificados 51 casos de dengue e 35 casos de chikungunya, no período de janeiro a maio.

Para validação do ensaio de chikungunya, uma amostra da semana epidemiológica 6 de 2022 foi utilizada no estudo. A amostra e o extraído estavam armazenados em freezer -20°C .

7.4.4 Bom Jesus do Norte, Cachoeiro de Itapemirim, Piúma e Vila Velha

Bom Jesus do Norte, Cachoeiro de Itapemirim, Piúma e Vila Velha são cidades situadas no estado do Espírito Santo.

Bom Jesus do Norte, ao sul do estado, faz divisa com o estado do Rio de Janeiro e possui área de 89 km^2 . Cachoeiro de Itapemirim, é uma cidade no interior do Espírito Santo com área de 339 km^2 e população de 210.589 habitantes. Piúma e Vila Velha são cidades litorâneas, com áreas de 66 km^2 e 791 km^2 , respectivamente.

Durante os anos de 2017, 2018 e 2019, a Ecovec foi responsável por implantar e executar o MiAedes® em 78 municípios no estado. Com o objetivo de preservar a

biblioteca de amostras positivas, o produto da purificação de RNA foi armazenado em freezer -80°C para possíveis análises futuras.

Para fase de validação em amostras de campo foi utilizada uma amostra positiva para zika vírus do município de Piúma, coletada na semana epidemiológica 28 de 2017. As três amostras positivas para chikungunya são de 2019: duas coletadas na semana epidemiológica 24, em Bom Jesus do Norte e Vila Velha, e uma amostra coletada na semana epidemiológica 25, em Cachoeiro de Itapemirim.

7.5 Padronização da técnica de RT-qPCR em amostras controle

7.5.1 Amostra controle

As amostras controles positivas foram preparadas a partir dos vírus padrões. Para padronização do estudo, foram realizadas diluições dos vírus padrões a partir dos títulos informados na tabela 1 para que todos estivessem em volume final de 200 μL e concentração de 1×10^6 UFP/mL. As amostras de controle negativo foram preparadas utilizando 200 μL de solução conservante, sem adição de vírus.

7.5.2 Extração de RNA viral

Para extração viral das alíquotas de cada uma das amostras diluídas dos vírus padrões, foi utilizado o kit comercial Bio Gene Extração de DNA/RNA viral de amostras biológicas. O RNA purificado foi obtido seguindo as instruções do fabricante.

Foram adicionados 200 μL das amostras de cada diluição de título conhecido (de 10^{-1} a 10^{-5}) em tubos de 1,5 mL e adicionados 5 μL de Proteinase K nas amostras. Em seguida, todas as amostras foram vortexadas e foram adicionados 200 μL de tampão de lise nos tubos. Em todas as amostras foram adicionadas 5,6 μL de RNA carreador previamente preparado e novamente foram submetidas a homogeneização por vórtex. Após serem incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos, foi adicionado 200 μL de etanol 100% em cada tubo de 1,5 mL contendo amostra. Tais amostras foram mais uma vez vortexadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a fase de lise e precipitação, o volume total de cada tubo (610 μL) foi transferido para sua

respectiva coluna, e em seguida centrifugadas a 4.000 x g por três minutos. Houve a troca de todos os tubos coletores com descarte do filtrado. Em todas as colunas contendo as amostras foram adicionadas 400 µL de solução de lavagem R2, que foram centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto. Após a centrifugação, as colunas foram transferidas para novos tubos coletores. Foram adicionadas 400 µL de solução de lavagem R3 nas colunas, que então foram centrifugadas por 1 minuto a 11.000 x g. As colunas foram novamente transferidas para novos tubos coletores e novamente receberam 200 µL de solução de lavagem R3 para então serem centrifugadas a 15.000 x g por 5 minutos. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL e incubadas por 5 minutos em um termobloco previamente aquecido a 56°C com a tampa aberta. Foi adicionada 50 µL de água livre de RNase, pré-aquecida a 70°C, em cada coluna. Após serem incubadas a temperatura ambiente por 3 minutos, cuidadosamente as colunas foram centrifugadas a 15.000 x g por 3 minutos. As colunas foram descartadas e o RNA eluído foi armazenado a -20°C. Para cada tipo viral foi extraído um controle negativo da reação.

7.6 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR)

7.6.1 Sondas e iniciadores utilizados no estudo

Para o presente estudo, foram desenhadas sondas para os ensaios já utilizados no laboratório de Biologia Molecular da Ecovec. Os iniciadores para detecção de dengue vírus foram cedidos empresa Thermo Fisher, os iniciadores para chikungunya foram desenhados em 2015 pela equipe da Ecovec e os iniciadores para detecção de zika vírus foram descritos em um artigo de Balm e colaboradores, de 2012. O controle endógeno escolhido foi o RpL32, amplamente utilizado para mosquitos *Aedes aegypti*, para controle do processo de extração e avaliação da atividade inibitória (Chien, 2012).

As sondas para os ensaios de detecção de zika e chikungunya foram desenhadas de modo a se ligarem especificamente a cada alvo, e antes de serem sintetizadas foram

testadas *in silico* através da ferramenta online *Multiplex Primer Analyser* disponível no site da Thermo Fisher Scientific (www.thermofisher.com). Foram realizados testes de especificidade e avaliação de formação de dímero e *hairpin*. A tabela 3 mostra todos os oligonucleotídeos deste estudo.

Tabela 3 – Sondas e iniciadores utilizados para detecção dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV

Iniciadores	Reporter	Sequência (5' – 3')	Posição no genoma
DENV Probe	FAM	CTGTAGAGACAGCAGGATCTCTGGT	10652 - 10676
DENV Forward	-	AGGACYAGAGGTTAGAGGAGA	10678 - 10697
DENV Reverse	-	CGYTCTGTGCCTGGAWTGAT	10590 – 10610
CHIKV Probe	Cy5	GGGAGTGATCCACCCCTAAATCTTCTAA	6819 – 6846
CHIKV Forward	-	ATAGCCGCACACTTTAAGCC	6717 – 6736
CHIKV Reverse	-	GAAAGCAGCCTCTATCAAGTCC	6851 - 6872
Zika Probe	HEX	GTGTTGAAGGGCTGGGATTACAAAGACT	9187 – 9214
Zika Forward	-	CCTTGATTCTTGAACGAGGA	9134 – 9154
Zika Reverse	-	AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA	9304 - 9325
RpL32 Forward	-	AGCCGCGTGTGTACTCTG	
RpL32 Reverse	-	ACTTCTTCGTCCGCTTCTTG	

7.6.2 Detecção e identificação viral (RT-qPCR)

Para realização das reações de RT-qPCR deste estudo foi utilizado o equipamento QuantStudio 5 (Applied Biosystems, California, EUA). As reações foram realizadas com um volume final de 12,5 µL.

A reação para dengue vírus compreendia 2 µL de amostra de RNA extraída, 2,20 µL de água livre de nuclease, 5 µL de tampão iTaq universal probe, 0,25 µL de enzima RT iScript, 0,2 µL (0,2 µM) de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e 0,15 µL (0,15 µM) de sonda.

O ensaio de detecção de zika vírus e chikungunya vírus compreendiam 2,5 µL de amostra de RNA extraída, 1,12 µL de água livre de nuclease, 6,25 µL de tampão iTaq universal probe, 0,32 µL de enzima RT iScript, 1 µL de cada iniciador (0,8 µM) e 0,31 µL de sonda (0,25 µM).

As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 50°C por 10 minutos para a etapa de transcrição reversa seguida de 3 minutos a 95°C para ativação da Taq polimerase,

em seguida 45 ciclos de PCR a 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 25 segundos a 60°C (anelamento e extensão).

7.6.3 Interpretação de resultados

Os resultados obtidos após a reação de RT-qPCR foram interpretados como positivos a partir da formação de uma curva sigmóide observada no software QuantStudio Design&Analysis Software (Applied Biosystems, California, EUA). Após o ajuste manual do *threshold* foram avaliados os valores de Cq onde a fluorescência ultrapassa a linha do *threshold*, que permite correlacionar o aumento da fluorescência emitida com a quantidade inicial de DNA alvo.

7.6.4 Validação dos ensaios

Para avaliar a eficiência dos protocolos de RT-qPCR para detecção de dengue, zika e chikungunya, foram realizadas curvas de diluição em série de 10 a partir das amostras controle, em duplicata ou triplicata, compostas pelas diluições 10^{-1} a 10^{-5} , escolhendo no mínimo 4 pontos para o cálculo da curva, de acordo com a diluição máxima em que houve amplificação, considerando-se, hipoteticamente, que a amostra contém pelo menos 1 cópia de RNA viral (Cunha, 2018).

Para análise estatística referente à eficiência dos protocolos de RT-qPCR, inclinação da curva (*Slope*) e coeficiente de correlação (R^2) foi utilizado o software que acompanha o equipamento QuantStudio 5. Uma eficiência de 100% revela que a quantidade de produto gerado aumentado exponencialmente dobra a cada ciclo. Na prática, valores entre 90 e 110% podem ser considerados (Cunha, 2018). Seu valor é calculado segundo a equação $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$. Dessa forma, valores de *Slope* de -3,1 a -3,58 são considerados válidos. Uma PCR com baixa eficiência terá uma sensibilidade menor.

O coeficiente de correlação (R^2) é a medida de como os pontos se ajustam à curva padrão, refletindo linearidade da curva. Um $R^2 > 0,975$ indica boa confiança ao correlacionar valores de Cq e a quantidade. Se ele for igual a 0, o valor de Cq não pode prever o valor da quantidade.

7.7 Validação dos ensaios em amostras de campo

Com o propósito de confirmar a padronização dos ensaios realizados em amostras controle, foram realizados testes em 30 amostras de mosquitos coletados pela armadilha Mosquitrap® em diferentes municípios do Brasil. A relação de amostras utilizadas para esta fase do estudo está na tabela 2.

Os mosquitos *Aedes aegypti* capturados e imersos em solução conservante foram cadastrados no site da empresa para garantir a rastreabilidade da amostra e então preparados para a extração e purificação.

