UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico
diferencial de chikungunya, dengue e Zika**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Veronica Lippi Oliveira da Silva
Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Versão corrigida da dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em 03/05/2019. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Lippi, Veronica

Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika.

Ribeirão Preto, 2019.

103 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Aquino, Victor Hugo.

1. Dengue. 2. Zika. 3. Arbovírus. 4. Flavivírus. 5. Alfavírus. 6. Chikungunya. 7. Diagnóstico. 8. RT-PCR em tempo real. 9. *SYBR Green*. 10. Sonda.

VERONICA LIPPI OLIVEIRA DA SILVA

Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Aprovada em

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Osmar e Marta, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse subir mais um degrau na grande escada do conhecimento. Um a um, cada qual a seu tempo, jamais desistir.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me fortaleceu, ergueu e conduziu todos os dias durante este período de aprendizado, assim como todos os seres iluminados por Ele enviados.

À minha família; meus pais Osmar e Marta, minha irmã Tatiane, minha cunhada Sttephanie, meus cunhados Tales e Leonel, meus sogros Neusa (Isa) e Odair, e tias, tios, primos e primas (a lista aqui é bem grande); que me proporcionou toda a base emocional e psicológica, além de colaborar nos bastidores, enquanto estava ausente e até mesmo nos momentos em que estava presente apenas fisicamente. De forma especial ao meu esposo Glauco e meu filho Ícaro, que foram extremamente compreensivos aos meus momentos de loucura, ausência, preocupação, atrasos e quando trocavam as refeições por uma alimentação pouco saudável (Não que fosse um total infortúnio na singela opinião de ambos.). O que seria de mim sem vocês?

À equipe do Laboratório de Virologia e àqueles que por lá passaram deixando um pouquinho de si, Amanda, Glauciane, Mário, Alberto, Helda, Raquel, Analú, Mayra, Tammy, Samantha, Suelen e Mustafá e em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, afinal, sem o espírito colaborativo, a paciência, a fé e a persistência que lhes é peculiar, nada teria acontecido.

Ao Centro de Pesquisas em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPV-FMRP-USP) que foi uma fonte incessante de apoio e conhecimento e a pessoas muito especiais como a Soraya Jabur, a Evandra Rodrigues (Hemocentro) e a Rosane Queiroz (HC) que não mediram esforços quando se dispuseram em ajudar nos ensaios.

Ao Prof. Dr. Harnoldo Colares Coêlho, sempre prontamente disponível quando precisei trilhar os caminhos da saúde pública, da epidemiologia e do comitê de ética em pesquisa.

Às coordenações e às equipes de enfermagem da USF Paulo Gomes Romeo e UBDS Vila Virgínia que tão carinhosamente me acolheram e colaboraram no que foi possível para este trabalho seguir adiante; e à Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Ribeirão Preto pelo apoio e confiança depositados.

Aos amigos de sempre e de todas as horas, os quais prefiro não citar os nomes para não incorrer ao erro de um lapso de memória, o que seria imperdoável, tenho certeza de que todos se identificarão aqui. Pelos momentos “gourmet” ou de simples procrastinação ou, até mesmo, de alto teor ético que compartilhamos nestes 3 anos. Saibam que estes momentos serão inesquecíveis, geraram extrema felicidade e reavivaram tanto a minha criatividade quanto a minha determinação em concluir este trabalho. Espero poder, no futuro, diversas vezes relembrá-los com vocês e criar novas boas memórias. O mesmo digo aos colegas e grandes amigos virtuais, muitos dos quais ainda não tive oportunidade de conhecer pessoalmente, que mesmo que à distância estavam torcendo e colaborando da melhor forma possível para esta meta ser alcançada.

Aos amigos e colegas espalhados por todo o campus da USP-Ribeirão Preto, pelos momentos de preocupação mútua, pelos almoços produtivos, pelos resultados e conquistas festejados e, acima de tudo, pela alegria da companhia e cumplicidade de vocês, onde quer que eu estivesse dentro do campus estava cercada de pessoas maravilhosas.

Aos membros da minha banca de qualificação Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga, Dr. William Marciel de Souza e Dra. Vânia Santos Braz que contribuíram com observações e orientações extremamente construtivas e contribuíram com a melhoria deste trabalho.

Ao Serviço de Pós-graduação da FCFRP-USP por todo apoio oferecido, em especial a Rosana Florêncio, ao Henrique Teodoro e à Ana Lúcia Turatti.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Gratidão pelo apoio.

"Eu acredito que a ciência tem grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas."

