



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
SUSPEITA DE ARBOVIROSES EM UMA UNIDADE MUNICIPAL DE
SAÚDE DE GOIÂNIA-GOIÁS**

JORDANA FARIAS CORRÊA

**GOIÂNIA-GO
2020**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das dissertações e teses disponibilizados são de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o autor e o orientador firmam o compromisso de que ele não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

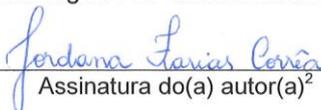
Nome completo do autor: Jordana Farias Corrêa

Título do trabalho: Avaliação Sorológica e Molecular de Pacientes com Suspeita de Arboviroses em uma Unidade Municipal de Saúde de Goiânia-Goiás

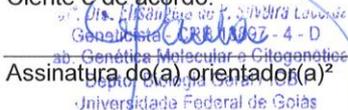
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²
Geneticista - PRPG - 4 - D
Dep. Genética Molecular e Citogenética
Univ. Católica de Goiás - UCG

Data: 10 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento, imagens coladas não serão aceitas.

JORDANA FARIAS CORRÊA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
SUSPEITA DE ARBOVIROSES EM UMA UNIDADE MUNICIPAL DE
SAÚDE DE GOIÂNIA-GOIÁS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica e Genética

Orientador: Prof^a Dr^a Elisângela de Paula
Silveira Lacerda

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo
Anunciação

GOIÂNIA-GO

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Farias Corrêa, Jordana
Avaliação Sorológica e Molecular de Pacientes com Suspeita de Arboviroses em uma Unidade Municipal de Saúde de Goiânia-Goiás [manuscrito] / Jordana Farias Corrêa. - 2020.
XV, 51 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda; co orientador Dr. Carlos Eduardo Anunciação.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Arboviroses. 2. Teste Rápido. 3. Diagnóstico Molecular. 4. Isolamento Viral. 5. Células Vero. I. de Paula Silveira Lacerda, Elisângela, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 505 da sessão de Defesa de Dissertação de **Jordana Farias Corrêa**, que confere o título de Mestre(a) em Ciências Biológicas, na área de concentração em Bioquímica e Genética.

Aos dezoito dias do mês de fevereiro de 2020, a partir da(s) 09:00 h, no(a) Sala de Videoconferência do Centro Integrado de Aprendizagem em Rede da Universidade Federal de Goiás, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA DE ARBOVIROSES EM GOIÂNIA-GOIÁS”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Professor(a) Doutor(a) Elisângela de Paula Silveira Lacerda (ICB/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor(a) Doutor(a) Alice Laschuk Herlinger (UFRJ), membro titular externo, cuja participação ocorreu através de videoconferência; Professor(a) Doutor(a) Guilherme Rocha Lino de Souza (ICB/UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Professora Doutora Elisângela de Paula Silveira Lacerda, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos dezoito dias do mês de fevereiro de 2020.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

“AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA DE ARBOVIROSES EM UMA UNIDADE MUNICIPAL DE SAÚDE DE GOIÂNIA-GOIÁS”



Documento assinado eletronicamente por **Elisângela De Paula Silveira Lacerda, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2020, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Rocha Lino De Souza, Professor do Magistério Superior**, em 18/02/2020, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alice Laschuk Herlinger, Usuário Externo**, em 18/02/2020, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1141423** e o código CRC **B902D624**.

JORDANA FARIAS CORRÊA

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE PACIENTES COM
SUSPEITA DE ARBOVIROSES EM UMA UNIDADE MUNICIPAL DE
SAÚDE DE GOIÂNIA-GOIÁS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.
Universidade.....

Prof. Dr.
Universidade

Profa. Dra.
Universidade.....

Aprovada em: ____/____/_____

Dedicatória

Aos meus pais, Marcos Augusto Montel Corrêa e Janete Farias dos Santos Corrêa, por todo amor e apoio que me permitiram chegar até aqui.

À minha irmã, Morgana, que sempre me apoiou, estendendo sua mão em toda esta trajetória.

Ao meu filho, Davi, meu amor maior, um dos maiores motivos dos meus esforços.

Agradecimentos

À minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Elisângela de Paula Silveira Lacerda, por conceder-me a oportunidade de realizar este trabalho, pela exímia orientação e pelo brilhante profissionalismo.

Aos meus amados pais, Marcos e Janete, pelo apoio fundamental, o qual me permitiu atingir objetivos tão sonhados.

Ao meu tão amado filho, Davi, por todo amor, doçura e compreensão que preencheram meu coração e me deram força nesta caminhada.

À minha querida irmã, Morgana, por todo apoio e auxílio prestados a mim durante todo este percurso.

À minha querida amiga Thallita pela sincera receptividade durante minha chegada ao laboratório e por ensinar-me técnicas valiosas de cultivo celular.

A todas minhas amigas e a todos meus amigos do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética que contribuíram de maneira crucial para a realização deste projeto.

Às Professoras Dr^a Daniela Melo e Dr^a Mariana Teles por disponibilizarem gentilmente equipamentos necessários à realização de determinados experimentos deste trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Eduardo Anunciação pela co-orientação que contribuiu de maneira muito importante.

Aos Professores Dr. Marco Túlio Zapata, Dr. Clever Cardoso e Dr^a Sandra Brunini pela grandiosa colaboração e por todo apoio que permitiram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo financiamento deste projeto.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) por transmitirem de maneira grandiosa conhecimentos essenciais.

À Universidade Federal de Goiás, da qual sinto muito orgulho em fazer parte.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	VIII
Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract	XIII
1 Introdução.....	1
1.1 <i>Alphavirus</i>	2
1.1.1 Chikungunya Vírus.....	3
1.1.2 Mayaro Vírus.....	4
1.2 Flavivírus.....	6
1.2.1 Zika Vírus.....	6
1.2.2 Dengue Vírus.....	7
1.3 Considerações Sobre os Vetores.....	8
1.4 Diagnóstico Clínico.....	9
1.5 Diagnóstico Sorológico.....	9
1.5.1 Teste Imunocromatográfico.....	9
1.6 Diagnóstico Molecular.....	11
2 Objetivos.....	12
2.1 Objetivos Gerais.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 Metodologia.....	13
3.1 População de Estudo e Coleta das Amostras.....	13
3.2 Critérios de Elegibilidade.....	13
3.2.1 Critérios de Inclusão.....	13
3.2.2 Critérios de Exclusão.....	14
3.3 Fluxograma de Estudo.....	14
3.4 Processamento das amostras.....	15
3.5 Triagem Sorológica por Teste Rápido.....	15
3.6 Extração de RNA.....	16
3.7 RT-qPCR.....	16
3.8 RT-PCR Para Detecção de MAYV.....	17
3.8.1 Primeira Etapa.....	17

3.8.2 Segunda Etapa.....	17
3.9 Isolamento Viral em Cultivo Celular.....	19
3.9.1 Infecção Viral.....	19
3.9.2 Extração de RNA do Sobrenadante.....	20
3.9.3 Síntese de cDNA.....	20
3.9.4 RT-PCR Para ZIKV.....	21
3.9.5 Confirmação de Coinfecção Por MAYV.....	22
3.10 Análise Estatística.....	23
4 Resultados	24
4.1 Resultados Triagem Sorológica por Teste Rápido.....	24
4.2 Resultados Moleculares para ZIKV, DENV e CHIKV.....	24
4.3 Sensibilidade e Especificidade	27
4.4 Coinfecções Observadas.....	29
4.5 Resultados Isolamento Viral em Cultivo Celular.....	30
5 Discussão.....	34
6 Conclusões.....	38
Referências Bibliográficas.....	40
Anexo	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arbovirus- *Arthropode Borne Virus*
CAIS- Centro de Assistência Integrado à Saúde
cDNA- DNA Complementar
Ct- *Cycle Threshold*
CHIKV- Chikungunya Vírus
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
DENV- Dengue Vírus
DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
EEV- Vírus da Encefalite Equina Ocidental
ELISA- Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FN- Falso Negativo
FP- Falso Positivo
GBS- Síndrome de Guillain-Barré
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
JEV- Vírus da Encefalite Japonesa
Kb- Kilobase
MAYV- Mayaro Vírus
mL- Mililitro
mM- Milimolar
mRNA- RNA Mensageiro
nm- Nanômetro
NSP1- Proteína Não Estrutural 1
NSP2- Proteína Não Estrutural 2
NSP3- Proteína Não Estrutural 3
NSP4- Proteína Não Estrutural 4
nm- Nanômetro
NCBI- *National Center of Biotechnology Information*
ONNV- Vírus O'nyoung Nyoung
ORF- Fase Aberta de Leitura
PBS- Tampão Salina-Fosfato
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

prM- Pré-Membrana

PRNT- Teste de Redução e Neutralização de Placas

qRT-PCR- Reação da Transcriptase Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

RNA- Ácido Ribonucleico

rpm- Rotações Por Minuto

RRV- Vírus do Rio Ross

RT-PCR- Reação da Transcriptase Reversa Seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

SFB- Soro Fetal Bovino

SFV- Vírus da Floresta Semliki

SINV- Vírus Sindbis

TBE- Tampão Tris-Borato-EDTA

TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTR- Região Não Traduzida

VEEV- Vírus da Encefalite Equina Oriental

VPN- Valor Preditivo Negativo

VPP- Valor Preditivo Positivo

WEEV- Vírus da Encefalite Equina Ocidental

YFV- Vírus da Febre Amarela

ZIKV- Zika Vírus

µL- Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma dos <i>Alphavirus</i>	2
Figura 2 – Achados clínicos em pacientes com chikungunya.....	4
Figura 3 – Diagrama esquemático do genoma e proteínas do MAYV.....	5
Figura 4 – Hematoma em um paciente com dengue severa.....	8
Figura 5- Diagrama esquemático de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral.....	10
Figura 6 – Fluxograma de trabalho.....	14
Figura 7– Percentual dos resultados moleculares para ZIKV.....	25
Figura 8 – Percentual dos resultados moleculares para DENV.....	26
Figura 9 – Percentual dos resultados moleculares para CHIKV.....	26
Figura 10 – Percentual dos resultados moleculares para MAYV.....	26
Figura 11 – Coinfecções observadas após análise molecular.....	29
Figura 12 – A. Células vero antes da aplicação do inóculo B. Células vero após a aplicação do inóculo (primeira passagem viral).....	31
Figura 13 – A. Células vero antes da aplicação do inóculo B. Células vero após a aplicação do inóculo (segunda passagem viral).....	31
Figura 14 – A. Células vero antes da aplicação do inóculo B. Células vero após a aplicação do inóculo (terceira passagem viral), na primeira, segunda e terceira passagem (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a) deste vírus nas células.....	31
Figura 15– Géis de agarose a 1,5% (I e II), demonstrando as amplificações dos fragmentos de ZIKV (100 pb), na primeira, segunda e terceira passagem (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a) deste vírus nas células.....	32
Figura 16– Géis de agarose a 1,5% (I e II), demonstrando as amplificações dos fragmentos de MAYV (925 pb), na primeira, segunda e terceira passagem (1 ^a , 2 ^a e 3 ^a) deste vírus nas células.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de MAYV.....	18
Tabela 2 – Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de ZIKV.....	21
Tabela 3 – Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de MAYV.....	22
Tabela 4 – Resultados Triagem Sorológica Por Teste Rápido.....	24
Tabela 5 – Resultados Moleculares Para ZIKV, DENV e CHIKV.....	25
Tabela 6 – Sensibilidade e Especificidade do Kit ZIKV IgM Bahiafarma®.....	27
Tabela 7 – Sensibilidade e Especificidade do Kit DENV IgM Bahiafarma®.....	28
Tabela 8 – Sensibilidade e Especificidade do Kit CHIKV IgM Bahiafarma®.....	28
Tabela 9 – Perfil Molecular das Amostras Submetidas ao Isolamento Viral.....	30

RESUMO

Os arbovírus têm sido motivo de grande preocupação para a saúde humana a nível mundial. No Brasil, as arboviroses de maior incidência, são Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV), as quais apresentam sintomatologia semelhantes, assim como ocorre também na febre Mayaro (MAYV), sendo desta forma, imprescindível a realização de diagnóstico diferencial para a confirmação destas infecções. O presente estudo tem como objetivo, realizar avaliação sorológica e molecular de pacientes com suspeita de arboviroses, atendidos em uma unidade pública de saúde do município de Goiânia, Goiás. Foram, então, coletadas 459 amostras no período compreendido entre o dia 30 de março de 2017 e 20 de junho de 2018. Para avaliação sorológica, foram utilizados kits comerciais de diagnóstico rápido Bahiafarma® para detecção dos anticorpos IgM e IgG para ZIKV, DENV e CHIKV. A avaliação molecular foi realizada por meio da técnica de RT-qPCR e PCR convencional, para detecção do genoma viral. Posteriormente, 11 amostras foram selecionadas e submetidas à técnica de isolamento viral em cultivo de celular. Como resultados sorológicos, foram obtidas amostras IgM reagentes, sendo 0,7% para ZIKV e 8,5% para DENV, porém nenhuma para CHIKV. Com relação à avaliação molecular foi obtido um percentual de 12,6% amostras positivas para ZIKV; 28,3% positivas para DENV; 2,2% positivas para CHIKV e 17% positivas para MAYV. Foram obtidas, respectivamente, sensibilidade e especificidade de 5% e 84% para Bahiafarma® anti-DENV IgM; especificidade de 99% para Bahiafarma® anti-ZIKV IgM, e especificidade de 42% para Bahiafarma® anti-CHIKV IgM. O isolamento viral em cultivo celular não apresentou efeito citopático evidente, no entanto, as 11 amostras foram positivas para ZIKV e duas amostras foram positivas para MAYV, após RT-PCR realizada a partir do sobrenadante celular. Embora as arboviroses cursem de maneira benigna na maioria das vezes, casos graves podem ocorrer com sequelas irreversíveis. Desta forma, é fundamental que a confirmação de infecção por arbovírus seja realizada por métodos diagnósticos laboratoriais sensíveis.