Cada tubo contendo *Aedes aegypti* recebeu 0,165mg de microesferas de zircônio de 1mm para quebra da estrutura física do mosquito, auxiliado pelo macerador FastPrep 96 MPBio, na velocidade de 1800 rpm, durante 30 segundos.

Após a maceração as amostras foram centrifugadas a 16000 x g por 5 minutos para separação das estruturas remanescentes dos mosquitos no fundo do tubo. Foi aspirado 80 µL da amostra e então os exemplares foram submetidos ao mesmo processo de extração descrito no item 1.4.2.

Após o processo de extração e purificação, as amostras foram analisadas e conservadas a -20°C e, após três meses, conservadas a -80°C.

As amostras de campo foram submetidas a RT-qPCR utilizando as mesmas condições de mix e ciclagem descritas previamente no item 1.5.2.

7.8 Testes de especificidade

A fim de avaliar a especificidade dos iniciadores escolhidos e padronizados, foram realizados testes com o objetivo de analisar a particularidade de cada ensaio para detecção de dengue, zika e chikungunya. Os ensaios foram delineados para avaliar a possível amplificação de alvos a partir do uso de vírus controle de febre amarela e mayaro, arboviroses que circulam no Brasil. Também foi avaliada a reação cruzada das sondas desenhadas em iniciadores específicos para dengue, zika e chikungunya.

7.9 RT-qPCR *duplex*

7.9.1 Padronização do ensaio em amostras controle

As reações *duplex* foram testadas em amostras controle para detecção de dois alvos simultaneamente. Foram realizados três tipos de teste nesta etapa do estudo: i) iniciadores e sondas para detecção de dengue vírus e chikungunya vírus, ii) iniciadores e sondas para detecção de dengue vírus e zika vírus e iii) iniciadores e sondas para detecção de chikungunya vírus e zika vírus.

As reações estão descritas nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Reação *duplex* para detecção de DENV e CHIKV

Item	Volume utilizado	Concentração na reação
Tampão iTaq universal probes	12,0 µL	-
Iniciador DENV forward	1 µL	0,4 µM
Iniciador DENV reverse	1 µL	0,4 µM
Sonda DENV	1 µL	250 nM
Iniciador CHIKV forward	1,5 µL	0,9 µM
Iniciador CHIKV reverse	1,5 µL	0,9 µM
Sonda CHIKV	1,5 µL	250 nM
Enzima RT iScript	0,5 µL	-
Amostra	5 µL	-

Tabela 5 – Reação *duplex* para detecção de DENV e ZIKV

Item	Volume utilizado	Concentração na reação
Tampão iTaq universal probes	12,0 µL	-
Iniciador DENV <i>forward</i>	1 µL	0,4 µM
Iniciador DENV <i>reverse</i>	1 µL	0,4 µM
Sonda DENV	1 µL	250 nM
Iniciador ZIKV <i>forward</i>	1,5 µL	0,9 µM
Iniciador ZIKV <i>reverse</i>	1,5 µL	0,9 µM
Sonda ZIKV	1,5 µL	250 nM
Enzima RT iScript	0,5 µL	-
Amostra	5 µL	-

Tabela 6 – Reação *duplex* para detecção de ZIKV e CHIKV

Item	Volume utilizado	Concentração na reação
Tampão iTaq universal probes	12,0 µL	-
Iniciador ZIKV <i>forward</i>	1,5 µL	0,9 µM
Iniciador ZIKV <i>reverse</i>	1,5 µL	0,9 µM
Sonda ZIKV	1,5 µL	250 nM
Iniciador CHIKV <i>forward</i>	1 µL	0,6 µM
Iniciador CHIKV <i>reverse</i>	1 µL	0,6 µM
Sonda CHIKV	1 µL	250 M
Enzima RT iScript	0,5 µL	-
Amostra	5 µL	-

As condições de ciclagem permaneceram inalteradas, conforme anteriormente descrito no item 1.5.2.

7.9.2 Validação RT-qPCR em amostras de campo

Com o objetivo de avaliar as padronizações realizadas para amostras de RNA viral extraído, amostras de campo foram submetidas a testes para validação da reação. As amostras escolhidas para o primeiro teste de validação em campo estão descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Amostras de campo utilizadas para validação dos ensaios *duplex*

ID	Ano	SE da coleta	Município	UF	Vírus na amostra	Nº de <i>Aedes</i> no tubo
1	2017	28	Piúma	ES	ZIKV	3
5	2019	30	Vila Velha	ES	CHIKV	1
6	2022	6	Santos	ES	CHIKV	2
36	2022	20	Porto Alegre	RS	DENV	1
40	2022	20	Araraquara	SP	DENV	1

RESULTADOS

8 Padronização dos ensaios em amostras controle

8.1 Dengue vírus sorotipo 1

O vírus dengue sorotipo 1 (DENV1), cujo título era de $1,24 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo de detecção na diluição 10^{-5} , que corresponde a 10 UFP. A figura 12 mostra as curvas de amplificação geradas, em triplicata, obtidos pelo uso de iniciadores e sondas para detecção de DENV. O gráfico 1 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R^2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus. Os valores gerados pela curva padrão estão apresentados na tabela 8.

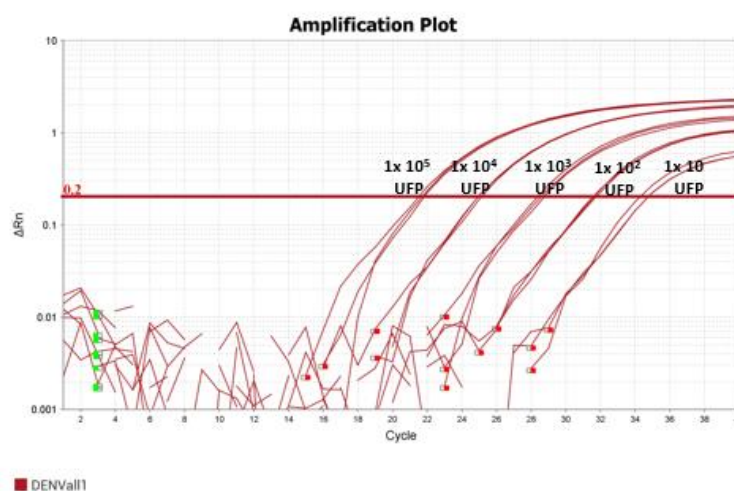
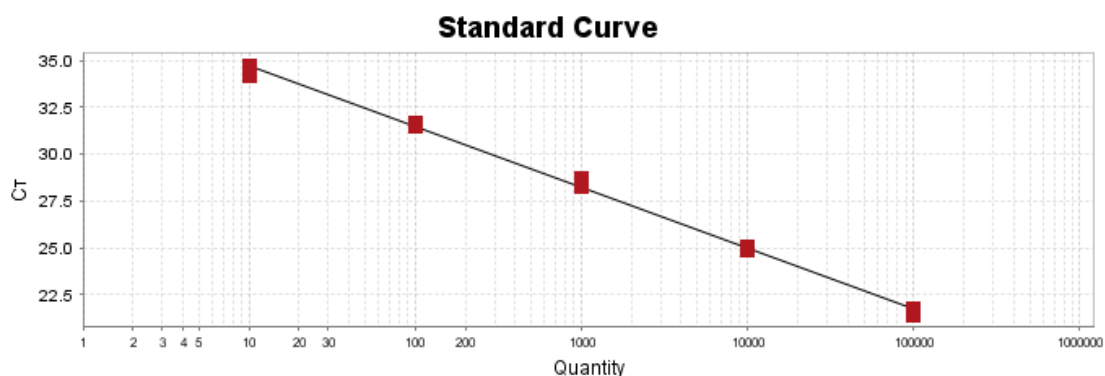


Figura 12: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 1. Estão incluídas 3 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-5} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de dengue vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.

Gráfico 1: Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV1 com utilização de 5 pontos em triplicata. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.



8.2 Dengue vírus sorotipo 2

O vírus dengue sorotipo 2 (DENV2), cujo título era de $2,33 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo na diluição de 10^{-5} , que corresponde a 10 UFP. A figura 13 mostra as curvas de amplificação geradas, em triplicata, enquanto o gráfico 2 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R^2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus. Os valores dos dados gerados na curva padrão estão apresentados na tabela 8.

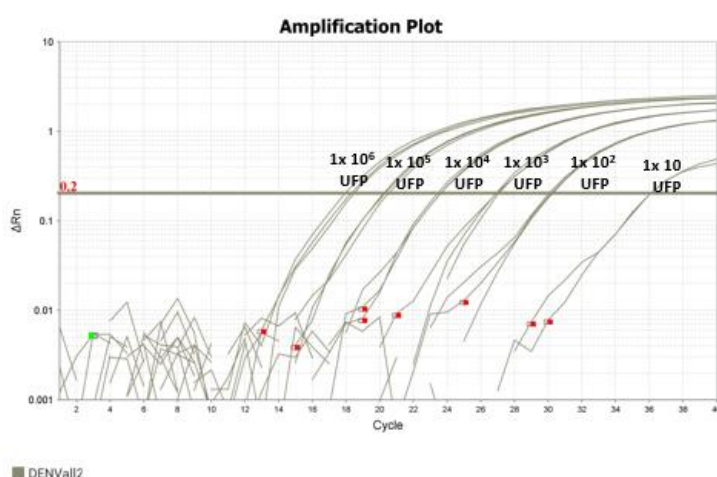
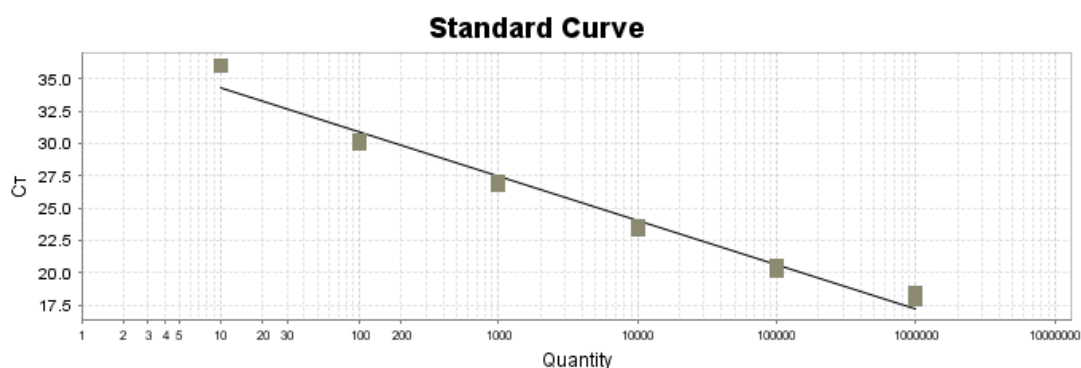


Figura 13: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 2. Estão incluídas 3 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-5} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de dengue vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Gráfico 2: Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV2 com utilização de 6 pontos em triplicata. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.