- Marie Curie –

RESUMO

Lippi, Veronica. **Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika.** 2019. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As doenças causadas pelos vírus da chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) e Zika (ZIKV), principalmente na fase aguda, induzem sintomatologias muito semelhantes entre si. O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, enquanto os DENV e ZIKV pertencem ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. A rápida implementação de tratamento, especialmente nos pacientes com dengue, diminui drasticamente o número de casos fatais. O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real para diagnóstico diferencial e precoce de chikungunya, dengue e Zika. Sondas e *primers* específicos para CHIKV, ZIKV e os quatro sorotipos de DENV (DENV-1 a -4) foram desenhados a partir dos primeiros nucleotídeos da extremidade 5' dos genomas virais para amplificação de fragmentos com 150, 185 e 170 pares de bases para DENV, ZIKV e CHIKV, respectivamente. Diversos protocolos foram realizados para otimização da reação de RT-PCR em tempo real considerando as concentrações de sondas, íon magnésio e temperatura de anelamento de sondas e *primers*. Análises de reação cruzada mostraram que os *primers* e as sondas selecionadas foram altamente específicos para os vírus em questão, sem reconhecimento cruzado de outros flavivírus e alfavírus, com exceção das sondas para os DENV-3 e DENV-4 que apresentaram reação cruzada com outros sorotipos. A sonda para DENV-3 reconheceu cruzadamente o DENV-1 e a sonda para DENV-4 o DENV-2. O limite de detecção da RT-PCR para dengue com sondas foi de $9,90 \times 10^4$, $2,42 \times 10^2$, $6,55 \times 10^6$ e $3,70 \times 10^6$ cópias/mL para os DENV-1 a -4, respectivamente. Contudo, o limite de detecção da RT-PCR para dengue com *SYBR Green* foi de $9,90 \times 10^1$, $2,42 \times 10^1$, $6,55 \times 10^3$ e $3,70 \times 10^1$ cópias/mL para os DENV-1 a -4, respectivamente, inferior àquela utilizando sondas. Os limites de detecção da RT-PCR com sondas para o ZIKV e o CHIKV foram de $1,25 \times 10^0$ e $5,25 \times 10^0$ PFU/mL, respectivamente, similares aos resultados encontrados quando realizada a RT-PCR com *SYBR Green* para estes mesmos vírus que foram de $1,25 \times 10^1$ e $5,25 \times 10^0$ PFU/mL, respectivamente. Amostras de soro de indivíduos assintomáticos e amostras de soro, urina ou saliva armazenadas no biorrepositório “Banco de amostras de arbovírus” (FCFRP N° 006) do Laboratório de Virologia da FCFRP-USP, foram testadas com a RT-PCR com *SYBR Green* para dengue, observando-se uma sensibilidade de 54%, especificidade de 100%, valores preditivos positivo e negativo de 100% e 75%, respectivamente. Entretanto, quando avaliadas apenas as amostras de soro, observou-se uma sensibilidade de 82%, especificidade de 100%, valores preditivos positivo e negativo de 100% e 71% respectivamente, sugerindo que as amostras de soro são as mais indicadas para utilização no diagnóstico da dengue. Estas amostras também foram analisadas com as RT-PCRs com sondas para os vírus chikungunya e Zika, sendo todas negativas. As amostras detectadas com a RT-PCR com *SYBR Green* para dengue foram analisadas com a RT-PCR com sondas, sendo observada uma concordância de mais de 90% com os sorotipos previamente identificados. Conclui-se, portanto, que a detecção diferencial dos vírus é eficaz e fiel em uma única etapa e o método possui alta especificidade e sensibilidade.

Palavras-chave: Dengue. Zika. Arbovírus. Flavivírus. Alfavírus. Chikungunya. Diagnóstico. RT-PCR em tempo real. *SYBR Green*. Sonda.