Palavras-chave: Arboviroses; Teste Rápido; Diagnóstico Molecular; Isolamento Viral; Células Vero.

ABSTRACT

The arboviruses has been a great concern to human health in the worldwide. In Brazil the most prevalents arboviruses are Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV), which presents similar sintomatology, as well as Mayaro fever (MAYV), therefore, it is essential to perform laboratorial diagnosis to confirm these infections. The present study aims to perform serological and molecular evaluation of patients with suspected arboviruses dengue-like, assisted at a public health unity in the city of Goiânia, Goiás. A total of 459 samples were collected from March, 30th, 2017 to June, 20th, 2018. For the serological evaluation, commercial Bahiafarma® rapid diagnosis kits were used to detect IgM and IgG antibodies for ZIKV, DENV and CHIKV. The molecular evaluation was performed by RT-qPCR and conventional PCR technique, to detect the viral genome. Subsequently, 11 samples were select and submitted to the viral isolation in cell culture. As a serological results, samples IgM reagents were obtained, 0.7% for ZIKV and 8.5% for DENV, however no one for CHIKV. Regarding the molecular evaluation it was obtained a percentage of 12.6% positive samples for ZIKV; 28.3% positive samples for DENV; 2.2% positive samples for CHIKV and 17% positive for MAYV. Were obtained, respectively, sensitivity and specificity of 5% and 84% for Bahiafarma® anti-DENV IgM; specificity of 99% for Bahiafarma® anti-ZIKV IgM, and specificity of 42% for for Bahiafarma® anti-CHIKV IgM. Viral isolation in cell culture had no evident cytopathic effect, however, the 11 samples were positive for ZIKV and two samples were positive for MAYV after RT-PCR performed from the cell supernatant. Although arboviruses are benign in most cases, severe cases may occur with irreversible sequelae. Thus, it is essential that confirmation of arbovirus infection be performed by sensitive laboratory diagnostic methods.

Keywords: Arboviruses; Rapid Test; Molecular Diagnosis; Viral Isolation; Vero Cells.

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus (do inglês Arthropode Borne Virus) compõem um conjunto de vírus, os quais são transmitidos através de artrópodes como mosquitos hematófagos em especial pertencentes ao gênero *Aedes*. A maioria dos arbovírus pertence aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e têm sido motivo de grande preocupação para a saúde humana a nível mundial (1).

Esse grupo de vírus, cujo genoma é constituído por RNA apresentam grande plasticidade genética e elevada frequência de mutações, o que os permite adaptar-se a hospedeiros vertebrados e invertebrados. A transmissão e amplificação dos arbovírus são favorecidas pelas rápidas mudanças climáticas, desmatamento, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e precariedade das condições sanitárias, o que tem tornado as arboviroses importantes ameaças em regiões tropicais (2,3).

No Brasil, tendo em vista o atual contexto epidemiológico, os arbovírus de maior circulação são DENV, ZIKV e CHIKV. As manifestações clínicas decorrentes das infecções por estes vírus apresentam similaridades, desta forma, a cocirculação destes agentes no país faz com que o manejo clínico torne-se difícil. Além disso, a interação entre arboviroses pode resultar em viremias mais intensas e servir como gatilho para o desenvolvimento de doenças autoimunes como a síndrome de Guillain-Barré (4–7).

Alguns fatores como o potencial de dispersão, a capacidade de adaptação a novos ambientes e hospedeiros, a possibilidade de causar epidemias extensas e a ocorrência de um grande número de casos graves com acometimento neurológico, articular e hemorrágico contribuem para que as arboviroses sejam um crescente problema de saúde pública no mundo. Assim, o enfrentamento de arboviroses exige políticas e intervenções que envolvam não somente a área da saúde, como também outros setores sociais (8).

1.1 *Alphavirus*

Os *Alphavirus* possuem capsídeo icosaédrico com aproximadamente 70 nm de diâmetro e material genético constituído por RNA fita simples de polaridade positiva, com a extremidade 5' capeada e extremidade 3' poliadenilada e comprimento estimado entre 10 e 12 kb (9). O genoma destes vírus expressa oito genes que codificam quatro proteínas estruturais, C, E3, E2, 6k e E1, e quatro proteínas não estruturais, NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4 (Figura 1) (10).

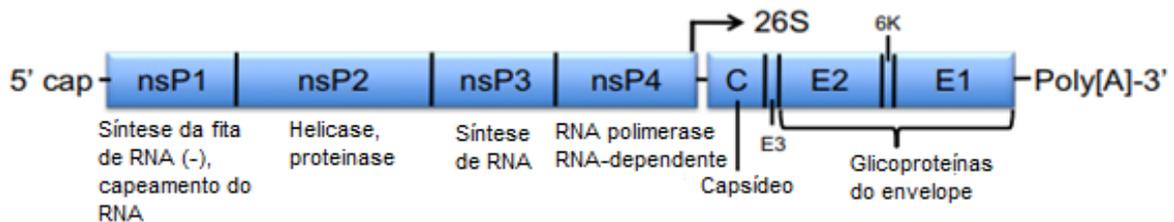


Figura 1. Organização do genoma dos *Alphavirus* listando abaixo as principais funções proteicas. Adaptado de: Weaver et al, 2012.

Diversas manifestações clínicas que variam desde febres a doenças neurológicas podem ser causadas por *Alphavirus*. De acordo com a distribuição geográfica os *Alphavirus* do Velho Mundo são representados principalmente por CHIKV, SFV (vírus da Floresta Semliki), ONNV (O'nyoung Nyoung vírus), SINV (Sindbis vírus), MAYV (Mayaro vírus) e RRV (vírus do Rio Ross), os quais causam frequentemente febre e dores como artralgia e poliartralgia. Os principais representantes dos *Alphavirus* do Novo Mundo são VEEV (Vírus da Encefalite Venezuelana), EEV (vírus da Encefalite Equina Oriental) e WEEV (vírus da Encefalite Equina Ocidental) os quais causam geralmente encefalites (11,12).

Alterações ocorridas em um genoma viral podem alterar a sequência polipeptídica de proteínas e, em muitos casos, produzir vírus defeituosos incapazes de se replicar. No entanto, um vírus que desenvolve uma melhor infectividade pode, eventualmente, surgir na natureza. Além disso, a replicação de vírus de RNA só é possível em faixas limítrofes instáveis de erros e algumas mutações mantêm o conteúdo informativo das espécies, bem como a capacidade

de escapar da resposta imune do hospedeiro. Um exemplo importante de vírus mutante é o CHIKV, o qual é capaz de produzir pandemias (13).

1.1.1 Chikungunya Vírus

O CHIKV é um arbovírus zoonótico que foi isolado pela primeira vez em primatas africanos no ano 1952 e, de maneira semelhante ao DENV, é transmitido aos seres humanos em ciclos urbanos pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (14,15).

O genoma do CHIKV está empacotado em vírions semelhantes aos de outros *Alphavirus*, possuindo uma curta região não traduzida na extremidade 5' (UTR-*Untranslated Region*) e uma longa região na extremidade 3' com repetições diretas, as quais acredita-se, estarem associadas à adaptação do vírus ao vetor. Os receptores celulares do CHIKV ainda permanecem desconhecidos e a sua internalização ocorre por meio de endocitose mediada por clatrina, no entanto há evidência de que múltiplos mecanismos de entrada podem ser utilizados pelo vírus (16,17).

A inoculação do CHIKV no organismo do hospedeiro ocorre via subcutânea e por meio do sistema linfático o vírus alcança diversos órgãos. O vírus replica-se na pele, espalha-se para o fígado, baço e rins, os quais são considerados os sítios primários de replicação. As partículas virais podem alcançar os ossos, músculos e articulações aumentando, assim, a severidade da doença (18,19).

A fase aguda é considerada como sendo as três primeiras semanas da doença, sendo assim, os primeiros 21 dias de manifestações clínicas. Após o período de incubação, os indivíduos infectados apresentam febre alta, e mialgia intensa, sendo que algumas vezes pode ocorrer dor de cabeça e fotofobia. Uma característica da infecção por CHIKV é a poliartralgia, a qual é resultante de poliartrites e é geralmente bastante intensa. A poliartralgia frequentemente afeta simétrica e bilateralmente articulações de membros. Alguns exemplos de manifestações clínicas em pacientes com infecção por CHIKV podem ser observados na figura 2 (20).



Figura 2: Achados clínicos de pacientes em diferentes fases da doença. A: edema de membros inferiores. B: inflamação intensa no tendão de Aquiles. C: severas manifestações cutâneas na fase pós-aguda. D: o mesmo paciente referido em C com o desaparecimento das lesões. E: Restrição de movimentos nos membros superiores. F: Alopecia em paciente na fase crônica. Fonte: CUNHA & TRINTA, 2017.

1.1.2 Mayaro Vírus

O MAYV foi isolado pela primeira vez de soro de pacientes com quadro de febre em Trinidad no ano 1954 (21). Este vírus é classificado em três genótipos, os quais são D, L e N; o primeiro inclui cepas do Peru, Bolívia, Venezuela, Trinidad e Tobago e Guiana Francesa; o segundo originou-se no Haiti e Brasil; por fim, o terceiro foi isolado em 2010 no Peru (22,23).

O genoma do MAYV é estruturado conforme o genoma dos *alphavirus*, como pode ser observado na figura 3, onde a fase aberta de leitura (ORF-*open reading frame*) da extremidade 5' codifica as proteínas não estruturais, enquanto a ORF da extremidade 3' codifica as proteínas estruturais (figura 3) (24,25).

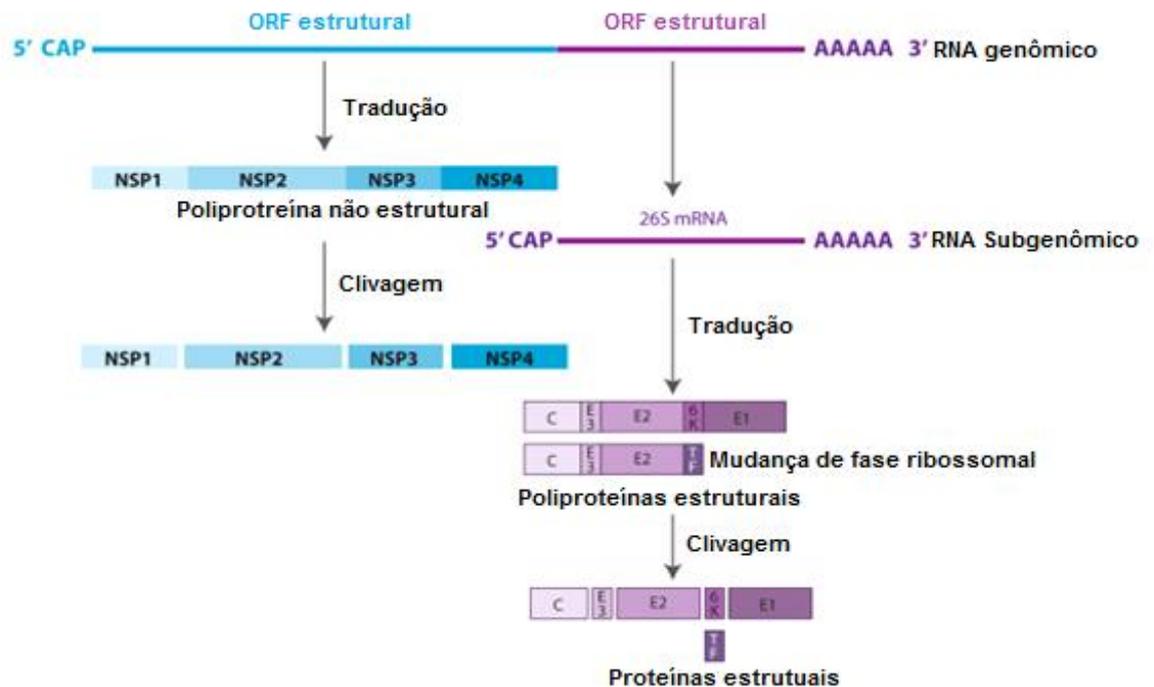


Figura 3: diagrama esquemático do genoma e das proteínas do MAYV, onde o RNA é mostrado em linha e as proteínas em caixas. Adaptado de: ACOSTA-AMAPUDIA et al, 2018.

No Brasil, um estudo realizado na região do Rio Negro em comunidades indígenas, demonstrou que um percentual de 41,5% dos indivíduos testados apresentaram anticorpos contra MAYV, o que traz evidências de que esta infecção é comum nesta região. A migração do MAYV para outras regiões do Brasil tem sido reportada, sendo que no ano 2000 três pacientes com a febre Mayaro, provavelmente adquirida na cidade de Camapuã, localizada no Centro-Oeste do país, viajaram ao estado de São Paulo, onde tiveram o diagnóstico da doença (26,27).

O MAYV causa uma doença incapacitante aguda que pode ser seguida por artralgia de longa duração em mais de 50% dos casos. Assim como ocorre na infecção por CHIKV, as dores nas articulações podem persistir por meses e o MAYV pode produzir severas complicações como febre intermitente, complicações neurológicas, miocardite e, em alguns casos, a morte (28,29).

1.2 Flavivírus

O genoma de todos os vírus do gênero *Flavivirus* é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb, o qual possui uma extremidade 5' UTR, uma longa ORF e uma extremidade 3' UTR. As extremidades 5' e 3' UTRs possuem aproximadamente 100 e 400-700 nucleotídeos, as quais são essenciais para o processo replicação viral (30).