8.3 Dengue vírus sorotipo 3

O vírus dengue sorotipo 3 (DENV3), cujo título era de $2,18 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo de detecção na diluição 10^{-5} , que corresponde a 10 UFP. A figura 14 mostra as curvas de amplificação geradas, em triplicata, enquanto o gráfico 3 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R^2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus. Os valores dos dados gerados na curva padrão estão apresentados na tabela 8.

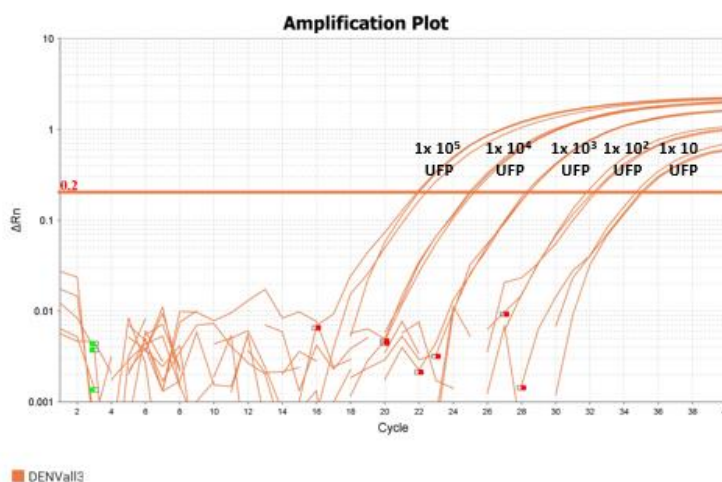
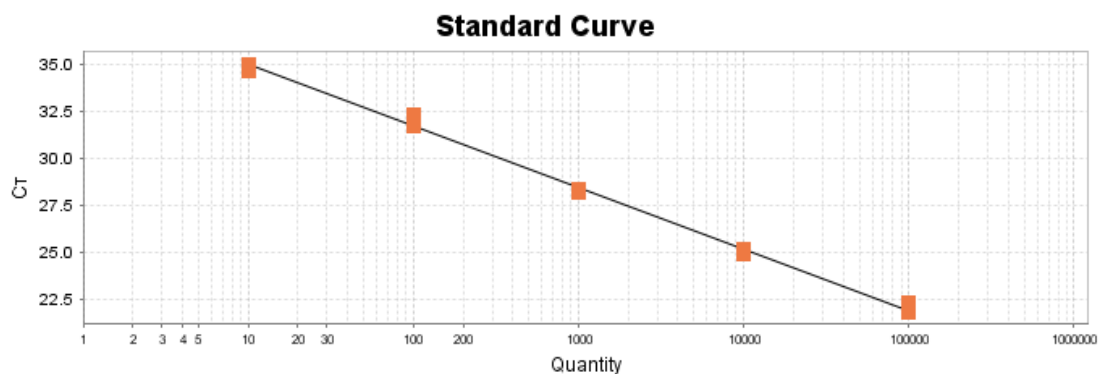


Figura 14: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 3. Estão incluídas 3 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-5} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de dengue vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Gráfico 3: Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV3 com utilização de 5 pontos em triplicata. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.



8.4 Dengue vírus sorotipo 4

O vírus dengue sorotipo 4 (DENV4), cujo título era de $1,1 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo de detecção na diluição 10^{-5} , que corresponde a 10 UFP. A figura 15 mostra as curvas de amplificação geradas, em triplicata, enquanto o gráfico 4 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R^2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus. Os valores dos dados gerados na curva padrão estão apresentados na tabela 8.

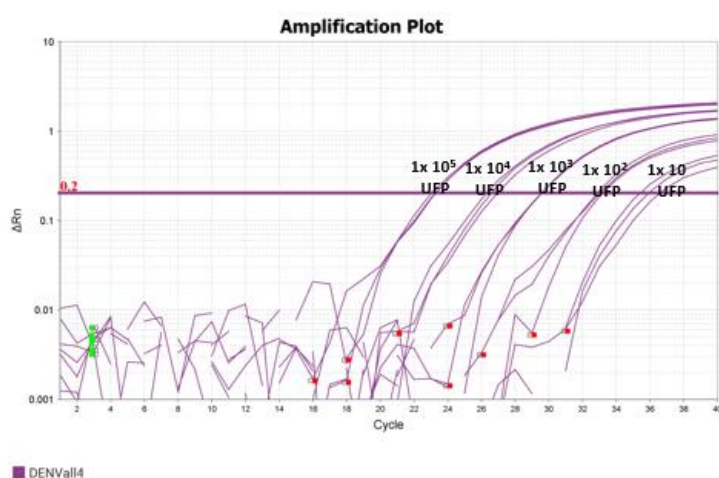
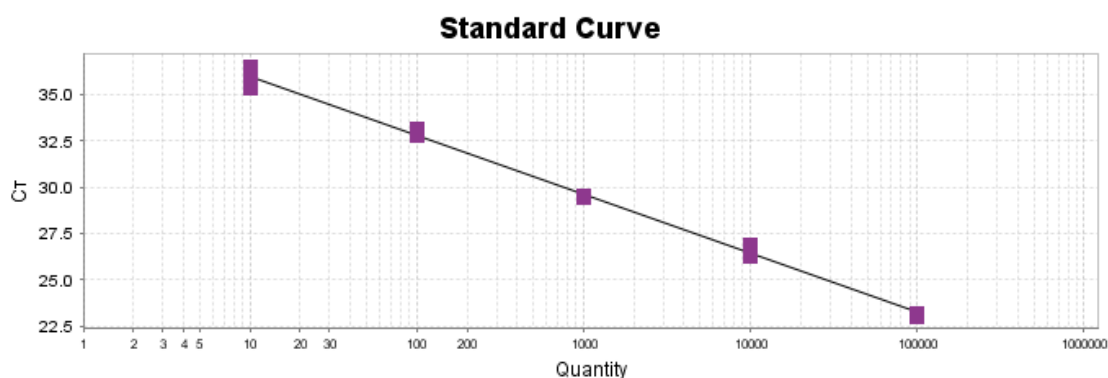


Figura 15: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus dengue sorotipo 4. Estão incluídas 3 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-5} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de dengue vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Gráfico 4: Curva padrão de eficiência para o protocolo de RT-qPCR para o vírus dengue, utilizando os iniciadores e sondas para DENV4 com utilização de 5 pontos em triplicata. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.



8.5 Zika vírus

O vírus zika (ZIKV), cujo título era de $1,4 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo na diluição de 10^{-4} , que corresponde a 100 UFP. A figura 16 mostra as curvas de amplificação geradas, em triplicata, enquanto o gráfico 5 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R^2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus.

Os valores dos dados gerados na curva padrão estão apresentados na tabela 8.

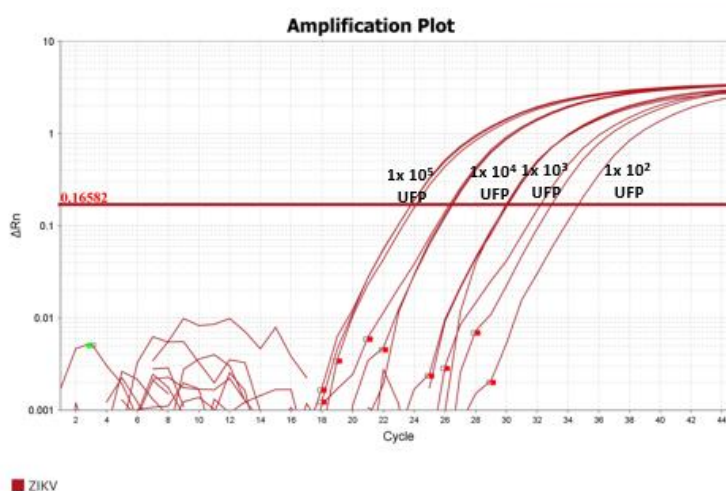
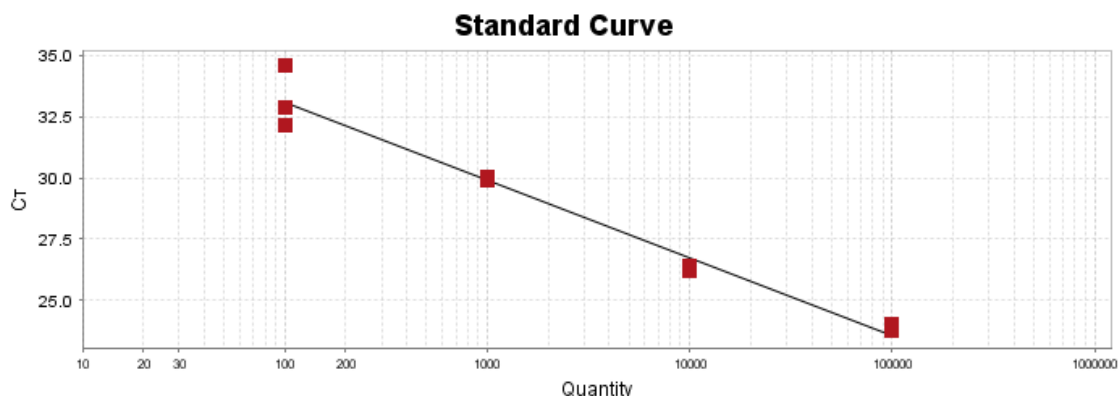


Figura 16: Perfil logarítmico da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus zika. Estão incluídas 3 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-4} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de zika vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Gráfico 5: Curva padrão de eficiência para detecção de vírus zika a partir de RT-qPCR. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.



8.6 Chikungunya vírus

O vírus chikungunya (CHIKV), cujo título era de $1,8 \times 10^6$ UFP/mL, teve seu limite máximo na diluição de 10^{-5} , que corresponde a 10 UFP. A figura 17 mostra as curvas de amplificação geradas, em duplicata, enquanto o gráfico 6 mostra a curva padrão e valores de Slope, Y- Intercepto, valor de coeficiente de correlação R2 e eficiência da reação obtidos com o uso de iniciadores e sondas específicos para detecção de dengue vírus.

Os valores dos dados gerados na curva padrão estão apresentados na tabela 8.

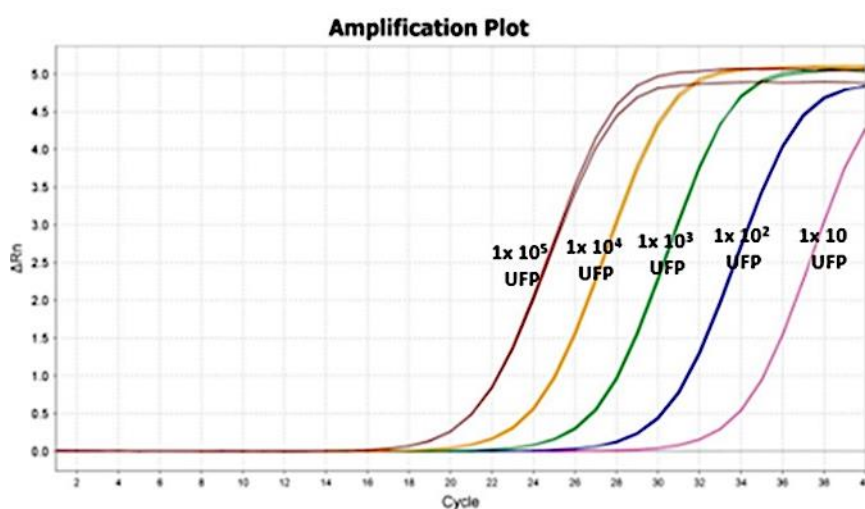


Figura 17: Perfil linear da curva de amplificação a partir de concentrações decrescentes do vírus chikungunya. Estão incluídas 2 repetições para as diluições do vírus, 10^{-1} a 10^{-5} . Foram utilizados os iniciadores e sonda específicos para detecção de chikungunya vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Gráfico 6: Curva padrão de eficiência para detecção de vírus chikungunya a partir de RT-qPCR. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.

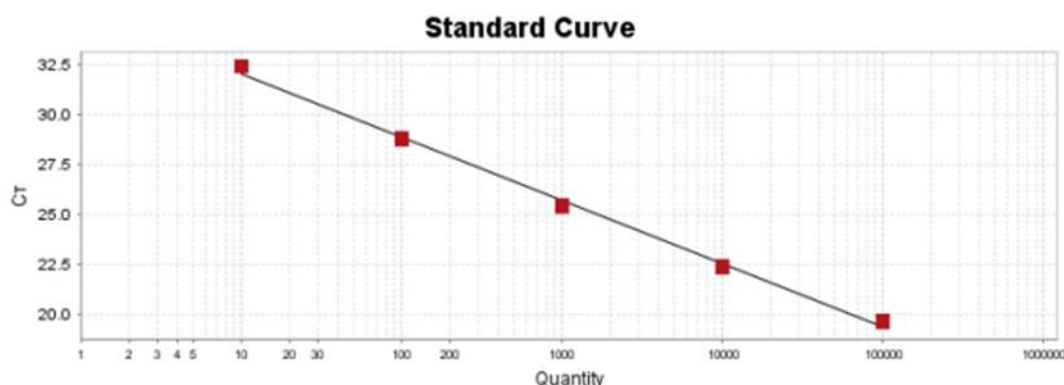


Tabela 8 – Valores gerados para curvas de eficiência das reações padronizadas

Ensaio	Slope	Y- Intercepto	R ²	Eficiência da reação	Erro
DENV1	-3,247	37,979	0,998	103,203	0,044
DENV2	-3,401	37,65	0,976	96,795	0,138
DENV3	-3,263	38,245	0,997	102,537	0,051
DENV4	-3,195	39,201	0,996	105,589	0,055
ZIKV	-3,18	39,469	0,973	106,284	0,166
CHIKV	-3,162	35,167	0,996	107,122	0,071

DENV1: Dengue vírus sorotipo 1; DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; DENV3: Dengue vírus sorotipo 3; DENV4: Dengue vírus sorotipo 4; ZIKV: Vírus zika; CHIKV: Vírus chikungunya.

Observa-se que o ensaio para detecção de zika vírus foi o menos sensível, com valor de R² mais baixo dentre todas as análises realizadas. O ensaio para zika vírus foi o único em que foram utilizados 4 pontos para montagem da curva *standard*, mas ainda assim foi possível avaliar sua eficiência.

Os valores gerados para eficiência da reação e *slope* estão dentro do que se considera válido, o que foi determinante para a continuidade do estudo.

9 Limite de detecção

Com objetivo de avaliar o limite de detecção de cada ensaio, foi realizada a análise para verificação da amplificação em amostras diluídas. Para efeito de padronização, todos os vírus possuíam concentração de 1x10⁶ UFP/mL e foram utilizados como ponto de partida para as diluições em série de 10.

A tabela 9 exibe as médias dos valores de Cq obtidos para cada diluição dos vírus utilizados. Os resultados obtidos mostraram que os ensaios para detecção de dengue vírus são os que apresentam maior sensibilidade, permitindo verificação da amplificação em amostras contendo 1 UFP/mL. O mesmo padrão de sensibilidade não foi observado nos ensaios de zika e chikungunya, onde o limiar de detecção ficou fixado em 10 UFP/mL.

Tabela 9 – Médias dos valores de Cq obtidos através das análises de RT-qPCR para cada ensaio

Ensaio/ Concentração	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1
DENV1	19,7	21,6	25,0	28,5	31,6	34,5	37,1
DENV2	18,2	20,3	23,5	26,9	30,2	36,6	35,7
DENV3	21,0	22,0	25,0	28,3	32,0	34,9	37,8
DENV4	21,2	23,2	26,5	29,5	33,0	35,9	39,8
ZIKV	20,3	21,2	25,8	29,3	32,6	33,6	ND
CHIKV	19,9	24,2	26,5	29,1	30,2	32,4	ND

DENV1: Dengue vírus sorotipo 1; DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; DENV3: Dengue vírus sorotipo 3; DENV4: Dengue vírus sorotipo 4; ZIKV: Vírus zika; CHIKV: Vírus chikungunya; NA: Não analisado; ND: Não detectado.

10 Avaliação de reação cruzada e análise de especificidade dos ensaios padronizados

Para examinar a especificidade dos ensaios padronizados nas fases anteriores do estudo, as reações para detecção de dengue, chikungunya e zika vírus foram submetidas a dois tipos de teste: i) Anelamento da sonda em ensaios não específicos ii) Utilização de vírus de importância epidemiológica no Brasil como controle negativo da reação.

As tabelas 10, 11 e 12 mostram os resultados obtidos a partir dos testes em que foram submetidos.

Tabela 10 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de DENV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados

CP	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV	CHIKV	YFV	MAYV	NTC
S_D+PF_D+PR_D	+	+	+	+	-	-	-	-	-
S_D+PF_D+PR_C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_D+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_C+PR_D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_Z+PR_D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_C+PR_C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_Z+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_C+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_D+PF_Z+PR_C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CP: Controle Positivo; DENV1: Dengue vírus sorotipo 1; DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; DENV3: Dengue vírus sorotipo 3; DENV4: Dengue vírus sorotipo 4; ZIKV: Zika vírus; CHIKV: Chikungunya vírus; YFV: Vírus febre amarela; MAYV: Vírus mayaro; NTC (*no template control*): controle sem adição de amostra; S_D: Sonda dengue; PF_D: *Primer forward* dengue; PR_D: *Primer reverse* dengue; PF_Z: *Primer forward* zika; PR_Z: *Primer reverse* zika; PF_C: *Primer forward* chikungunya; PR_C: *Primer reverse* chikungunya; -: negativo (sem amplificação); +: Positivo (amplificação).

Tabela 11 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de CHIKV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados

CP	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV	CHIKV	YFV	MAYV	NTC
S_C+PF_D+PR_D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_D+PR_C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_D+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_C+PR_D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_Z+PR_D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_C+PR_C	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S_C+PF_Z+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_C+PR_Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_C+PF_Z+PR_C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CP: Controle Positivo; DENV1: Dengue vírus sorotipo 1; DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; DENV3: Dengue vírus sorotipo 3; DENV4: Dengue vírus sorotipo 4; ZIKV: Zika vírus; CHIKV: Chikungunya vírus; YFV: Vírus febre amarela; MAYV: Vírus mayaro; NTC (*no template control*): controle sem adição de amostra; S_C: Sonda chikungunya; PF_D: *Primer forward* dengue; PR_D: *Primer reverse* dengue; PF_Z: *Primer forward* zika; PR_Z: *Primer reverse* zika; PF_C: *Primer forward* chikungunya; PR_C: *Primer reverse* chikungunya; -: negativo (sem amplificação); +: Positivo (amplificação).

Tabela 12 – Ensaios realizados em triplicata para avaliação da especificidade da sonda padronizada para detecção de ZIKV e análise de reação cruzada dos ensaios padronizados

CP	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV	CHIKV	YFV	MAYV	NTC
S _Z +PF _D +PR _D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _D +PR _C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _D +PR _Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _C +PR _D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _Z +PR _D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _C +PR _C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _Z +PR _Z	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S _Z +PF _C +PR _Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S _Z +PF _Z +PR _C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CP: Controle Positivo; DENV1: Dengue vírus sorotipo 1; DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; DENV3: Dengue vírus sorotipo 3; DENV4: Dengue vírus sorotipo 4; ZIKV: Zika vírus; CHIKV: Chikungunya vírus; YFV: Vírus febre amarela; MAYV: Vírus mayaro; NTC (*no template control*): controle sem adição de amostra; S_Z: Sonda zika; PF_D: *Primer forward* dengue; PR_D: *Primer reverse* dengue; PF_Z: *Primer forward* zika; PR_Z: *Primer reverse* zika; PF_C: *Primer forward* chikungunya; PR_C: *Primer reverse* chikungunya; -: negativo (sem amplificação); +: Positivo (amplificação).