Uma longa poliproteína é codificada pela ORF e processada por proteases virais e da célula hospedeira para produzir três proteínas estruturais, denominadas como capsídeo (C), premembrana/membrana (prM/M) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS) na seguinte ordem gênica: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-3' (30).

1.2.1 Zika Vírus

O ZIKV foi descoberto no ano de 1947 na floresta Zika, o que levou a esta denominação do vírus, localizada na península Entebbe, capital da República de Uganda, continente africano, quando pesquisadores realizavam um estudo relacionado à febre amarela em macacos Rhesus (31).

O genoma do ZIKV é constituído sob a estrutura do genoma característico de um flavivírus e estudos filogenéticos demonstram duas linhagens para este vírus, sendo elas designadas como Africana e Asiática. Muitas das proteínas do ZIKV possuem funções conservadas comparadas às proteínas ortólogas em outros vírus do mesmo gênero. No entanto, divergências em sequências podem auxiliar no entendimento das propriedades que envolvem a virulência do ZIKV. Por exemplo, tem sido demonstrada uma interação entre proteínas do hospedeiro e a proteína NS2A do ZIKV, mas o mesmo não foi observado com a NS2A de DENV. Esta interação permite a formação de complexos de aderência e promove a sua degradação lisossomal e autofágica, o que resulta em desordens na proliferação e na diferenciação de células da glia, bem como de neurônios (32,33).

As evidências de infecção por ZIKV em seres humanos foram reportadas até o ano 1981 em países do continente africano, como Uganda, Tanzânia, Egito e Serra Leoa, bem como em partes da Ásia incluindo Índia, Malásia, Filipinas, Tailândia e Indonésia (34). Em 2007 um surto na Ilha de Yap, um dos Estados

Federados da Micronésia, mostrou que a infecção por este vírus pôde ter sido detectada em regiões fora dos continentes africano e asiático (5).

Estudos demonstraram associação entre o ZIKV e doenças neurológicas como meningoencefalite, mielite e GBS (35–37). Além disso, uma potencial ligação entre a infecção por ZIKV em gestantes e uma síndrome congênita foi identificada em outubro de 2015 no Brasil, quando um aumento no número de casos de microcefalia foi observado por neurologistas do estado de Pernambuco. Em novembro de 2015 o Ministério da Saúde declarou os surtos de microcefalia como uma emergência de saúde nacional (38,39).

1.2.2 Dengue Vírus

Em 1940 pesquisadores do Japão e dos Estados Unidos isolaram e inocularam o DENV em animais de laboratório, posteriormente associando esta inoculação experimental a sintomas humanos. Após uma década foi realizado o reconhecimento do DENV como causador da febre hemorrágica dengue, durante surtos ocorridos na Tailândia e Filipinas (40,41).

Como os demais flavivírus, o genoma do DENV compreende uma fita de simples de RNA de polaridade positiva que codifica três proteínas estruturais e sete não estruturais. São identificados quatro sorotipos de DENV com base na antigenicidade e circulação continental, os quais são designados DENV 1-4. Análises do genoma total do vírus demonstraram significativa diversidade em cada sorotipo, apesar de haver entre eles uma divergência nucleotídica menor que 7%. A infecção por um sorotipo confere imunidade a este sorotipo específico e imunidade parcial de curta duração para os demais sorotipos (42,43).

Durante a fase crítica, manifestações hemorrágicas são bastante frequentes. De forma rara, sangramentos significativos podem ocorrer em crianças, geralmente em associação com um profundo e prolongado choque. Entretanto, sangramentos importantes podem ocorrer na pele, mucosas (gastrointestinal ou vaginal) ou ambos em adultos (Figura 5). Outras manifestações severas como insuficiência hepática, miocardite e encefalopatia, algumas vezes podem ocorrer de forma rara sem associação com o vazamento de plasma (44,45).



Figura 4. Hematoma em um paciente com dengue severa. Adaptado de: Simmons et al, 2012.

1.3 Considerações sobre os Vetores

As espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* estão distribuídas mundialmente em regiões de clima tropical e temperado. A habilidade de se reproduzirem em criadouros artificiais facilitou a distribuição passiva destas espécies ao longo das décadas através das principais rotas de transporte. Estes mosquitos coexistem em criadouros artificiais em assentamentos urbanos, suburbanos e rurais das regiões tropicais e subtropicais (46–48).

O conhecimento sobre os aspectos ecológicos e comportamentais dos mosquitos são a base para o entendimento da dinâmica de transmissão de patógenos transmitidos por vetores e para a implantação de programas eficazes de controle de vetores. Assim, o conhecimento sobre a ecologia, a transmissão de doenças e controle de *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti* tem crescido mundialmente nas últimas décadas (49).

O impacto das arboviroses na saúde humana é de âmbito global e tornou-se uma grande preocupação devido à expansão geográfica de muitas espécies de mosquitos. Além disso, muitas arboviroses ocorrem durante epidemias imprevisíveis, o que aumenta a dificuldade no controle destas doenças. É de significativa importância, a busca por novos alvos para combater as arboviroses e nos últimos anos, este combate tem sido direcionado para estratégias

baseadas em vetores, ao contrário de estratégias baseadas no hospedeiro ou nos vírus (50).

1.4 Diagnóstico Clínico

O quadro clínico comum ocorrido durante a fase febril aguda das arboviroses associado ao elevado número de casos tem contribuído para um diagnóstico clínico confuso e para a falta de um diagnóstico diferencial adequado durante epidemias. Desta forma, algumas arboviroses circulam de maneira silenciosa, confundidas com as espécies mais frequentes como DENV, ZIKV e CHIKV (8,51,52).

1.5 Diagnóstico Sorológico

1.5.1 Teste Imunocromatográfico

O teste imunocromatográfico tem como base o uso de nanopartículas que são ligadas à proteína ou anticorpo de interesse, dependendo do tipo de teste. A imunocromatografia de fluxo lateral utiliza membranas porosas que permitem o fluxo lateral da amostra de uma zona de aplicação a uma zona de reação. Microesferas de ouro, ou lipossomos com corante de selênio, com anticorpos monoclonais em sua superfície são colocados na zona de aplicação. Na zona de reação podemos encontrar os anticorpos de captura e controle (53–55).

Para a realização do teste imunocromatográfico de fluxo lateral podem ser utilizados fluidos biológicos como soro, sangue total, plasma, saliva, urina e suor. Após a aplicação, a amostra flui através dos reagentes incorporados, onde reações químicas ocorrem. O produto destas reações continua a fluir através da membrana até chegar aos reagentes de captura, os quais são imobilizados na membrana como uma faixa. Normalmente são geradas duas faixas na membrana, onde uma é a faixa teste para detecção da amostra, de acordo com

os limites de detecção, e a outra é a faixa controle para confirmação do sucesso da técnica (56–58). O diagrama esquemático do teste imunocromatográfico de fluxo lateral pode ser observado na figura 6.

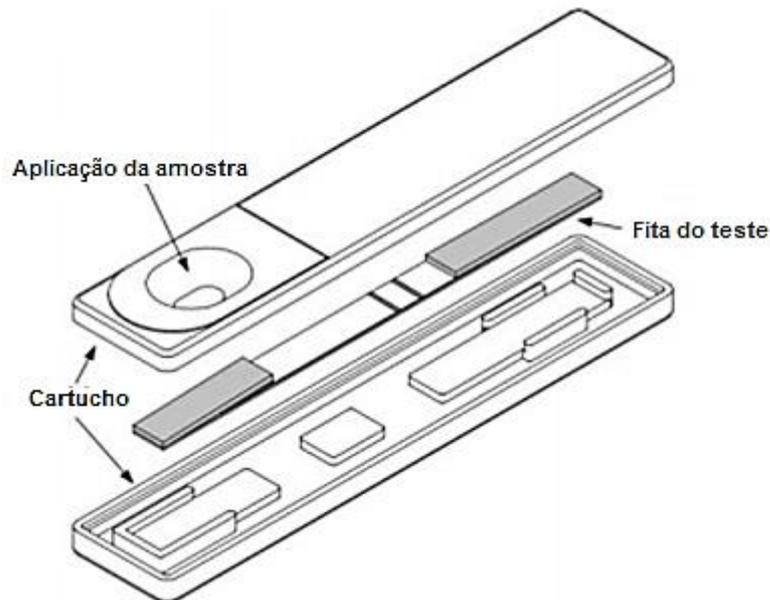


Figura 5. Diagrama esquemático de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral (kit). Adaptado de: KIM & PARK, 2004.

A técnica de imunocromatografia de fluxo lateral é comumente utilizada tanto na detecção do antígeno NS1 de DENV, quanto na detecção dos anticorpos IgM/IgG anti-NS1 através de soro ou plasma. Este teste é sugerido por ser rápido, de fácil realização, sensível e específico para o diagnóstico precoce da infecção por dengue após o pico de febre. A leitura do resultado deve ser realizada em até 15 minutos, entretanto, uma releitura do teste após este prazo deve ser realizada em caso de resultados inconclusivos ou negativos. Resultados falso-positivos podem ser gerados caso estenda-se um tempo total de 45-60 minutos para a leitura do resultado (59,60).

1.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Técnicas moleculares como a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a qual permite a identificação do material genético de arbovírus a partir da amplificação de alvos virais específicos são mais específicas e mais eficazes do que as técnicas sorológicas (59).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é um avanço significativo na técnica de PCR, pois permite a mensuração do produto simultaneamente à síntese de DNA, e elimina a necessidade de processamentos pós-amplificação, como por exemplo, a eletroforese em gel de agarose, necessários para a detecção do amplicon. O monitoramento em tempo real da amplificação do alvo de DNA pode ser realizado através do uso de corantes fluorescentes intercalantes de DNA como o SYBR Green I, o qual se liga de forma não específica ao amplicon gerado durante a reação (61), ou através do uso de sondas de DNA marcadas com fluorescência, como o sistema TaqMan (Applied Biosystems) que ligam-se de maneira específica ao alvo de amplificação (62).

Diante da semelhança dos sintomas apresentados pelos pacientes durante infecções por arbovírus, torna-se imprescindível a realização de diagnóstico diferencial. Uma das técnicas laboratoriais fortemente utilizadas nas unidades de saúde para o diagnóstico de arbovirose são os testes rápidos realizados através da imunocromatografia de fluxo lateral.

No entanto, o desempenho destes testes deve ser validado por meio de técnicas de referência como a RT-PCR, a qual é uma técnica bem estabelecida por ser sensível e confiável. Além disso, o isolamento viral em cultivo celular é considerado padrão-ouro no diagnóstico de infecções virais (63), desta forma, a avaliação sorológica aliada à avaliação molecular e ao isolamento viral permite um diagnóstico diferencial dos casos suspeitos de infecção por arbovírus, além de fornecer dados que podem auxiliar na epidemiologia destas doenças.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Realizar avaliação sorológica e molecular de pacientes com suspeita de arboviroses, atendidos no Centro de Assistência Integrado à Saúde Jardim Novo Mundo (CAIS Jardim Novo Mundo).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o percentual de pacientes reagentes e não reagentes para as arboviroses, através da utilização do kit de teste rápido Bahiafarma®.

Avaliar a eficiência do teste rápido em questão;

Avaliar a presença de coinfeção entre as arboviroses nos pacientes sintomáticos;

Isolar o ZIKV em cultivo de células vero e realizar a confirmação deste isolamento através de avaliação molecular por RT-PCR.

3. METODOLOGIA

3.1 População de Estudo e Coleta de Amostras

O presente trabalho constitui um estudo experimental transversal, para o qual foram coletadas 459 amostras de sangue de pacientes com quadro sintomático sugestivo de infecção por arbovírus como DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV, atendidos no Centro de Assistência Integrado à Saúde Jardim Novo Mundo (CAIS Jardim Novo Mundo), o qual fica localizado no endereço: Avenida Nova York s/n- Jardim Novo Mundo- CEP 74713-440, região administrativa Leste da cidade de Goiânia, Goiás. O CAIS Jardim Novo Mundo realiza atendimentos ambulatoriais, bem como atendimentos de urgência e emergência, através do Sistema Único de Saúde.

As coletas ocorreram no período compreendido entre o dia 30 de março de 2017 e 20 de junho de 2018. As amostras foram obtidas de sangue total, coletado em tubo ativador de coágulo e gel separador para realização dos testes rápidos e extração de RNA para realização dos testes moleculares. Todos os participantes do estudo tiveram que assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) do presente estudo é 66469917.1.0000.5078.

3.2 Critérios de Elegibilidade

3.2.1 Critérios de Inclusão

Foram recrutados indivíduos com idade ≥ 18 anos atendidos em uma unidade de pronto atendimento do município de Goiânia, apresentando os seguintes sinais e sintomas: temperatura axilar $>37,5^{\circ}\text{C}$ e/ou exantema e dois ou mais dos seguintes sinais/sintomas no momento do atendimento: cefaleia, artralgia, mialgia.

3.2.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os indivíduos que no momento da triagem realizada durante atendimento na unidade de saúde CAIS Jardim, apresentaram resultados laboratoriais reagentes para qualquer das arboviroses do estudo, podendo ser exames Imunoenzimáticos, Imunocromatográficos, PCR ou NS1, por estarem em um período superior a sete dias de sintomas.

3.3 Fluxograma do Estudo

Para melhor compreensão das etapas envolvidas no estudo, foi desenvolvido o fluxograma de trabalho, o qual compõe a Figura 6.