Os testes realizados mostraram que não há verificação de reação cruzada quando as sondas são utilizadas em ensaios não específicos, sendo essa singularidade crucial para o sucesso de uma reação multiplex.

Também foi observado que não houve amplificação para nenhum ensaio padronizado quando utilizado vírus de febre amarela ou mayaro como controle negativo. A especificidade da reação é fundamental para a fase de validação em amostras de campo.

11 Validação dos ensaios padronizados em amostras controle utilizando amostras de *Aedes aegypti*

11.1 Amostras de campo positivas para dengue vírus

As amostras de campo, descritas na tabela 2, são provenientes de mosquitos coletados em campo, a partir das armadilhas Mosquitrap® nos municípios de Araraquara e Porto Alegre durante as semanas epidemiológicas 16, 17, 18 e 19. Todas as amostras foram previamente analisadas e apresentaram-se positivas para dengue vírus.

A fim de validar os ensaios padronizados em amostras controle, o RNA extraído de culturas virais e armazenado em freezer -20°C foi utilizado como molde para a reação de detecção de dengue vírus.

A reação e a ciclagem utilizadas foram as mesmas descritas no item 1.5.2.

Foi possível avaliar a amplificação de todas as amostras submetidas ao teste de validação em amostras de campo, como mostra a figura 18. A tabela 13 mostra os valores de Cq para cada uma das amostras testadas.

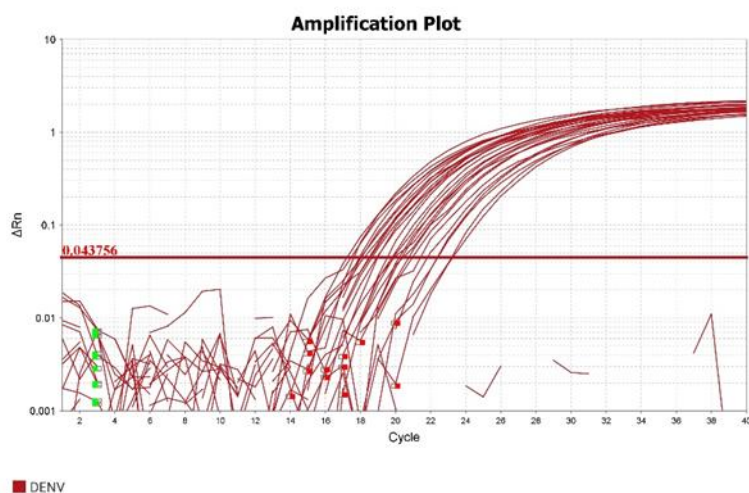


Figura 18: Perfil logarítmico da curva de amplificação de amostras de campo previamente testadas e positivadas para dengue vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Tabela 13 – Cq obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de DENV em amostras de campo

ID	VÍRUS	Cq	RPL32
7	DENV	20,5	18,9
8	DENV	19,9	19,3
9	DENV	22,3	19,8
10	DENV	18,4	20,8
11	DENV	19,4	19,6
12	DENV	20,5	20,0
13	DENV	19,1	21,3
14	DENV	23,2	19,7
15	DENV	17,9	19,6
16	DENV	21,2	19,0
17	DENV	19,1	19,4
18	DENV	19,8	19,3
19	DENV	20,3	18,4
20	DENV	18,1	19,0
21	DENV	21,5	19,2
22	DENV	20,2	19,6
23	DENV	28,6	19,8
24	DENV	23,1	19,3
25	DENV	19,0	20,0
26	DENV	22,3	18,9
27	DENV	19,2	18,8
28	DENV	18,1	19,6
29	DENV	17,5	19,4
30	DENV	18,9	19,3
CP	DENV2	19,5	18,8
CN	N/A	-	21,4
MIX	N/A	-	-

ID: Identificação da amostra; DENV: Dengue vírus; DENV2: Dengue vírus 2; CP: Controle positivo; CN: Controle negativo; N/A: Não se aplica

11.2 Amostras de campo positivas para zika vírus

Dentre todas as amostras escolhidas para o teste de validação em amostra de campo, apenas uma era positiva para zika vírus. As informações do exemplar utilizado para esta validação estão descritas na tabela 2.

A amostra coletada em 2017 e analisada na semana epidemiológica do mesmo ano teve seu RNA extraído preservado em freezer -80°C , a fim de evitar que o material genético fosse degradado, impossibilitando análises futuras.

O material foi então reanalisado sob as mesmas condições de reação e ciclagem descritas no item 1.5.2 e é possível observar a curva de amplificação para esta amostra na figura 19, que mostra a amplificação da amostra de campo na curva mais

à direita do gráfico e controle positivo com amplificação em ciclo anterior ao da amostra.

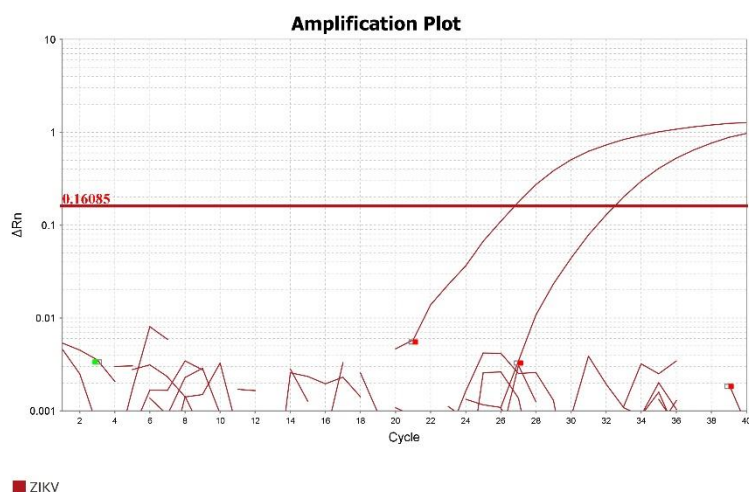


Figura 19: Perfil logarítmico da curva de amplificação a de amostra de campo previamente testada e positivada para zika vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

A tabela 14 mostra o valor de Cq encontrado para esta validação.

Tabela 14 – Cq obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de ZIKV em amostra de campo

ID	VÍRUS	Cq	RPL32
1	ZIKV	31,1	21,4
CP	ZIKV	23,2	20,8
CN	N/A	0	21,9
MIX	N/A	-	-

ID: Identificação da amostra; ZIKV: Zika vírus; CP: Controle positivo; CN: Controle negativo; N/A: Não se aplica

11.3 Amostras de campo positivas para chikungunya vírus

As cinco amostras de campo anteriormente analisadas e consideradas positivas para chikungunya vírus estavam preservadas em freezer -80°C e foram utilizadas com objetivo de validar o ensaio anteriormente padronizado.

O gráfico de amplificação mostrado na figura 20 mostra as sete curvas sigmóides geradas pelo *software* QuantStudio Design&Analysis, evidenciando à amplificação de cinco fragmentos específicos para chikungunya vírus e dois controles positivos. A tabela 15 mostra o Cq de cada amostra.

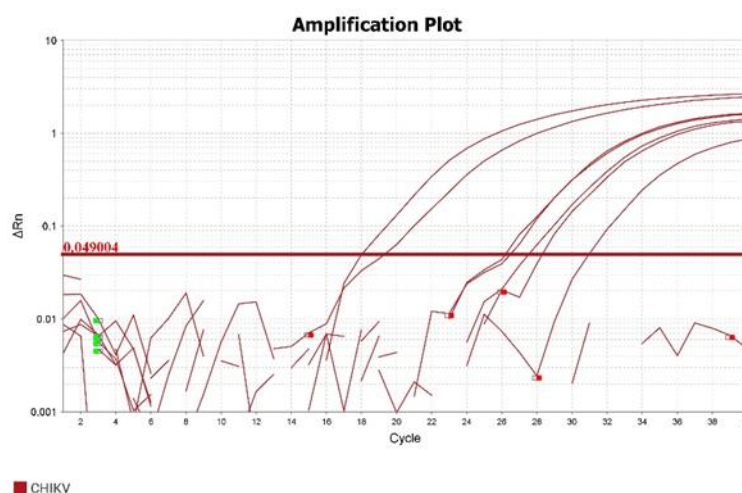


Figura 20: Perfil logarítmico da curva de amplificação a de amostras de campo previamente testadas e positivadas para chikungunya vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis

Tabela 15 – Cqs obtidos através das análises de RT-PCR para detecção de CHIKV em amostras de campo

ID	VÍRUS	Cq	RPL32
2	CHIKV	26,4	18,7
3	CHIKV	30,9	18,6
4	CHIKV	27,5	18,9
5	CHIKV	26,0	19,7
6	CHIKV	28,1	21,8
CP1	CHIKV	19,2	20,6
CP2	CHIKV	18,1	20,8
CN	N/A	0	21,6
MIX	N/A	-	-

ID: Identificação da amostra; CHIKV: chikungunya vírus; CP1: Controle positivo 1; CP2: Controle positivo 2; CN: Controle negativo; N/A: Não se aplica.

12 Reação duplex em amostras controle

12.1 Detecção dengue e chikungunya vírus

Com o objetivo de avaliar a detecção de dois alvos em um único ensaio, foi montada a reação RT-qPCR *duplex* a partir do uso de sondas e iniciadores específicos para dengue e chikungunya vírus.

Para esta fase do estudo foram utilizados os volumes extraídos de RNA viral para dengue e chikungunya. O teste foi conduzido em duplicata e foi avaliada a possível amplificação de controle negativo e mix.

A figura 21 mostra a amplificação dos dois alvos, sem amplificação dos controles negativos enquanto a tabela 16 exhibe os valores de Cq para cada ensaio e suas respectivas médias.