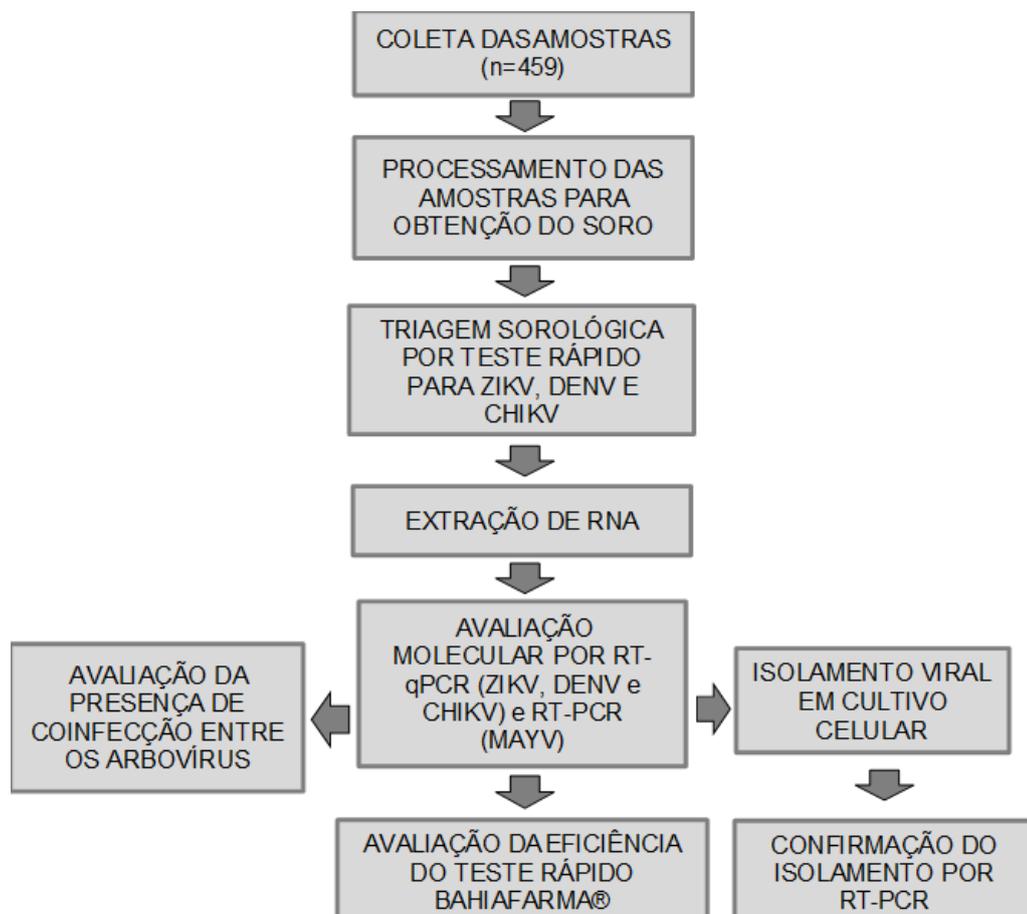


Figura 6. Fluxograma de trabalho

3.4 Processamento das Amostras

Após a coleta, as amostras de sangue total foram transportadas em caixa térmica contendo gelo artificial reutilizável, para o Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC), localizado no Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia-Goiânia, Goiás, aonde foram devidamente processadas e manipuladas.

O processamento das amostras para obtenção do soro foi realizado através de centrifugação a 3.000 rotações por minuto durante 10 minutos. Posteriormente, foram realizadas alíquotas dos soros em criotubos de volume igual a 1,5 mL livres de RNase e DNase, os quais foram armazenados em freezer -80°C.

3.5 Triagem Sorológica por Teste Rápido

Foram utilizados os kits comerciais de diagnóstico rápido Bahiafarma®, os quais estavam em uso nas unidades públicas de saúde do município de Goiânia, para realização da triagem sorológica das arbovireses, sendo estes os kits Bahiafarma® anti-ZIKV IgM/IgG (Lote: 1612TRK004AA), Bahiafarma® anti-DENV IgM/IgG (Lote: 1704TRZK042C) e Bahiafarma® anti-CHIKV IgM (Lote: 1708TRCM015E), devidamente registrados na ANVISA (Nº 81285200001; Nº 81285200005 e Nº 81285200002, respectivamente). Os testes, bem como a leitura dos resultados foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Entretanto, em função da interdição realizada pela ANVISA, em fevereiro de 2019, em parte da produção do laboratório Bahiafarma®, não foi possível realizar a triagem sorológica em todas as amostras do presente estudo, uma vez que a utilização dos kits de diagnóstico rápido Bahiafarma® para detecção de ZIKV, DENV e CHIKV nas unidades de saúde foi descontinuada.

3.6 Extração de RNA

Todas as amostras foram submetidas à extração de RNA através da utilização do kit BioGene® Extração de DNA/RNA Viral K204 (produzido por Bioclin - Quibasa Química Básica LTDA; Registro ANVISA: 10269360296), seguindo-se o protocolo fornecido pelo fabricante para realização da técnica. Nessa etapa foram adicionados 4 µL do reagente referente ao kit de RT-qPCR (plasmídeo) para atuar como um controle interno de extração, bem como de amplificação na etapa subsequente.

3.7 RT-qPCR

Para detecção dos vírus ZIKV, DENV e CHIKV foram utilizados, respectivamente, os kits comerciais BioGene® Zika PCR K203 (Registro ANVISA: 10269360300), BioGene® Dengue PCR K201 e BioGene® (Registro ANVISA: 10269360302), Chikungunya PCR K202 (Registro ANVISA: 1026936030), produzidos por Bioclin- Quibasa Química Básica LTDA.

As reações foram realizadas seguindo-se as instruções do fabricante, como protocolo de ciclagem e preparo dos reagentes, sendo utilizado o aparelho Termociclador StepOnePlus™ Real Time da Applied Biosystems. O padrão de qualidade das reações foi realizado através do controle interno, adicionado durante a etapa de extração de RNA, assim as amostras nas quais a amplitude de ciclos do controle endógeno foi observada entre o Ct 25 e o Ct 31, tiveram seus resultados validados, conforme as recomendações de análise fornecidas pelo fabricante.

3.8 RT-PCR Para Detecção de MAYV

3.8.1 Primeira Etapa

Para a detecção molecular de MAYV, primeiramente, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, através da Reação da Transcriptase Reversa, utilizando o kit M-ML Reverse Transcriptase (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis). Em micro tubo de volume 0,5 mL foi preparado o mix inicial da reação para cada amostra, com 1 µL de RNA, 1 µL (10 mM) de dNTP, 1 µL de *primer* randômico e 7 µL de água livre de RNase e DNase, sendo incubado por 10 minutos a 70°C.

Após o período de incubação, foi preparado o segundo mix com 2 µL de *buffer* 10x (500 mM Tris-HCl, pH 8,3 com 500 mM KCl, 30 mM de MgCl₂ e 50 mM DTT), 1 µL de enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/ µL) e 7 µL de água livre de RNase e DNase, o qual foi adicionado aos micro tubos contendo o mix inicial. Os micro tubos foram, então, submetidos à incubação a 37°C por 50 minutos para ação da enzima transcriptase reversa e posteriormente à incubação a 85°C por 10 minutos para desnaturação da enzima.

3.8.2 Segunda Etapa

Após a síntese de cDNA foi realizada PCR convencional para amplificação da região Nsp1 do vírus MAYV. Para o desenho dos *primers* foi utilizado um alinhamento a partir de 34 sequenciamentos do genoma completo de cepas de MAYV, disponíveis no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), através do qual, foram identificadas regiões genômicas não repetitivas e com alto grau de conservação evolutiva. O alinhamento de todas as sequências obtidas a partir do NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) foi realizado através do *software* BioEdit (versão 7.0.5.2), no qual foram determinadas as sequências consenso (sequência *Foward primer*: GACGACCTGCAGTCAGTGAT; e sequência *Reverse*

primer: GTCTTAAAGGCCACAGGCA). Através da plataforma *Primer3/BLAST* disponível no NCBI, foram determinados amplicons de 925 pb, a partir das sequências *forward primer* e *reverse primer*, as quais apresentaram 100% de concordância com as sequências de MAYV.

A reação em questão foi realizada utilizando-se o kit Invitrogen (Life Technologies™) a partir do qual, em um micro tubo de volume 0,5 mL, o mix foi preparado com 2,5 µL de PCR *Buffer* 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 5 µL de *primer* (2,5 µM), 0,5 µL de Platinum Taq DNA Polimerase (5U/µL) e 14,5 µL de água livre de RNase e DNase. Para um volume total de 25 µL de reação, foi adicionado ao mix 1 µL de cDNA. O protocolo de termociclagem está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de MAYV

Etapas	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Anelamento	60°C	1 minuto	35
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão Final	72°C	7 minutos	1

A análise dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 4 µL de brometo de etídio em TBE 1x, no qual foram adicionados 10 µL do produto de RT-PCR de MAYV preparados, previamente, com 3 µL de tampão de corrida. Para separação destes fragmentos foi aplicado um campo elétrico constante de 90 V por 40 minutos, sendo utilizado o aparelho transiluminador Ultra Lum (Omega) para visualização dos mesmos.

3.9 Isolamento Viral em Cultivo Celular

3.9.1 Infecção VIRAL

Foram selecionadas amostras positivas para ZIKV para realização do isolamento viral em cultivo celular, devido à infecção por este vírus ter sido considerada uma doença emergente e endêmica, em função do aumento crescente de casos notificados em diversos países e territórios. Apesar da infecção por ZIKV cursar muitas vezes de maneira benigna, no Brasil, o maior problema concernente à infecção pelo ZIKV é o aumento dos casos de microcefalia.

A partir da avaliação molecular por RT-qPCR foram selecionadas 11 amostras positivas para ZIKV, com diferentes valores de Ct, bem como de cópias genômicas/mL e apresentando ou não coinfeção com outros arbovírus. Para o isolamento viral, foram utilizadas células Vero (ATCC[®] CCL-81[™]), as quais são provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em frascos pequenos com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- LGC Biotecnologia), acrescido de soro fetal bovino (SFB- LGC Biotecnologia), após ser inativado a 56°C durante 30 minutos. As células foram incubadas em estufa 37°C com concentração de CO₂ igual a 5%.

As células Vero foram cultivadas até o frasco atingir confluência entre 70-80%, então, utilizando-se cabine de segurança biológica com filtro HEPA, o procedimento de infecção viral foi iniciado. Para este procedimento, primeiramente, foi realizada a remoção do meio consumido e a lavagem do frasco utilizando PBS 1x. Posteriormente, foram inoculados 250 µL de soro do paciente nas células e adicionados 750 µL de meio DMEM, para perfazer ²⁰ volume total de 1 mL. Após a inoculação das células, o frasco foi incubado em estufa 37°C contendo 5% de concentração de CO₂ e a homogeneização do mesmo foi realizado a cada 15 minutos através de movimentos circulares durante o período de duas horas.

Após o período de incubação, o inóculo foi removido e o frasco foi lavado com PBS 1x e adicionados 5 mL de meio DMEM contendo 5% de SFB. As células

foram novamente submetidas à incubação em estufa 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram observadas em microscópio óptico para avaliação de possível efeito citopático e o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 2000 rpm por 3 minutos, então o debris celular foi descartado e sobrenadante foi colhido e armazenado em freezer -80°C. A partir do sobrenadante coletado foram realizadas duas novas passagens do vírus nas células, repetindo-se todo o procedimento anteriormente aqui descrito.

3.9.2 Extração de RNA do Sobrenadante

O sobrenadante coletado das respectivas passagens nas células foi submetido à extração de RNA a partir do kit BioGene® Extração de DNA/RNA Viral K204 (produzido por Bioclin - Quibasa Química Básica LTDA; Registro ANVISA: 10269360296), seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante e o RNA obtido foi armazenado em freezer -80°C.

3.9.3 Síntese de cDNA

Para confirmação da técnica de isolamento viral em células Vero foi realizada avaliação molecular através de RT-PCR convencional. Primeiramente, foi realizada a síntese de cDNA a partir do RNA extraído do sobrenadante obtido do cultivo, através da Reação da Transcriptase Reversa, utilizando o kit M-ML Reverse Transcriptase (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis) e seguindo-se o mesmo protocolo utilizado anteriormente para síntese de cDNA descrito no Item 3.8.1.

3.9.4 RT-PCR para ZIKV

Após a síntese de cDNA foi realizada a técnica de PCR convencional para detecção de ZIKV, utilizando-se o kit Invitrogen (Life Technologies™) para preparo do mix. Em um micro tubo de volume 0,5 mL, foram adicionados 2 µL de *buffer* 10x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,7 µL de *primer* 10mM (sequência *Foward primer* 5 UTR: TGAATCAGACTGCGACATGTCG; e sequência *Reverse primer* 5 UTR: TGACCAGAACTCTCGTTTCCA, as quais geram fragmentos de 100 pb), 0,5 µL Platinum Taq DNA Polimerase (5 U/ µL) e 14,3 µL de água livre de RNase e DNase. Para um volume total de 20 µL de reação, foi adicionado ao mix 1,5 µL de cDNA. O protocolo de termociclagem está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de ZIKV

Etapas	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Anelamento	60°C	30 segundos	40
Extensão	72°C	40 segundos	
Extensão Final	72°C	10 minutos	1

Para melhor visualização do fragmento de interesse de ZIKV em gel de agarose, foi realizada reamplificação utilizando-se o mesmo protocolo de reação e termociclagem da RT-PCR para ZIKV realizada anteriormente. A análise dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 4 µL de brometo de etídio em TBE 1x, no qual foram adicionados 10 µL do produto de RT-PCR de ZIKV preparados, previamente, com 3 µL de tampão de corrida. Para separação destes fragmentos foi aplicado um campo elétrico constante de 90 V por 40 minutos, sendo utilizado o aparelho fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc™ XR+ System, para visualização dos mesmos.

3.9.5 Confirmação de Coinfecção por MAYV

As amostras com coinfecção por MAYV foram submetidas à técnica de RT-PCR para confirmar o isolamento de MAYV através do cultivo celular. O mix da reação foi realizado a partir do kit Invitrogen (Life Technologies™), utilizando-se 2,5 µL de *buffer* 10 x (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 5 µL de *primer* 10mM (sequência *Foward primer*: GACGACCTGCAGTCAGTGAT; e sequência *Reverse primer*: GTCTTAAAGGCCACAGGCA, as quais geram fragmentos de tamanho 925 pb), 0,5 µL de Platinum Taq DNA Polimerase (5U/ µL) e 14,5 µL de água livre de RNase e DNase. Para um volume total de 25 µL de reação foi adicionado ao mix 1 µL de cDNA. O protocolo de termociclagem está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Protocolo de Termociclagem para RT-PCR de MAYV

Etapas	Temperatura °C	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	2 minutos	1
Desnaturação	95°C	30 segundos	
Anelamento	60°C	1 minuto	35
Extensão	72°C	2 minutos	
Extensão Final	72°C	7 minutos	1

A análise do amplicon de MAYV foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 4 µL de brometo de etídio em TBE 1x, no qual foram adicionados 10 µL do produto de RT-PCR de MAYV, utilizando-se 3 µL de tampão de corrida. Para separação destes fragmentos foi aplicado um campo elétrico constante de 90 V por 40 minutos, sendo utilizado o aparelho fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc™ XR+ System, para visualização dos mesmos.

3.10 Análise Estatística

As análises estatísticas, gráficos e tabelas, apresentados neste trabalho, foram realizadas com o *software Microsoft Excel 2013®*. Foram utilizadas equações para cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, bem como cálculos para avaliação do percentual de amostras positivas e negativas obtidas após análise molecular.

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo dos kits de diagnóstico rápido foram calculados através das seguintes razões:

$$S = VP1 / (VP2 + FN) \qquad VPP = VP1 / (VP2 + FP)$$

$$E = VN1 / (VN2 + FP) \qquad VPN = VN1 / (VN2 + FN)$$

Onde, S representa a sensibilidade; E especificidade; VP1 os casos verdadeiramente positivos do teste rápido; VP2 os casos verdadeiramente positivos da análise molecular por RT-qPCR e RT-PCR; FN os casos falso negativos do teste rápido; VN1 os casos verdadeiramente negativos do teste rápido; VN2 os casos verdadeiramente negativos da análise molecular por RT-qPCR e RT-PCR; FP os casos falso positivos do teste rápido; VPP o valor preditivo positivo, e VPN o valor preditivo negativo.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados da Triagem Sorológica por Teste Rápido

Foram realizados cálculos estatísticos para avaliação de sensibilidade, especificidade, bem como o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) dos kits de diagnóstico rápido Bahiafarma®. Os resultados da triagem sorológica das 459 amostras, para detecção de IgM e IgG realizada para CHIKV, ZIKV e DENV, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados Triagem Sorológica Por Teste Rápido

Resultado	Teste Rápido Bahiafarma®				
	ZIKV		DENV		CHIKV
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
R	3(0,7%)	39(8,5%)	39(8,5%)	55(12%)	0
NR	456(99.3%)	420(91,5%)	420(91,5%)	404(88%)	189(41,2%)
Sem Análise	-	-	-	-	270(58,8%)
Total	459(100%)	459(100%)	459(100%)	459(100%)	459(100%)

Legenda: R-Reagente; NR-Não reagente; - Sem resultado sorológico.

4.2 Resultados Moleculares para ZIKV, DENV e CHIKV

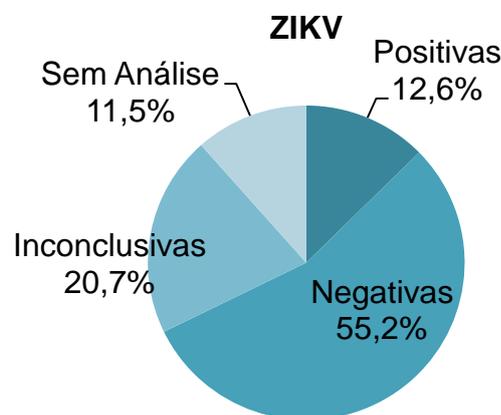
Os resultados das 459 amostras submetidas à avaliação molecular por RT-qPCR para detecção de ZIKV, DENV e CHIKV e por RT-PCR para detecção de MAYV estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Resultados Moleculares Para ZIKV, DENV, CHIKV e MAYV

Resultado	RT-qPCR			RT-PCR
	ZIKV	DENV	CHIKV	MAYV
Positivas	58(12,6%)	130(28,3%)	10(2,2%)	78(17%)
Negativas	253(55,2%)	226(49,3%)	436(95%)	381(83%)
Inconclusivas	95(20,7%)	103(22,4%)	13(2,8%)	-
Sem análise	53(11,5%)	-	-	-
Total	459(100%)	459 (100%)	459(100%)	459(100%)

O percentual de amostras com resultados positivos para ZIKV, DENV e CHIKV e MAYV foram respectivamente, 12,6%; 28,3%; 2,2% e 17% do total de amostras, enquanto que o percentual de amostras negativas para estas arboviroses foi também respectivamente, 55,2%; 49,3%; 95% e 83%. Amostras nas quais a amplificação do controle interno apresentou-se fora dos parâmetros de validação da reação (intervalo entre Ct 25 e Ct 31), fornecidos pelo fabricante Biogene®, do kit, obtiveram resultados inconclusivos. Resultados inconclusivos foram observados para ZIKV, DENV e CHIKV representando, desta forma, respectivamente 20,7%; 22,4%, e 2,8% do total de amostras, além disso, não foi possível realizar RT-qPCR para detecção de ZIKV em 53 amostras, representando, portanto, 11,5% do total de amostras.

Para melhor ilustração dos resultados moleculares obtidos, foram elaborados gráficos para demonstração dos percentuais de amostras positivas, negativas e indeterminadas para ZIKV, DENV, CHIKV e MAYV (Figuras 7, 8, 9 e 10, respectivamente).

**Figura 7.** Percentual dos resultados moleculares para ZIKV

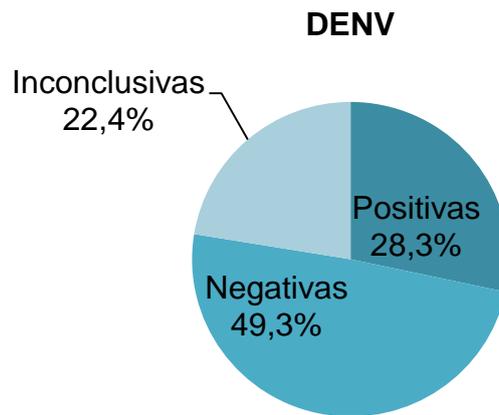


Figura 8. Percentual dos resultados moleculares para DENV

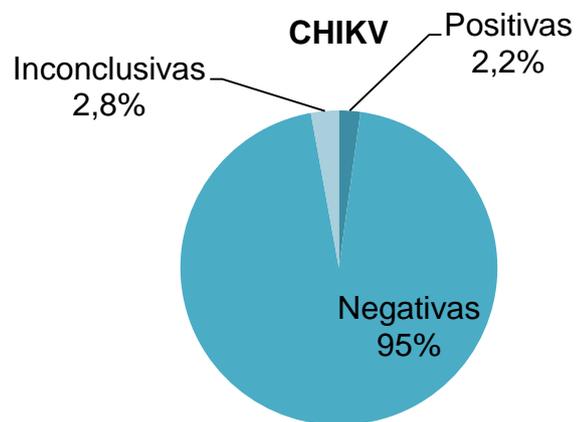


Figura 9. Percentual dos resultados moleculares para CHIKV

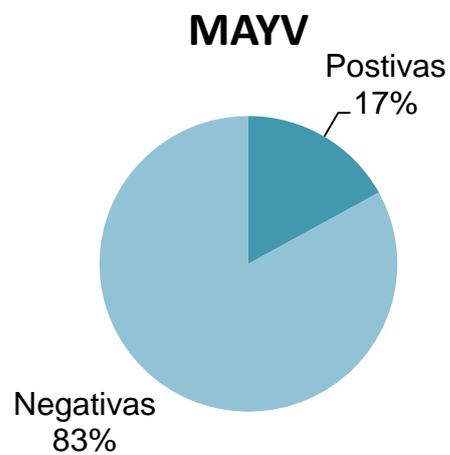


Figura 10. Percentual dos resultados moleculares para MAYV

4.3 Sensibilidade e Especificidade

Segundo as especificações de desempenho dos kits de diagnóstico rápido do fabricante Bahiafarma®, o kit para detecção de anti-ZIKV IgM/IgG apresenta sensibilidade e especificidade iguais a 94%. A partir dos resultados moleculares, foram realizados cálculos estatísticos para avaliação da sensibilidade e especificidade deste kit, como está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Sensibilidade e Especificidade do Kit ZIKV IgM Bahiafarma®

RT-qPCR ZIKV		Bahiafarma® ZIKV		Sensibilidade	VPP
				Especificidade	VPN
		VN1 IgM	VP1 IgM	Sensibilidade	VPP
VN2	VP2	252	0	-	-
253	58	FN IgM	FP IgM	Especificidade	VPN
		58	1	0,99 (99%)	0,81 (81%)

Legenda: VN-Verdadeiro Negativo; VP-Verdadeiro Positivo; FN-Falso Negativo; FP-Falso Positivo; VPP-Valor Preditivo Positivo; VPN-Valor Preditivo Negativo.

Após a realização da avaliação estatística, o kit para detecção de anti-ZIKV IgM Bahiafarma®, apresentou especificidade de 99%. O valor preditivo negativo, a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente normal, foi também de 81%. Não foi possível calcular o valor de sensibilidade, assim como o valor preditivo positivo.

Considerando o kit para detecção de anti-DENV IgM/IgG Bahiafarma®, a sensibilidade e a especificidade apresentadas por este, são de 95% e >99,0%, respectivamente, segundo as especificações do fabricante. A partir dos resultados moleculares para DENV, foi realizada a avaliação da sensibilidade e especificidade deste kit, como está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7: Sensibilidade e Especificidade do Kit DENV IgM Bahiafarma®

RT-qPCR DENV		Bahiafarma® DENV		Sensibilidade	VPP
				Especificidade	VPN
		VN1 IgM	VP1 IgM	Sensibilidade	VPP
VN2	VP2	207	13	0,05 (5%)	0,09 (9%)
226	130	FN IgM	FP IgM	Especificidade	VPN
		119	19	0,84 (84%)	0,6 (60%)

Legenda: VN-Verdadeiro Negativo; VP-Verdadeiro Positivo; FN-Falso Negativo; FP-Falso Positivo; VPP-Valor Preditivo Positivo; VPN-Valor Preditivo Negativo.

Após a realização da avaliação estatística, o kit para detecção de anti-DENV IgM/IgG Bahiafarma®, apresentou sensibilidade de 5% e especificidade de 84%. A probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente sadio, foi de 60%, o valor preditivo negativo. A probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente foi de 9%, o valor preditivo positivo.

Segundo as especificações do fabricante, o kit para detecção de anti-CHIKV IgM Bahiafarma®, apresenta uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 95%. Foi possível calcular, após a avaliação molecular, apenas o valor de especificidade, bem como o valor preditivo negativo, pois nenhuma das amostras analisadas obteve resultado reagente para IgM, como está apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Sensibilidade e Especificidade do Kit CHIKV IgM Bahiafarma®

RT-qPCR CHIKV		Bahiafarma® CHIKV		Sensibilidade	VPP
				Especificidade	VPN
		VN1 IgM 182	VP1 IgM	Sensibilidade	VPP
VN2	VP2	182	0	-	-
436	10	FN IgM	FP IgM	Especificidade	VPN
		0	0	0,42 (42%)	0,42(42%)

Legenda: VN-Verdadeiro Negativo; VP-Verdadeiro Positivo; FN-Falso Negativo; FP-Falso Positivo; VPP-Valor Preditivo Positivo; VPN-Valor Preditivo Negativo.

Após a realização da avaliação estatística, o kit para detecção de anti-CHIKV IgM Bahiafarma®, apresentou especificidade de 42%. O valor preditivo negativo, a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado negativo ser realmente normal, foi também de 42%. Não foi possível calcular o valor de sensibilidade, assim como o valor preditivo positivo.

4.4 Coinfecções Observadas

Após a realização de análise molecular por RT-qPCR e RT-PCR foi possível confirmar que alguns pacientes apresentaram resultado positivo para mais de um arbovírus. Dentre estes pacientes, 31 (6,7%) apresentaram coinfeção entre ZIKV e DENV; dois (0,4%) apresentaram coinfeção entre ZIKV e MAYV; 10 (2,2%) apresentaram coinfeção entre DENV e MAYV; três (0,7%) apresentaram coinfeção entre CHIKV e MAYV, e três (0,7%) apresentaram coinfeção entre ZIKV, DENV e MAYV (Figura 11).