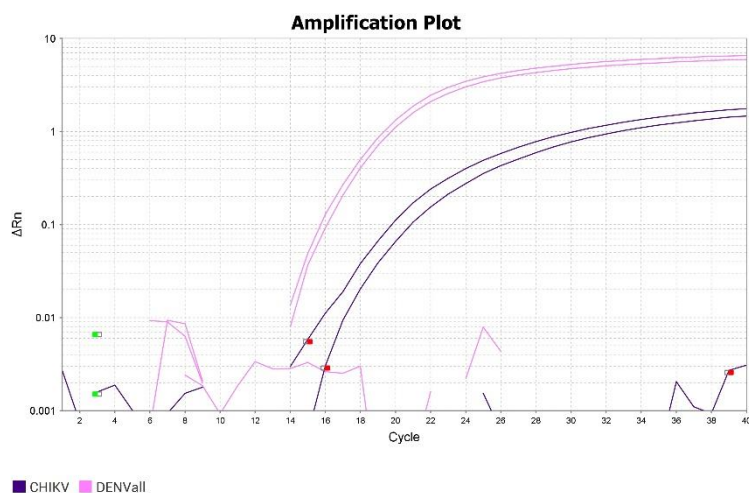


Figura 21: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR *duplex* para dengue e chikungunya vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.

Tabela 16 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de DENV e CHIKV em amostras controle

AMOSTRA	Cq	MÉDIA Cq
DENV2	16,4	
DENV2	16,1	16,2
CHIKV	20,1	
CHIKV	19,1	19,6
CN	N/A	
CN	N/A	N/A
MIX	N/A	
MIX	N/A	N/A

DENV2: Dengue vírus sorotipo 2; CHIKV: Chikungunya vírus; CN: Controle negativo, N/A: sem amplificação

O ensaio mostra boa amplificação para os dois alvos, com valor de ΔRn maior para dengue e amplificação satisfatória para chikungunya.

12.2 Detecção de dengue e zika vírus

A reação para detecção de dengue e zika vírus foi montada com objetivo de identificar, em reação única, os dois alvos. Para este ensaio foi considerada a diminuição da concentração de iniciadores de dengue, por ser o mais favorecido, e aumento da

concentração dos iniciadores para zika, conforme orientação fornecida na bula do fabricante de *mastermix*. As concentrações finais para cada um dos óligos estão descritas na tabela 4 do item 1.8.1.

Realizado em duplicata, foi possível verificar a amplificação dos dois alvos. A figura 22 mostra a amplificação para dengue vírus e zika vírus. Os resultados de Cq obtidos no ensaio são mostrados na tabela 17.

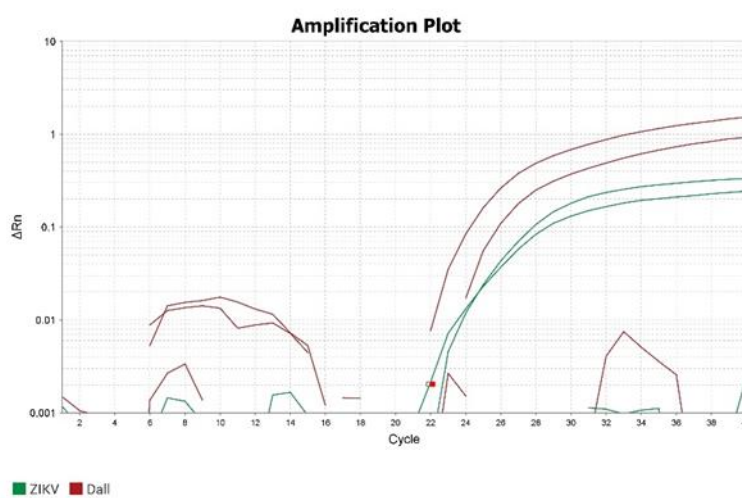


Figura 22: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR *duplex* para dengue e zika vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.

A diminuição da concentração do óligo para detecção de dengue vírus deslocou as curvas de amplificação para direita, com valores de Cq mais altos, o que não foi impeditivo para visualização da curva. O ensaio de zika também apresentou Cq deslocado, porém visível, mesmo em maior concentração na amostra.

Tabela 17 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de DENV e ZIKV em amostras controle

AMOSTRA	Cq	MÉDIA Cq
DENV1	24,6	
DENV1	23,1	23,8
ZIKV	25,9	
ZIKV	26,1	26
CN	N/A	
CN	N/A	N/A
MIX	N/A	
MIX	N/A	N/A

DENV2: Dengue vírus sorotipo 1; ZIKV: Zika vírus; CN: Controle negativo, N/A: sem amplificação

12.3 Detecção de zika vírus e chikungunya vírus

A reação *duplex* para zika e chikungunya foi desenhada para detecção destes dois alvos simultaneamente. Com o intuito de garantir a amplificação para o ensaio de zika, os óligos foram adicionados em maior concentração, com o cuidado de não apresentarem emissão de fluorescência nos controles negativos quando analisados.

É possível verificar as curvas de amplificação para ambos os ensaios, com valores de Cq dentro do esperado. A emissão de fluorescência também se mostrou adequada para o ensaio de zika, podendo ser bem observada na figura 23. Os valores de Cq são demonstrados na tabela 18.

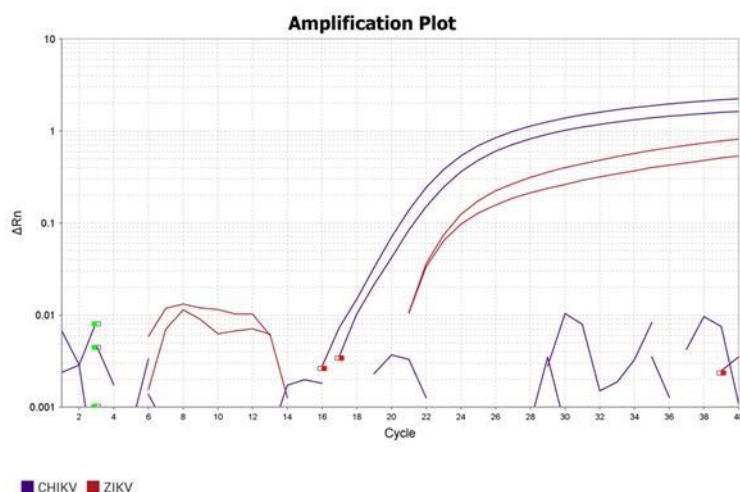


Figura 23: Perfil logarítmico da curva de amplificação de RT-qPCR *duplex* para zika e chikungunya vírus. Análise realizada pelo *software* Quantstudio Design & Analysis.

Tabela 18 – Cq obtido através da análise de RT-PCR para detecção de ZIKV e CHIKV em amostras controle

AMOSTRA	Cq	MÉDIA Cq
CHIKV	20,7	
CHIKV	19,9	20,3
ZIKV	22,0	
ZIKV	22,2	22,1
CN	N/A	
CN	N/A	N/A
MIX	N/A	
MIX	N/A	N/A

ZIKV: Zika vírus; CHIKV: Chikungunya vírus; CN: Controle negativo, N/A: sem amplificação

A padronização do ensaio para detecção de zika vírus se mostra o mais desafiador, pois dentre todos os testes é o que apresenta fluorescência menor e ampliações tardias, mesmo que as concentrações de seus iniciadores sejam favorecidas frente a outros alvos.

13 Reação duplex em amostra de campo

Após a montagem de reações para detecção de dois alvos simultâneos (i: dengue e chikungunya; ii: dengue e zika e iii: zika e chikungunya), foram realizados testes com o objetivo de observar a amplificação em amostras de campo anteriormente validadas em ensaios *singleplex*. As amostras escolhidas para esta fase do estudo foram previamente descritas na tabela 7.

Enquanto as amostras contendo vírus controle, utilizadas como controles positivos da reação, apresentaram amplificação com Cq muito próximos aos relatados na fase de padronização, não foi possível avaliar curvas que ultrapassassem o *threshold* nas amostras de campo contendo mosquitos *Aedes aegypti*.

Buscando elaborar uma alternativa que pudesse proporcionar amplificação nas amostras contendo mosquitos, foram realizadas novas purificações nos exemplares positivos para dengue, adicionando ao protocolo de extração mais uma etapa de lavagem, com intuito de diminuir a presença de possíveis inibidores. Tais amostras foram novamente submetidas a testes *singleplex* e *duplex*, e somente apresentaram resultado para reações com uso de sondas e iniciadores individuais.

DISCUSSÃO

As arboviroses são um grande problema para a saúde pública. O Brasil, um país de extensões continentais, com elevado fluxo de pessoas, ampla distribuição do mosquito *Aedes aegypti* e clima favorável para a reprodução destes vetores enfrenta um enorme desafio na tentativa anual de prevenir surtos ou epidemias.

Estudos que analisam o impacto das arboviroses para os cofres públicos mostram que o Brasil é o país que mais sofre com perdas econômicas dentre os países do ocidente, com valores aproximados de US\$ 1,5 bilhão por ano, onde são considerados custos ambulatoriais, hospitalizações e morte. É sabida a existência da escassez de registros de vigilância epidemiológica, com suas conhecidas limitações (subnotificações, casos assintomáticos, acurácia limitada dos critérios clínicos-epidemiológicos) que refletem no acobertamento da real magnitude das epidemias no Brasil.

Dados apontam o desembolso de R\$2,3 bilhões em custos diretos e indiretos para epidemias de dengue (Teich et al, 2018). Quando avaliado o impacto dos casos de zika no período de 2015 a 2017, os custos contabilizados para o país mostram valores de US\$4,6 bilhões, com gastos na manutenção de centros especializados em reabilitação para síndromes congênitas que, na época, foram atribuídas ao zika vírus (Frasão et al, 2017). Estudos que quantifiquem os impactos econômicos gerados pela febre chikungunya no Brasil ainda são escassos, mas dados 2016 mostram valores de R\$123 milhões relacionados ao absenteísmo, devido as dores articulares persistentes nos indivíduos acometidos pela doença (Teich et al, 2018).