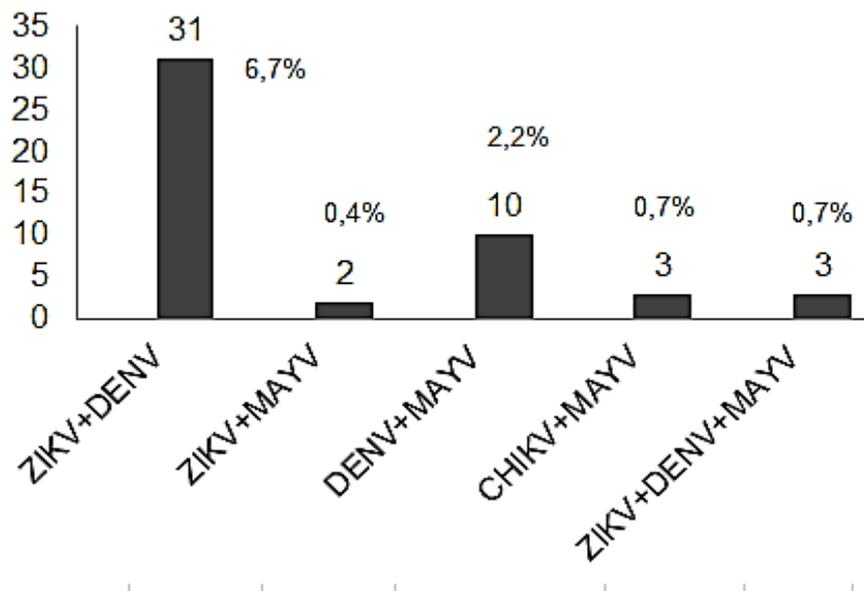


Figura 11. Coinfecções observadas após análise molecular

4.5 Resultados Isolamento Viral em Cultivo Celular

Os valores de Ct, bem como de cópias genômicas/mL para ZIKV estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Perfil molecular das amostras submetidas ao isolamento viral

Paciente	RT-qPCR ZIKV	
	Ct	CG/mL
98	27,609	8.988,6
182	32,696	1.133
228	38,31	4,2
230	34,726	46,6
255	34,948	40,2
264	32,396	220,6
266	34,237	64,6
267	35,372	30,4
271	33,968	77,4
303	37,416	7,8
348	36,711	8,8

Legenda: Ct- Ciclo Threshold; CG- Cópias Genômicas

Não foi observado em microscopia óptica presença de efeito citopático evidente nas células Vero (ATCC® CCL-81™) após a inoculação do soro e o período de incubação em estufa 37°C em nenhuma das três passagens virais realizadas. Foi perceptível a preservação da morfologia da monocamada de células aderidas ao frasco de cultivo, após aplicação do inóculo, como está demonstrado nas Figuras 12, 13 e 14.

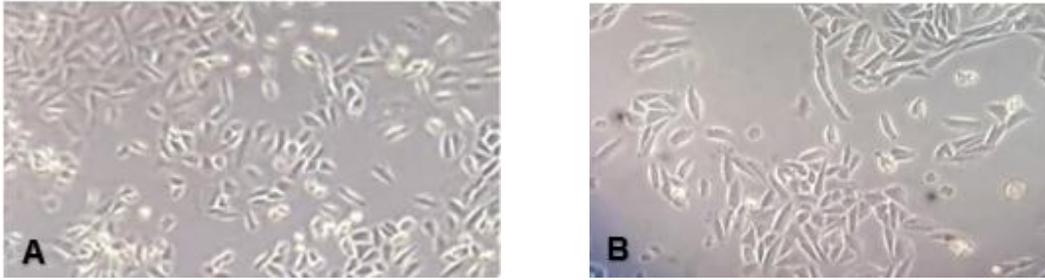


Figura 12. A. Células Vero antes da aplicação do inóculo. B. Células Vero após processo de infecção viral (Primeira passagem viral)

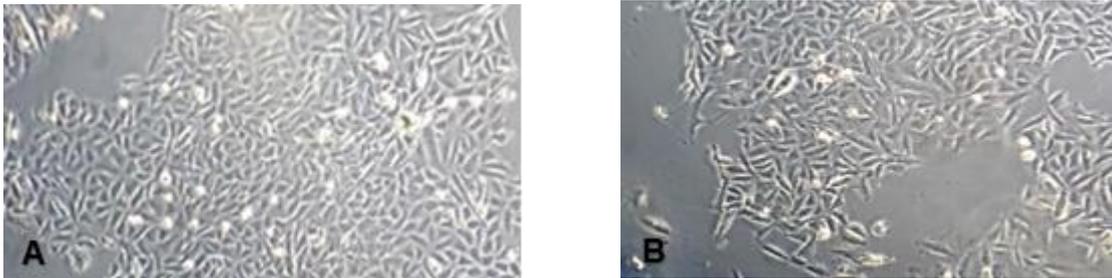


Figura 13. A. Células Vero antes da aplicação do inóculo. B. Células Vero após processo de infecção viral (Segunda passagem viral)

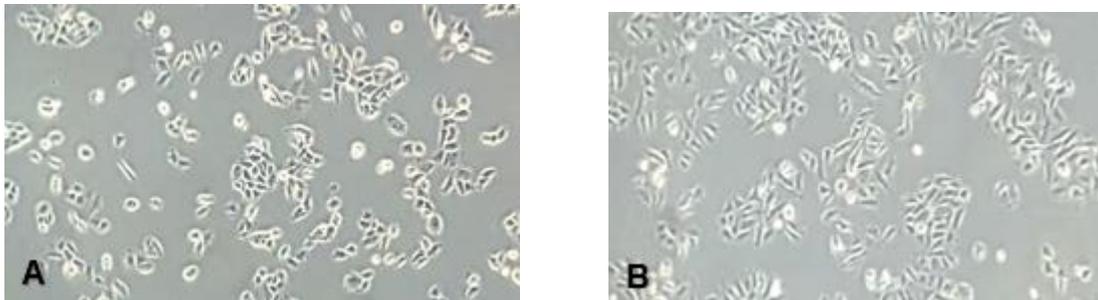


Figura 14. A. Células Vero antes da aplicação do inóculo. B. Células Vero após processo de infecção viral (Terceira passagem viral)

A avaliação molecular realizada após a extração de RNA dos sobrenadantes gerados no processo de infecção viral das células Vero demonstrou que houve amplificação do fragmento de interesse de ZIKV (100 pb) em todas as 11 amostras previamente positivas para ZIKV. Somente 9 amostras foram positivas em todas as passagens. Os fragmentos para o vírus do ZIKV foram amplificados e visualizados nas 9 amostras descritas: 182, 228, 230, 255, 264, 266, 267, 271 e 348 e o mesmo fragmento de 100 pb foi amplificado em todas as passagens do vírus nas células, enquanto que nas amostras 98 e 303, os fragmentos

amplificados foram visualizados somente na primeira e na segunda passagem do vírus nas células (Figura 15).

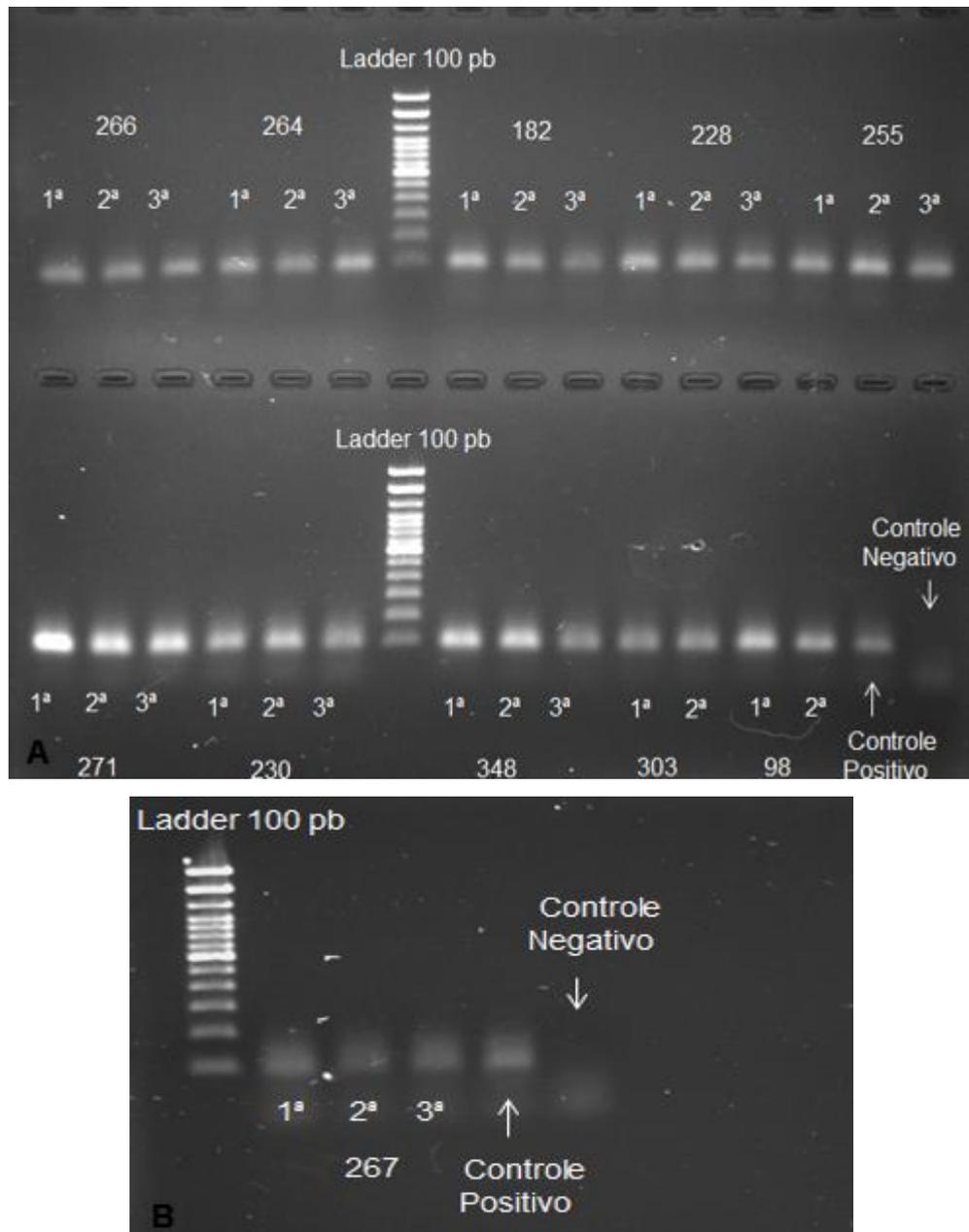


Figura 15. Géis agarose a 1,5% (A e B), demonstrando a amplificações dos fragmentos de ZIKV (100 pb), na primeira, segunda e terceira passagem (1^a, 2^a e 3^a) deste vírus nas células.

Das 11 amostras positivas para ZIKV por RT-qPCR, submetidas ao isolamento viral em cultivo celular, quatro dessas amostras apresentaram coinfeção também resultado positivo para MAYV, desta forma, foi realizada RT-PCR convencional para detecção de MAYV nestas amostras. Foi observada a amplificação do fragmento de MAYV (925 pb) nas amostras 228 (primeira passagem viral) e 266 (primeira e terceira passagens virais), como pode ser visualizado na Figura 16.

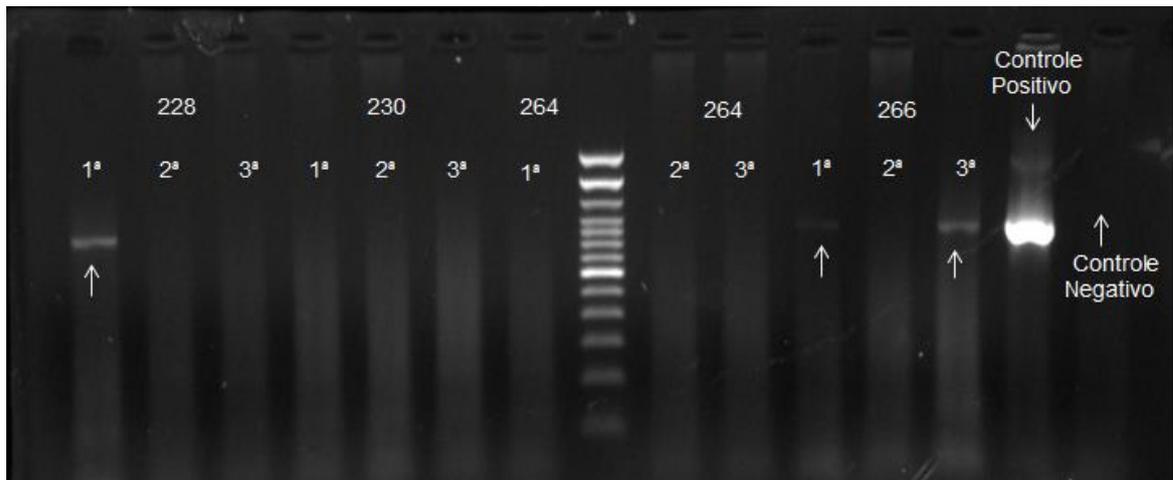


Figura 16. Gel de agarose a 1,5% demonstrando as amplificações do fragmento de MAYV (925 pb), na primeira, segunda e terceira passagem (1ª, 2ª e 3ª) deste vírus nas células.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise estatística demonstrou baixa sensibilidade dos kits de diagnóstico rápido, do fabricante Bahiafarma®, para detecção de anti-DENV IgM (5%). Não foi possível calcular a sensibilidade dos kits de diagnóstico rápido para detecção de anti-CHIKV IgM e para detecção de anti-ZIKV IgM. Foi também demonstrado valores altos de especificidade para os kits de diagnóstico rápido para detecção de anti-ZIKV IgM (99%) e para detecção de anti-DENV IgM (84%), no entanto, o kit de diagnóstico rápido para detecção de anti-CHIKV IgM apresentou baixa especificidade (42%).