A Organização Mundial da Saúde recomenda que esforços para implementação da vigilância entomológica e epidemiológica devam ser consideradas, a fim de trazer orientações técnicas extensivas para os gestores de saúde, auxiliando-os, a partir dos dados gerados, na tomada de decisão. Compreender a capacidade de uma espécie de mosquito ser infectada e transmitir o vírus se torna um elemento crítico na avaliação do risco epidemiológico das populações locais (Xu et al, 2020).

A Ecovec atualmente comercializa um serviço de Monitoramento Integrado do *Aedes* que atende os objetivos da OMS e já é ofertado a diferentes municípios. Seu objetivo

é integrar diversos dados gerados semanalmente e informar as autoridades de saúde sobre a presença e densidade do vetor adulto em determinadas áreas geográficas, além de facilitar o direcionamento das ações de controle baseadas nas áreas de maior risco de transmissão (Pepin et al, 2015). Adicionalmente, os mosquitos capturados nas armadilhas espalhadas na mancha urbana da cidade são enviados para o laboratório de biologia molecular da empresa e analisados quanto a presença de dengue, zika e chikungunya, permitindo a geração de alertas de circulação viral e antecipando possíveis surtos (Eiras et al, 2018). A eficácia das ações pode ser avaliada continuamente, uma vez que, a cada semana, novas informações entomológicas são disponibilizadas. O fluxo de trabalho proposto pela Ecovec pode ser visto na figura 24.



Figura 24: Etapas do Monitoramento Integrado do *Aedes*, MI *Aedes*®. Adaptado de Ecovec 2022.

A análise de RT-PCR em tempo real em mosquitos coletados pelas armadilhas Mosquitrap® é parte do sistema do Monitoramento Integrado do *Aedes*, e o presente estudo buscou padronizar ensaios para detecção de dengue, zika e chikungunya a partir da utilização de sondas fluorogênicas, visando substituir o sistema de detecção hoje utilizado pelo laboratório de biologia molecular da Ecovec.

Atualmente o Laboratório de Biologia Molecular da Ecovec utiliza o *Sybr Green* como sistema de detecção para realizar as análises de dengue, zika e chikungunya, e, apesar apresentarem bons resultados, fatores como longo tempo de ciclagem e consequente demora para liberação de resultados, dimerização de iniciadores levando a interpretação errônea dos dados gerados e possibilidade de incremento de sensibilidade na reação foram determinantes para avaliação de novas metodologias para detecção de patógenos.

Com intuito de diminuir o tempo e custo do projeto na fase de padronização dos ensaios, as sondas fluorogênicas foram desenhadas e sintetizadas baseadas nos iniciadores para detecção de dengue, zika e chikungunya já utilizados no laboratório.

Para o desenho das sondas, foram levados em consideração diversos parâmetros descritos na literatura, dentre eles o tamanho dos fragmentos sintetizados, que deveriam ter entre 18 a 30 nucleotídeos, (DENV *probe*: 25bp; CHIKV *probe*: 28 bp; ZIKV *probe*: 28bp), conteúdo G/C próximo de 50% (DENV *probe*: 52%; ZIKV *probe*: 48,4%; CHIKV *probe*: 46,4%) e temperatura de anelamento (T_m) maior que a T_m dos iniciadores já utilizados. Após a análise *in silico*, as sondas para dengue, zika e chikungunya foram sintetizadas.

Para a fase de padronização dos ensaios individuais, foram realizados testes para avaliar as melhores condições de amplificação na RT-qPCR em tempo real, tais como melhor concentração de iniciadores e sondas e condições de ciclagem. A bula do fabricante do *mastermix* utilizado no estudo recomenda que as sondas estejam com concentração final de 150 a 250 nM na reação. Resultados mostraram que a concentração de 150 nM da sonda para o ensaio de DENV era satisfatória, e esse valor foi utilizado no estudo. Para zika e chikungunya, a concentração que obteve melhores resultados foi de 250 nM.

Análises realizadas mostraram que o coeficiente de correlação dos ensaios apresentou valores acima de 0,97, indicando boa confiança ao correlacionar valores de C_q e a quantidade de amostra. A eficiência das reações variou de 96,79% a 107,12% (tabela 8), todos dentro da faixa aceitável para a fase de padronização dos ensaios.

Também foi necessário determinar se as sondas desenhadas eram específicas e se havia reação cruzada entre elas. Após vários ensaios executados para este fim, foi verificado que nenhuma sonda era capaz de emitir fluorescência quando submetidas a testes com iniciadores não específicos, e não foi observada amplificação quando realizados testes com vírus alheios ao protocolo de detecção para que foram desenvolvidas.

A partir dessas análises e ensaios foi que se padronizou o protocolo padrão para os testes que foram executados em amostras contendo mosquitos *Aedes aegypti*.

Para a fase de validação em campo, as 30 amostras descritas na tabela 2 foram utilizadas e todas apresentaram boa amplificação para seus ensaios (tabela 13, 14 e 15; figura 18, 19 e 20), confirmando os resultados obtidos pela detecção com *Sybr Green* (dados não mostrados). Não foi possível estabelecer análise comparativa das duas metodologias (uso de agentes intercalantes e sondas fluorogênicas), pois o volume de amostra purificada disponível não seria suficiente para suprir as demais fases do estudo.

A amostra positiva para zika vírus apresentou Cq mais elevado (31,1), e para descartar a possibilidade de amplificação por DNA genômico na amostra foi realizado um teste sem adição da enzima transcriptase, que não apresentou resultado positivo (dados não mostrados). Foi elaborado um teste com maior volume de mix, a fim de observar melhoria no Cq da amostra de campo, mas não houve ganho considerável que justificasse a utilização de mais reagentes para detecção de ZIKV. Foi então levantada a hipótese de uma possível degradação do material analisado, visto que a amostra estava armazenada em freezer -80°C desde 2017.

Durante a fase de validação em amostras de campo foi observado que as curvas para detecção de DENV apresentaram Cq menores, se comparadas as curvas de ZIKV e CHIKV. Essa tendência também pode ser vista em diversos estudos que buscam determinar um limiar de dose infecciosa mínima necessária para infecção em mosquitos (Powers et al, 2017; Vazeille et al, 2019; Xu et al, 2020). Tais estudos mostram que a carga viral necessária para infectar *Aedes* é maior para dengue (10^4 UFP), enquanto zika é o que circula com menor carga viral e títulos de 10^3 UFP são

suficientes para infectar o mosquito e iniciar o ciclo de disseminação e transmissão viral no *Aedes*.

Para as reações *biplex* optou-se por fixar a concentração das sondas em 250 nM para todos os ensaios, visto que outros grupos que adotaram essa estratégia obtiveram sucesso em suas análises. A concentração mais elevada de iniciadores nos ensaios menos favorecidos, recomendação do fabricante do *mastermix*, foi o ponto de partida para a padronização desta fase.

Observa-se que o ensaio *biplex* para DENV e CHIKV em amostras controle é o que apresenta melhores resultados, com maior emissão de fluorescência e Cq mais precoce (DENV: Cq médio de 16,2 e CHIKV: Cq médio de 19,6). A reação *biplex* para DENV e ZIKV mostra um inesperado deslocamento de Cq para os dois alvos e não foi encontrado um motivo plausível que pudesse explicar tal resultado. Um teste realizado nivelando a concentração dos iniciadores na reação não demonstrou qualquer melhoria no resultado. Quando ZIKV é analisado com CHIKV, há boa amplificação para os dois ensaios, com média de Cq 22,1 para o ensaio de ZIKV e média de Cq de 20,3 para CHIKV.

Lastimavelmente, quando as amostras de campo foram submetidas às análises *biplex*, não foi possível verificar as curvas de amplificação que acusam o sucesso da reação. Todos os testes conduzidos nessa fase só apresentaram resultados em amostras controle. As amostras de dengue, mais abundantes no laboratório, foram submetidas a novas purificações, considerando a hipótese de que possíveis inibidores poderiam justificar o insucesso dessa fase, mas os resultados persistiram.

Não é a primeira vez que o Laboratório de Biologia Molecular testemunha resultados que não amplificam amostras de campo. Em 2018 uma empresa de diagnóstico enviou para a Ecovec um kit triplex para detecção simultânea de dengue, zika e chikungunya, e os resultados foram semelhantes aos que obtivemos neste estudo. Os controles fornecidos pelo kit comercial amplificavam, mas as amostras de campo não apresentavam resultado.

Quando amostras controle foram testadas para o ensaio multiplex, só houve amplificação para o ensaio de CHIKV e discreta amplificação para DENV (dados não mostrados).

CONCLUSÕES

- 1 – Foi possível padronizar reações para detecção de DENV, ZIKV e CHIKV, a partir da utilização de sondas fluorogênicas.
- 2- As sondas são específicas ao seu tipo viral, não ocorrendo reação cruzada com os demais vírus utilizados no presente trabalho.
- 3 – Os ensaios padronizados se mostraram sensíveis, a ponto de apresentarem curvas de amplificação para concentrações de 10 UFP para zika e chikungunya e 1 UFP para dengue vírus.
- 4 – Foi possível validar ensaios individuais em amostras de *Aedes aegypti*.
- 5 – As reações *duplex* para DENV/CHIKV, DENV/ZIKV e CHIKV/ZIKV funcionam em amostras controle.
- 6 – Foi possível realizar a substituição completa da metodologia *Sybr Green* no Laboratório de Biologia Molecular da Ecovec pela metodologia Taqman.
- 7 – Estudos ainda são necessários para validar reações *duplex* em amostras de campo.
- 8 – O desenvolvimento de métodos para detecção precoce de DENV, ZIKV e CHIKV pode auxiliar no controle da doença pela adoção de medidas de bloqueio em um estágio onde a transmissão ainda é inicial.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, R. **Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses**. *Advances in vírus research*. Vol 59. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7252169/>>. Acesso em: 14 jul. 2021.
- ARBOLEDA, S.; JARAMILLO-O., N.; PETERSON, A. T. Spatial and temporal dynamics of *Aedes aegypti* larval sites in Bello, Colombia. **Journal of Vector Ecology**, v. 37, n. 1, p. 37–48, 1 maio 2012.
- BALM, M. N. D. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, 18 jul. 2012.
- BOOM R. et al. **Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1691208/>>.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 26 fev. 2009.
- BUSTIN, S. A. et al. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Molecular Biology**, v. 11, n. 1, p. 74, 2010.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1084–1086, jun. 2014.
- CODEÇO, C. T.; et al. Surveillance of *Aedes aegypti*: Comparison of House Index with Four Alternative Traps. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.2, 2015
- CHAMBERS, T. J. et al. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 649–688, out. 1990.
- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 155–166, jul. 2006.
- CHOW, V. T. et al. Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 5, p. 578–586, 1 maio 1998.
- CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80 (23), p: 11418-11431, 2006.
- COELHO, G. E. et al. Dynamics of the 2006/2007 dengue outbreak in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 535–539, 1 set. 2008.
- COELHO, G. E. **Relação entre o índice de infestação predial (IIP), obtido pelo levantamento rápido (LIRAA) e intensidade de circulação do vírus do Dengue**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Instituto de Saúde Coletiva. Universidade Federal da Bahia. Salvador. 2008.