O estudo realizado por Prado e colaboradores em 2018, demonstrou uma sensibilidade de 78,44% e especificidade de 98% para o teste de diagnóstico rápido SD Bioeasy Dengue Duo (NS1/IgM) (Prado et al, 2018). Kosasih e colaboradores realizaram avaliação de dois testes de diagnóstico rápido para detecção de anti-CHIKV IgM, os autores demonstraram em estudo realizado em 2012, para o teste OnSite uma sensibilidade de 20,5% e especificidade de 100%, e para o teste SD Bioline uma sensibilidade de 50,8% e especificidade de 89,2% (64).

Apesar de ter sido demonstrada alta especificidade dos kits de diagnóstico rápido do fabricante Bahiafarma® para detecção de anti-ZIKV IgM e para detecção de anti-DENV IgM, os valores de predição negativa (VPN) obtidos foram baixos, 81% e 60%, respectivamente, o que reflete diretamente no número de casos falso-negativos. A técnica de PCR consiste em uma alternativa melhor do que os testes sorológicos para detecção de arbovírus, os quais por vezes podem não ser específicos, devido reações cruzadas entre os vírus (65).

O presente estudo demonstrou que dentre as 459 amostras submetidas à triagem sorológica por teste rápido e à avaliação molecular por RT-qPCR, apenas três amostras (0,7%) foram reagentes para anti-ZIKV IgM através do teste rápido, enquanto que na avaliação molecular para detecção de ZIKV, 58 amostras (12,6%) apresentaram resultado positivo. Para DENV, 39 amostras (8,5%) foram reagentes anti-DENV IgM, no entanto, 130 amostras (28,3%) apresentaram resultado positivo na avaliação molecular. Não possível realizar

esta comparação para CHIK, devido ausência de amostras reagentes para anti-CHIKV através do teste rápido.

Foram observadas, no presente estudo, após análise molecular, amostras com presença de coinfeção entre os arbovírus, onde 31 pacientes (6,7%); dois (0,4%) apresentaram coinfeção entre ZIKV e MAYV; 10 (2,2%) apresentaram coinfeção entre DENV e MAYV; três (0,7%) apresentaram coinfeção entre CHIKV e MAYV, e três (0,7%) apresentaram coinfeção entre ZIKV, DENV e MAYV.

Mercado-Reyes e colaboradores em estudo publicado em 2019 investigaram a presença de ZIKV, DENV e CHIKV em 23.871 casos suspeitos que foram reportados ao Instituto Nacional de Saúde da Colômbia. Os autores observaram através de análise molecular por RT-PCR, que 439 pacientes (1,84%) foram positivos para DENV, 257 pacientes (1,07%) foram positivos para CHIKV e 10118 (42,38%) foram positivos para ZIKV. Os autores observaram ainda a presença de coinfeção entre os arbovírus em 34 pacientes (0,14%), sendo que destes, 28 pacientes (82,3%) apresentaram coinfeção dentre CHIKV e ZIKV, três pacientes (8,8%) apresentaram coinfeção entre DENV e CHIKV, e três pacientes (8,8%) apresentaram coinfeção entre DENV e ZIKV (66).

Casos de infecção por arbovírus também foram confirmados por Azeredo e seus colaboradores em estudo realizado em 2018. Os autores avaliaram a presença de ZIKV, DENV e CHIKV em 134 pacientes e observaram através de análise molecular por RT-PCR que 69 pacientes (51,4%) apresentaram resultado para DENV e 38 pacientes (28,3%) apresentaram resultado positivo para ZIKV, no entanto nenhuma amostra apresentou resultado positivo para CHIKV. O estudo demonstrou que 18 pacientes (13,4%) apresentaram coinfeção entre DENV e ZIKV (67).

Ainda com relação à detecção molecular de arbovírus, o estudo realizado por Magalhães e seus colaboradores em 2017, avaliou um total de 263 amostras de pacientes com quadro sintomático de infecção por arbovírus. Os autores realizaram RT-PCR para detecção de ZIKV, CHIKV e DENV e observaram que 42 pacientes (15,9%) foram positivos para ZIKV, 137 pacientes (52,1%) foram positivos para CHIKV, no entanto nenhum paciente foi positivo para DENV. Corroborando com a literatura, bem como com os resultados do presente estudo,

os autores observaram a presença de coinfeção entre ZIKV e CHIKV em dois pacientes (0,8%) (68).

A cocirculação de arbovírus tem se tornado um problema de saúde pública com relação à dinâmica da transmissão, competência do vetor, espectro clínico e complicações durante a infecção. Desta forma, a detecção do patógeno e o manejo clínico adequado dos pacientes infectados dependem de alguns esforços, como por exemplo, a procura pelos serviços de saúde, por parte dos pacientes, logo no início dos sintomas; desenvolvimento de ferramentas diagnósticas acuradas, bem como o monitoramento e controle de patógenos por parte das agências governamentais para assim evitar a ocorrência de surtos (69).

O isolamento viral em cultivo de células é considerado padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de infecções virais (63). Não foi observada, no presente trabalho, a presença de efeito citopático evidente nas células vero após inoculação dos soros com resultado positivo para ZIKV, bem como os soros com coinfectados por MAYV, após análise por microscopia óptica. A confirmação do isolamento viral foi realizada através de RT-PCR convencional utilizando RNA extraído previamente a partir do sobrenadante obtido do cultivo celular. A análise molecular demonstrou amplificação do fragmento de interesse de ZIKV em todas as amostras submetidas ao isolamento viral em cultivo celular. Foi possível observar também, a amplificação do fragmento de MAYV em duas amostras de quatro amostras, das quais apresentaram coinfeção entre ZIKV e MAYV.

Barreto-Vieira e colaboradores em 2016, também realizaram isolamento de ZIKV em cultivo de células de Vero. Os autores confirmaram a presença do genoma de ZIKV no sobrenadante do cultivo celular através de análise molecular por RT-PCR. Foi realizada, ainda, análise ultraestrutural através de microscopia eletrônica, a qual demonstrou injúria na monocamada de células Vero, seis dias após a inoculação com ZIKV. Além das partículas virais envelopadas, os nucleocapsídeos observados indicaram que a replicação viral ocorreu (70).

Um estudo realizado por White e seus colaboradores em 2014, analisou 100 pacientes, dos quais 84 apresentaram resultado positivo para CHIKV através de RT-PCR. Das 84 amostras, 62 foram submetidas ao isolamento de CHIKV em células Vero E6 (ATCC CRL-1586), sendo que o volume insuficiente das demais amostras não permitiu a inoculação destas nas células. Os efeitos citopáticos

induzidos por CHIKV foram observados em 43 das 62 amostras submetidas ao isolamento viral após cinco dias de inoculação através de microscopia óptica. Efeitos citopáticos inconsistentes com os esperados para CHIKV foram observados em oito amostras das 62 submetidas ao isolamento viral, estando associados à coinfeção por outro arbovírus, o que foi demonstrado pelos autores após realização de testes moleculares destas amostras cultivadas, sendo que seis amostras apresentaram coinfeção por ZIKV, uma amostra apresentou coinfeção por DENV e uma amostra apresentou coinfeção por MAYV (71).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o kit comercial de diagnóstico rápido Bahiafarma® apresentou baixa sensibilidade para a detecção anti-DENV IgM. O kit Bahiafarma® para detecção de anti-ZIKV IgM apresentou elevada especificidade, entretanto, apresentou baixo valor preditivo negativo.

O kit Bahiafarma® para detecção de anti-DENV IgM, apresentou e baixa especificidade e baixo valor preditivo negativo, bem como o kit Bahiafarma® para detecção de anti-CHIKV IgM. Desta forma, baixa sensibilidade e baixa especificidade, podem ocasionar resultados equivocados, sendo necessária a confirmação da infecção através de métodos mais sensíveis como métodos moleculares.

A avaliação molecular por RT-PCR convencional e RT-qPCR demonstrou maior sensibilidade em relação à avaliação sorológica por teste rápido, no que diz respeito à detecção de arbovírus. Desta forma, a avaliação molecular demonstrou que ZIKV, DENV, CHIKV e MAYV estão circulando simultaneamente em Goiânia, causando não apenas monoinfecções, como também coinfeções por dois ou mais arbovírus, sendo que o maior percentual de coinfeções observado foi entre ZIKV e DENV.

O isolamento viral em cultivo celular, o qual é considerado padrão-ouro no diagnóstico de infecções virais, aqui realizado demonstrou a presença de ZIKV e MAYV nas células Vero, o que foi confirmado através de análise molecular por RT-convencional para amplificação dos fragmentos de interesse do material genético de ambos os vírus, apesar não terem sido observados efeitos citopáticos evidentes nas células, após observação em microscópio óptico.

Embora as arboviroses sejam doenças que cursam de maneira benigna na maioria das vezes, podem ocorrer casos graves com sequelas irreversíveis, como, por exemplo, a síndrome congênita do ZIKV, a qual causa microcefalia. Desta forma, é fundamental que a confirmação de infecção por arbovírus seja realizada por métodos diagnósticos laboratoriais sensíveis como a RT-PCR, PRNT e isolamento viral em cultivo celular, para assim evitar resultados

equivocados, os quais podem levar a um manejo inadequado da infecção, além de contribuir para a vigilância epidemiológica das arboviroses.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 2010;85(2):328–45.
2. Coffey LL, Forrester N, Tsetsarkin K, Vasilakis N, Weaver SC. disease. 2013;155–76.
3. Rust RS. Human Arboviral Encephalitis. *Semin Pediatr Neurol* [Internet]. 2012;19(3):130–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2012.03.002>
4. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2014;5(3):55–64.
5. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536–43.
6. Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* [Internet]. 2014;44(7):302–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>
7. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections – An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(41):1–8.
8. Donalisio MR, Freitas ARR, Zuben APB Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. *Rev Saude Publica.* 2017;51:30.
9. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Res* [Internet]. 2012;94(3):242–57. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>
10. Burgueño A, Frabasile S, Díaz LA, Cabrera A, Pisano MB, Rivarola ME, et al. Genomic characterization and seroprevalence studies on alphaviruses in Uruguay. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;98(6):1811–8.
11. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2012;8(7):420–9. Available at:

- <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>
12. Wu JQH. Virulence determinants of New World alphaviruses and broad-acting therapeutic strategies. *Future Virol.* 2015;10(5):647–57.
 13. Arias-Goeta C, Moutailler S, Mousson L, Zouache K, Thiberge JM, Caro V, et al. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect Genet Evol [Internet]*. 2014;24:116–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.015>
 14. Roberston M. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1955;49:33–57.
 15. Figueiredo ML, Morales LT. Review Article Emerging alphaviruses in the Americas□: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(October):677–83.
 16. Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. Chikungunya Virus 3' Untranslated Region: Adaptation to Mosquitoes and a Population Bottleneck as Major Evolutionary Forces. *PLoS Pathog.* 2013;9(8).
 17. van Duijl-Richter MKS, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. *Viruses.* 2015;7(7):3647–74.
 18. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest.* 2010;120(3):894–906.
 19. Sane J, Kurkela S, Desdouits M, Kalimo H, Mazalrey S, Lokki ML, et al. Prolonged myalgia inc sindbis virus infection: Case description and in vitro infection of myotubes and myoblasts. *J Infect Dis.* 2012;206(3):407–14.
 20. da Cunha R V., Trinta KS. Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(8):523–31.
 21. Anderson CR, Downs WG, Wattley GH, Ahin NH RA. Mayaro virus: a new human disease agent. II Isolation from blood of patients in Trinidad. 1957;6:1012–6.
 22. Lednicky J, Beau De Rochars VM, Elbadry M, Loeb J, Telisma T, Chavannes S, et al. Mayaro virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(11):2000–2.
 23. Auguste AJ, Liria J, Forrester NL, Giambalvo D, Moncada M, Long KC, et al.

- Evolutionary and Ecological Charact1. Auguste AJ, Liria J, Forrester NL, Giambalvo D, Moncada M, Long KC, et al. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg Infect Dis* [Internet]. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015;21(10):1742–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401714>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4593426>
24. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491–562.
 25. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Rodríguez Y, Pacheco Y, Anaya JM, Ramírez-Santana C. Mayaro: an emerging viral threat? *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018;7(1):1–11. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>
 26. Abad-Franch F, Grimmer GH, de Paula VS, Figueiredo LTM, Braga WSM, Luz SLB. Mayaro Virus Infection in Amazonia: A Multimodel Inference Approach to Risk Factor Assessment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(10).
 27. Coimbra TLM, Santos CLS, Suzuki A, Petrella SMC, Bisordi I, Nagamori AH, et al. Mayaro virus: Imported cases of human infection in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(4):221–4.
 28. Santiago FW, Halsey ES, Siles C, Vilcarrromero S, Guevara C, Silvas JA, et al. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):1–14.
 29. Chen Z, Lang D. The effectiveness of disease management interventions on health-related quality of life of patients with established arthritogenic alphavirus infections: a systematic review protocol. *JBI Database Syst Rev Implement Reports.* 2013;11(9):56–72.
 30. Lindenbach BD, Rice CM. The Viruses and Their Replication. *Fields Virol.* 2007;1101–13.
 31. Dick, G. W. A.; Kitchen SF. HAJ. ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46.
 32. Pettersson JHO, Eldholm V, Seligman SJ, Lundkvist Å, Falconar AK, Gaunt MW, et al. Erratum for Pettersson et al., “How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America?” *MBio.* 2018;9(2):1–7.
 33. Yoon KJ, Song G, Qian X, Pan J, Xu D, Rho HS, et al. Zika-Virus-Encoded

- NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2017;21(3):349-358.e6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.014>
34. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman G, Triwibowo V. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(3):389–93.
 35. Koppolu V, Shantha Raju T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. *J Neurovirol.* 2018;24(3):255–72.
 36. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* [Internet]. 2016;387(10027):1531–9. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6)
 37. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* [Internet]. 2016;388(10045):717–27. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616003391>
 38. de Brito CAA, Cordeiro MT. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: From hypotheses to evidence. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(5):537–43.
 39. Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ* [Internet]. 2016;352(February):i657. Available at: <http://dx.doi.org/doi:10.1136/bmj.i657>
 40. Snow GE, Haaland B, Ooi EE, Gubler DJ. Review article: Research on dengue during world war II revisited. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(6):1203–17.
 41. Hotta S. Experimental Studies on Dengue I. Isolation, Identification and Modification of the Virus Susumu. 1951;90(1):1–9.
 42. Perera, Rushika, Kuhn RJ. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11:369–377.
 43. Puerta-Guardo H, Mosso C, Medina F, Liprandi F, Ludert JE, del Angel RM. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains. *J Gen Virol.* 2010;91(2):394–403.
 44. Simmons, Cameron P.; Farrar, Jeremy J.; Chau, Nguyen van Vinh; Wills B. Current Concepts Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366:1423–32.

45. Hamel R, Liégeois F, Wichit S, Pompon J, Diop F, Talignani L, et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. *Microbes Infect.* 2016;18(7–8):441–9.
46. Passos RA, A M Marques GR, Voltolini Maria Lúcia F Condino JC. c Serviço Regional 3 (SR3) da SUCEN. *Rev Saúde Pública [Internet]*. 2003;37(6):729–63. Available at: www.fsp.usp.br/rsp
47. Juliano SA, Lounibos LP, O’Meara GF. A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: Differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia*. 2004;139(4):583–93.
48. Honório NA, Cabello PH, Codeço CT, Lourenço-De-Oliveira R. Preliminary data on the performance of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* immatures developing in water-filled tires in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(2):225–8.
49. Vezzani D, Carbajo AE. *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: Current knowledge and future directions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(1):66–74.
50. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):71–88.
51. Faria NR, Do Socorro Da Silva Azevedo R, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (80-)*. 2016;352(6283):345–9.
52. Prado PS, Almeida Júnior JTD, de Abreu LT, Silva CG, Souza L da C, Gomes MC, et al. Validation and reliability of the rapid diagnostic test ‘SD bioeasy dengue duo’ for dengue diagnosis in Brazil: A phase III study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(8):1–8.
53. Sotelo E, Llorente F, Rebollo B, Camuñas A, Venteo A, Gallardo C, et al. Development and evaluation of a new epitope-blocking ELISA for universal detection of antibodies to West Nile virus. *J Virol Methods*. 2011;174(1–2):35–41.
54. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:66–78.
55. Kim, Suhyeon; Park J-K. development of a Test Strip Reader for a Lateral Flow Membrane-Based Immunochromatographic Assay. *Biotechnol Bioprocess Engeneering*. 2004;9:127–31.

56. Chen R, Li TM, Merrick H, Parrish RF, Bruno V, Kwong A, et al. An internal clock reaction used in a one-step enzyme immunoassay of theophylline in whole blood. *Clin Chem*. 1987;33(9):1521–5.
57. Locascio-Brown L, Plant AL, Horváth V, Durst RA. Liposome Flow Injection Immunoassay: Implications for Sensitivity, Dynamic Range, and Antibody Regeneration. *Anal Chem*. 1990;62(23):2587–93.
58. Herr JC, Klotz KL, Anderson P, Adams E, Moore N, Howards S. Progress in developing an immunoassay device for sperm detection. *Clin Immunol Newsl* [Internet]. 1999;19(4–5):52–8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-1859\(00\)89199-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-1859(00)89199-2)
59. Hall RA, Blitvich BJ, Johansen CA, Blacksell SD. Advances in arbovirus surveillance, detection and diagnosis. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012.
60. Chaiyaratana W, Chuansumrit A, Pongthanapisith V, Tangnaratchakit K, Lertwongrath S, Yoksan S. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2009;64(1):83–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.004>
61. Higuchi1992.
62. Heid, Christian A.; Stevens, Junko; Livak, Kenneth J.; Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986–94.
63. Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect* [Internet]. 2016;72(5):507–24. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
64. Kosasih H, Widjaja S, Surya E, Hadiwijaya SH, Butarbutar DP, Jaya UA, et al. Evaluation of two IgM rapid immunoassay tests during circulation of Asian lineage chikungunya virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2012;43(1):55–61.
65. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* [Internet]. 2013;195(1):33–40. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.08.019>
66. Mercado-Reyes M, Acosta-Reyes J, Navarro-Lechuga E, Corchuelo S, Rico A, Parra E, et al. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. *Epidemiol Infect*.

- 2019;147:e77.
67. Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018;
 68. Magalhaes T, Braga C, Cordeiro MT, Oliveira ALS, Castanha MS, Maciel APR, et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife , Brazil. 2017;26:1–25.
 69. Estofolete CF, Terzian ACB, Colombo TE, de Freitas Guimarães G, Ferraz HC, da Silva RA, et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. *J Infect Public Health [Internet]*. 2019;12(2):178–81. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.09.007>
 70. Barreto-Vieira DF, Barth OM, da Silva MAN, Santos CC, Da Santos AS, Joaquim JB, et al. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(8):532–4.
 71. White SK, Mavian C, Elbadry MA, Beau De Rochars VM, Paisie T, Telisma T, et al. Detection and phylogenetic characterization of arbovirus dual-infections among persons during a chikungunya fever outbreak, Haiti 2014. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(5):1–13.

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é **Sandra Maria Brunini de Souza**, sou o pesquisador responsável e minha área de atuação é Doenças Transmissíveis.

Após ler com atenção este documento e ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Dra. **Sandra Maria Brunini de Souza**, no telefone: (62) 9-8107-4791, podendo ser ligação a cobrar, de 2^a a 6^a das 8:00 às 18:00hs.

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269-8338e 3269-8426ou no endereço: 1^a Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar. Horário de funcionamento: 2^a a 6^a das 7:00 às 17:00hs.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

Eu Sandra Maria Brunini de Souza, responsável pela pesquisa intitulada **“Estudo soropidemiológico e molecular da interação do zika vírus com o hospedeiro humano e a diferenciação clínica entre demais arboviroses circulantes em Goiânia –QUANTIZIKA humano”**estou convidando você para participar como voluntário deste estudo.

Esta pesquisa possui muitos objetivos e eu gostaria de explicar para você todos eles. Inicialmente nós vamos estudar o que acontece com as pessoas quando elas são infectadas pelos vírus da zika, da dengue, da chikungunya ou do mayaro, que são vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes aegypti*. Vamos estudar o que as pessoas sentem quando estão doentes, ou seja, quais são os sinais e sintomas que elas apresentam e se esses sinais e sintomas são iguais ou diferentes para cada tipo de vírus e de doença que eles causam. Além disso, aqueles que estiverem com zika serão examinados outras vezes durante um ano. A finalidade desse acompanhamento é para verificarmos se ocorrem mudanças no aparecimento dos sinais e sintomas da zika e também para saber por quanto tempo o vírus da zika permanece no organismo da pessoa infectada e se esse vírus sofre alguma mudança ao longo do tempo. Também, queremos saber se é possível uma mesma pessoa ter mais de uma dessas infecções ao mesmo tempo, o que nós chamamos de co-infecção.

Se você concordar em participar dessa pesquisa, eu farei algumas perguntas para você em forma de uma entrevista que deve durar mais ou menos 20 minutos. Essa entrevista é individual e será feita numa sala de consultório aqui mesmo onde você

está sendo atendido. Serão feitas perguntas sobre dados pessoais, e sobre as suas condições de saúde no momento da entrevista. Depois da entrevista, precisarei coletar um pouco de sangue para realização de testes laboratoriais que comprovam se você está ou não com uma dessas viroses (dengue, zika, chikungunya ou mayaro).

Se o seu exame der negativo para zika, você será dispensado das próximas etapas da pesquisa e não terá novas amostras coletadas.

Se o seu exame der positivo para zika, você será convidado a continuar na pesquisa por um ano. Nesse caso precisaremos de mais amostras de sangue e também de amostras da urina, da saliva e das secreções sexuais (secreção da vagina, para as mulheres, e semem, para os homens). Todas essas amostras precisarão ser coletadas quatro vezes, nos seguintes dias: 15^o; 45^o; 70^o; 120^o (seis meses) e 365^o dias (um ano) após a primeira coleta. Essas etapas são

Título da pesquisa: QUANTIZIKA Humano

Nome e rubrica do pesquisador:

Dra. Sandra Maria Brunini de Souza: _____

Rubrica do sujeito participante: _____

necessárias para a compreensão da evolução da infecção causada pelo vírus zika nas pessoas e assim podermos evitar problemas de saúde mais graves.

Gostaria de explicar para você como serão feitas as coletas dessas amostras. Os seus próximos exames serão agendados e no dia anterior, se você concordar, nós poderemos entrar em contato com você por telefone ou mensagem no celular ou por e-mail ou por outro meio de comunicação que você nos indicar como sendo o mais fácil de te encontrar, para te lembrar da data e verificar se você poderá comparecer a unidade para fazer os novos exames. O sangue, urina, saliva e secreção vaginal serão coletados no próprio CAIS por um profissional habilitado para essa finalidade. Dos homens com zika selecionados para o estudo precisaremos coletar amostras de semem. Nesse caso, agendaremos o seu exame em um laboratório particular conveniado com o projeto e garantiremos o seu deslocamento até o local, no dia e hora marcados, sem nenhum custo para o participante. O sangue –20 ml -será coletado no laboratório do CAIS, por meio de punção de uma veia, utilizando-se seringa e agulha descartáveis, para realização do teste rápido para o vírus da zika e outros testes laboratoriais, que são chamados de ensaios imunoenzimáticos e testes de biologia molecular, que poderão identificar os outros vírus. Precisaremos de um pouco de urina e de saliva, que serão coletados em frascos separados, no consultório onde você foi entrevistado. Um pouco de secreção da vagina será coletada com uso de um cotonete, com a participante deitada em mesa ginecológica, nesse mesmo ambulatório. Todos esses procedimentos serão repetidos nos dias agendados para o seu retorno a unidade.

Os pacientes com resultados positivos para qualquer um desses vírus serão agendados para seguimento clínico na Rede SUS, dentro do fluxo da Secretaria Municipal de Saúde.

Os riscos para os participantes da pesquisa estão relacionados às coletas das amostras biológicas. A coleta de sangue será feita por punção venosa e poderá causar dor e ocasionalmente extravasamento no local da punção. A coleta das secreções sexuais (secreção vaginal e semem) poderão ocasionar constrangimento ao participante. Esses riscos serão minimizados garantindo-se que a coleta das amostras biológicas seja realizada por profissional com experiência e utilização de material descartável em todo o procedimento. O ambiente de coleta das secreções sexuais será privativo e sempre precedido de orientação pelo profissional responsável. O paciente não terá nenhum custo com a pesquisa e as despesas com o seu deslocamento até a unidade, no período de acompanhamento serão de responsabilidade do Projeto. Os pacientes com resultados positivos para qualquer uma das viroses investigadas nessa pesquisa serão agendados para seguimento clínico na Rede SUS, dentro do fluxo da Secretaria Municipal de Saúde. Dentre os benefícios do estudo estão a oportunidade de confirmação laboratorial de infecção por esses vírus que afetam muitas pessoas em nossa cidade, pela parceria do projeto com a Secretaria de Saúde.

Para quem tiver um diagnóstico confirmado de infecção pelo vírus zika um dos benefícios, é a oportunidade de seguimento clínico e laboratorial, que é especialmente importante para mulheres em idade fértil ou homens cujas parceiras tenham desejo de reproduzir, porque conhecerão a sua situação sorológica em relação ao vírus zika. Esse conhecimento poderá favorecer um planejamento reprodutivo seguro para os casais.

Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação pela sua decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Você será indenizado em caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Sendo que não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros. As amostras biológicas serão utilizadas exclusivamente para esta pesquisa e, após a realização do estudo, serão descartadas conforme legislação vigente.

Se concordar em participar, por favor, assine o termo a seguir, que está em duas vias. Uma delas ficará com você e a outra com a pesquisadora responsável.

Nome e Assinatura do pesquisador _____

Consentimento Pós-Esclarecimento

Eu,

_____;

RG: _____ CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa **“ESTUDO SOROEPIDEMIOLÓGICO E MOLECULAR DA INTERAÇÃO DO ZIKA VÍRUS COM O HOSPEDEIRO HUMANO E A DIFERENCIAÇÃO CLÍNICA ENTRE DEMAIS ARBOVIROSES CIRCULANTES EM GOIÂNIA –QUANTIZIKA HUMANO”**. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Sandra Maria Brunini de Souza, responsável pela pesquisa, dos procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento, se for o caso).

Local e data: _____.

Nome e Assinatura do participante: _____

Assinatura datiloscópica



Eu, Sandra Maria Brunini de Souza obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito da pesquisa para a participação da pesquisa.

Assinatura da pesquisadora responsável: _____.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Pesquisadora responsável: Sandra Maria Brunini de Souza - Pesquisadora responsável.

Instituição: Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Goiás, Rua 227 Qd 68, S/N -Setor Leste Universitário -Goiânia -Goiás -Brasil -CEP: 74605-080 Telefone: (62) 3209-6280 -Fax: (62) 3209-6282.

Rubrica do Participante

Rubrica do Pesquisador

Título da pesquisa: QUANTIZIKA Humano

Nome e rubrica do pesquisador:

Dra. Sandra Maria Brunini de Souza: _____

Rubrica do sujeito participante: _____