CUNHA, MS. **Validação e uso da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-qPCR) para a vigilância e diagnóstico de flavivírus transmitidos por mosquitos circulantes no Brasil**. 2018. 142 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DE MELO, D. P. O.; SCHERRER, L. R.; EIRAS, Á. E. Dengue Fever Occurrence and Vector Detection by Larval Survey, Ovitrap and MosquiTRAP: A Space-Time Clusters Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e42125, 25 jul. 2012.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283–285, mar. 2015.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

Eiras, A.E. **Relatório de Avaliação dos Resultados do Estudo Multicêntrico do Uso de Armadilhas para Captura de Aedes aegypti**. Relatório Técnico submetido ao Ministério da Saúde em Resposta ao Ofício 853/GAB/SVS/MS de 13 de abril de 2006, 52p.

EIRAS, Á. E.; RESENDE, M. C. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for Aedes aegypti monitoring and control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. suppl 1, p. S45–S58, 2009.

EIRAS, A. E.; RESENDE, M. C. Preliminary evaluation of the “Dengue-MI” technology for Aedes aegypti monitoring and control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 45-58, 2009

EIRAS, A. E., RESENDE, M. C., ACEBAL, J. L., PAIXÃO, K. S. New cost-benefit of Brazilian technology for vector surveillance using trapping system. **Intechopen**. Malaria. Ed: Fyson H. Kasenga. 2018

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7232–7243, nov. 1995.

FERREIRA, D. et al. Meteorological variables and mosquito monitoring are good predictors for infestation trends of Aedes aegypti, the vector of dengue, chikungunya and Zika. **Parasites & Vectors**, v.10, n.78, p.1-11, 2017

FOCKS, D. A. A Review of Entomological Sampling Methods and Indicators for Dengue Vectors, World Health Organization. **Revista Tropical Disease Research**, v.1, n.1, p.1-35, 2003.

FOURNET, F., JOURDAIN, F., BONNET, E., DEGROOTE, S., RIDDE, V. Effective surveillance systems for vector-borne diseases in urban settings and translation of the data into action: a scoping review. **Infectious diseases of poverty**, v. 7 n. 1, p. 99-108, 2018

FRASÃO G, MACIEL V, BOGAZ C. **Mato Grosso do Sul ganha reforço de R\$ 5,8 milhões para reabilitar crianças** [Internet]. Portal da Saúde SUS. 2017. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/27967-mato-grosso-do-sul-ganha-reforco-der-5-8-milhoes-para-reabilitar-criancas>

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Dengue, o vírus e o vetor**. 2009. Disponível em: <<https://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>> Acesso em: 14 jul. 2021.

GIBBONS, R. V. Dengue: an escalating problem. **BMJ**, v. 324, n. 7353, p. 1563–1566, 29 jun. 2002.

GOMES, A. C. Medidas dos níveis de infestação urbana para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* em programas de Vigilância Entomológica. **Informes Epidemiológico do SUS**, v.7, n.3, p.49-57, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 55–57, jun. 1995.

HARRINGTON, L. C., SCOTT, T. W., LERDTHUNSNEE, K. COLEMAN, R. C. et al. Dispersal of the Dengue Vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 209-220, 2005

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estimativas da população brasileira residente no Brasil e Unidades da Federação**. 2020. Disponível em: <https://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_de_Populacao/Estimativas_2021/POP2021_20220711.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2021.

KASSAVETIS, P. et al. Zika virus–associated Guillain-Barré syndrome variant in Haiti. **Neurology**, v. 87, n. 3, p. 336–337, 6 maio 2016.

KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of biological research (Thessalonike, Greece)**, v. 27, p. 5, 4 mar. 2020.

KING, C.-C. et al. Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, 21 maio 2008.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, jun. 1999.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LINDENBACH, Brett; THIEL, H.J.; RICE, C.M. Flaviviridae: The viruses and their replication. 5 edição. Ed. Lippincott-Raven. Philadelphia. **Fields Virology**. 2007.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; MACIEL-DE-FREITAS R.M.; EIRAS A.E. Field Evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a New Trap for Capturing Adult *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 321-325, 2009.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine**, v. 10, n. S12, p. S98–S109, 30 nov. 2004.

MARKOFF, L. 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 177–228, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. **Série A. Normas Técnicas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Série A. Normas Técnicas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. **Série A. Normas Técnicas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dengue: Diagnóstico e manejo. **Série A. Normas Técnicas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, 2013

OLIVEIRA, SS. **Análise espacial e temporal da infestação por Aedes aegypti mensurada por ovitrampas para geração de alerta precoce de dengue no município do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2018.

OLIVEIRA, Wanderson Kleber de et al. Increase in reported prevalence of Microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy - Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 9, p. 242–247, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE. Plano de ação sobre entomologia e controle de vetores 2018-2023. **70 Sessão do comitê regional da OMS para as Américas**. Washington, DC, 2018.

PEPIN K. M., MARQUES-TOLEDO C., SCHERER L., MORAIS M. M., ELLIS B., EIRAS A. E. Cost-effectiveness of novel system of mosquito surveillance and control, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n.4, p. 542–550, 2013

PEPIN, K. M., LEACH, C. B., MARQUES-TOLEDO, C. et al. Utility of mosquito surveillance data for spatial prioritization of vector control against dengue viruses in three Brazilian cities. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 98, 2015

POWERS, A. M.; LEDERMANN, J. P.; BORLAND, E. M. Minimum infectious dose for chikungunya virus in Aedes aegypti and Ae. albopictus mosquitoes. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 41, p. 1, 8 jul. 2017.

PREFEITURA DE ARARAQUARA. **Operação da Prefeitura contra o avanço da dengue segue nesta quinta (2)**. Disponível em: <<https://www.araraquara.sp.gov.br/noticias/2022/junho/01/operacao-da-prefeitura-contr-o-avanco-da-dengue-segue-nesta-quinta-2>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

PREFEITURA DE PORTO ALEGRE. **Vigilância em Saúde ajusta distribuição de armadilhas de monitoramento de Aedes aegypti | Prefeitura de Porto Alegre**. Disponível em: <<https://prefeitura.poa.br/sms/noticias/vigilancia-em-saude-ajusta-distribuicao-de-armadilhas-de-monitoramento-de-aedes>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

ROWLEY, W. A.; GRAHAM, C. L. The effect of age on the flight performance of female aedes aegypti mosquitos. **Journal of Insect Physiology**, v. 14, n. 5, p. 719–728, 1 maio 1968.

SALVADOR, EA. **Caracterização do ciclo de infecção do Zika vírus em mosquitos Aedes aegypti**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2021.

SCHATZMAYR, H. G. Dengue situation in Brazil by year 2000. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 179–181, 2000.

SCHULER-FACCINI, L. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, 2016.

SHEPARD, D. S. et al. Approaches to Refining Estimates of Global Burden and Economics of Dengue. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 20 nov. 2014.

SILVA, M., RODRIGUES M., PAPLOSKI I., KIKUTI M. et al. Accuracy of Dengue Reporting by National Surveillance System. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 336-339, 2016.

SIMPSON, D. I. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p. 335–338, 1 jul. 1964.

SVS. Boletim Epidemiológico - **Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2015**. In: Saúde SdVe. Ministério da Saúde 2015

SVS. Boletim Epidemiológico - **Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2016**. In: Saúde SdVe. Ministério da Saúde 2016

SVS. Boletim Epidemiológico - **Vigilância em Saúde no Brasil 2003- 2019**. In: Saúde SdVe. Ministério da Saúde 2019. SVS.

SVS. Boletim Epidemiológico - **Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2020**. In: Saúde SdVe. Ministério da Saúde 2020.

SVS. Boletim Epidemiológico - **Monitoramento dos casos arboviroses até a Semana Epidemiológica 24, 2022**. In: Saúde SdVe, editor. Ministério da Saúde 2022

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **J. bras. econ. saúde (Impr.)**, p. 267–276, 2017.

VAZEILLE, M. et al. Zika virus threshold determines transmission by European Aedes albopictus mosquitoes. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 1668–1678, 2019.

XU, Y. et al. Defervescent dengue patients might be a potential source of infection for vector mosquitoes. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, 2 mar. 2020.

WASHINGTON, D. **CONSELHO DIRETOR 70 a SESSÃO DO COMITÊ REGIONAL DA OMS PARA AS AMÉRICAS**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=56-directing-council-portuguese-9966&alias=45776-cd56-11-p-pda-entomologia-776&Itemid=270&lang=pt>. Acesso em: 18 jul. 2022.

WHO | **Chikungunya**. Disponível em: <<https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/index.html>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Clinical management of dengue**. World Health Organization, 2012. < Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/76887>>. Acesso em 21 de dezembro de 2021

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Entomological surveillance for Aedes spp. in the context of Zika virus: interim guidance for entomologists**. World Health Organization, 2016. < Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204624>. > Acesso em 21 de dezembro de 2021

WU, S.-J. L. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816–820, jul. 2000.

YADAV, P. D. et al. Zika virus outbreak in Rajasthan, India in 2018 was caused by a virus endemic to Asia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 199–202, 2019.

ZANANDREZ, LFR. **Estudo comparativo do desenvolvimento de inovações em ICT's e de produtos em empresas: o caso de uma tecnologia para o monitoramento do Aedes aegypti**. Dissertação (Mestrado em Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual). Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2020.