ABSTRACT

Lippi, Veronica. **Development of real time RT-PCR for the differential diagnosis of chikungunya, dengue and Zika.** 2019. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Diseases caused by the viruses chikungunya (CHIKV), dengue (DENV) and Zika (ZIKV), specially in the acute phase, induced very similar symptoms. The CHIKV belongs to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*, while the DENV and ZIKV belong to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. The aim of this work was to develop a real time reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) for early and differential diagnosis of chikungunya, dengue and Zika. Specific primers and probes for CHIKV, ZIKV and the four DENV (DENV-1 a -4) serotypes were designed from the first nucleotides on the 5' end of the viral genomes to amplify fragments 150, 185, 170 base pairs fragments for DENV, ZIKV and CHIKV, respectively. Several protocols were analyzed for the optimization of the real time RT-PCR, considering probes concentrations, magnesium ion and the primers and probes annealing temperature. Cross-reactivity tests showed that the selected primers and probes were highly specific to the target virus without recognition of other flaviviruses and alphaviruses, except for the probes for DENV-3 and DENV-4, which showed cross-reaction with other serotypes. The probe for DENV-3 cross-reacted with DENV-1 and the probe DENV-4 with DENV-2. The limit of detection of the RT-PCR with probes for dengue was $9,90 \times 10^4$, $2,42 \times 10^2$, $6,55 \times 10^6$ and $3,70 \times 10^6$ copies/mL for DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4, respectively. However, the limit of detection of the RT-PCR with SYBR Green for dengue was $9,90 \times 10^1$, $2,42 \times 10^1$, $6,55 \times 10^3$ and $3,70 \times 10^1$ copies/mL for DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 respectively. The limit of detection of the RT-PCR with probes for ZIKV and CHIKV was $1,25 \times 10^0$ and $5,25 \times 10^0$ PFU/mL, respectively, similar to that found for the RT-PCR with SYBR Green, which was $1,25 \times 10^1$ e $5,25 \times 10^0$ PFU/mL for ZIKV and CHIKV, respectively. Serum samples from asymptomatic participants and serum, urine and saliva samples stored at the samples biorepository named "Banco de amostras de arbovírus" (FCFRP N° 006) of the FCFRP-USP Virology laboratory were tested with RT-PCR with SYBR Green for dengue and showed a 54% sensitivity, 100% specificity and 100% and 75% positive and negative predictive values, respectively. However, when only serum samples were analysed, it showed 82% sensitivity, 100% specificity and 100% and 71% positive and negative predictive values, respectively, suggesting that the serum samples are more suitable for dengue diagnosis. Those samples were also analyzed with the RT-PCR with probes for CHIKV and ZIKV, being all negatives. The samples detected with the RT-PCR with SYBR Green for dengue were analyzed with the RT-PCR with probes, showing to detect the expected serotype in more than 90% of them. Therefore, it's concluded that differential virus detection is effective and faithful in a single step and the method has high specificity and sensitivity.

Key words: Dengue. Zika. Arbovirus. Flavivirus. Alphavirus. Chikungunya. Diagnosis. Real time RT-PCR. *SYBR Green*. Probes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA VIRAL DE UM <i>FLAVIVIRUS</i>	3
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DE UM <i>FLAVIVIRUS</i>	3
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA VIRAL DE UM <i>ALPHAVIRUS</i>	5
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DE UM <i>ALPHAVIRUS</i>	6
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MULTIPLICAÇÃO VIRAL DE <i>FLAVIVIRUS</i> E <i>ALPHAVIRUS</i>	7
FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CICLO URBANO E DO CICLO SILVESTRE DOS ARBOVÍRUS.	8
FIGURA 7 – LINHA DO TEMPO DOS VÍRUS CHIKV, DENV E ZIKV QUANTO AOS PRINCIPAIS ACONTECIMENTOS EM RIBEIRÃO PRETO, NO BRASIL E NO MUNDO.	17
FIGURA 8 – MAPA DO LOCAL DE ESTUDO. REGIÃO METROPOLITANA E LIMITES DA CIDADE DE RIBEIRÃO PRETO. .	23
FIGURA 9 – MAPA DE LOCALIZAÇÃO DOS CENTROS DE RECRUTAMENTO.	24
FIGURA 10 – ORGANOGRAMA DO PROJETO. FLUXO DE COLETA DE DADOS E ANÁLISE DE RESULTADOS REFERENTES À PESQUISA.	26
FIGURA 11 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS A PARTIR DA TECNOLOGIA APOH.	31
FIGURA 12 – EXEMPLO DE ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DE DENV-2 PARA SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i> E SONDAS.	35
FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DOS DENV COM DESTAQUE À REGIÃO GENÔMICA SELECIONADA PARA ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> E SONDAS DESTES TIPOS VIRAIS.	35
FIGURA 14 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO ZIKV COM DESTAQUE À REGIÃO GENÔMICA SELECIONADA PARA ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> E SONDAS DESTE TIPO VIRAL.	36
FIGURA 15 – REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO CHIKV COM DESTAQUE À REGIÃO GENÔMICA SELECIONADA PARA ANELAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> E SONDAS DESTE TIPO VIRAL.	36
FIGURA 16 – ANÁLISE DO FUNCIONAMENTO DOS <i>PRIMERS</i> E SONDAS: RT-PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS MOSTRANDO AMPLIFICAÇÕES DE DENV-1 E -4 (A); DENV-2 E CHIKV (B); E DENV-3 E ZIKV (C). .	37
FIGURA 17 – ANÁLISE DO TAMANHO DOS AMPLICONS DAS RT-PCRS. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,8% DOS PRODUTOS DAS RT-PCRS EM TEMPO REAL DO ZIKV, DO CHIKV E DOS QUATRO SOROTIPOS DO DENV. A COLUNA 6 MOSTRA O MARCADOR DE MASSA MOLECULAR 1Kb PLUS DNA LADDER (INVITROGEN, EUA).	38
FIGURA 18 – GRADIENTE DE TEMPERATURA. Os vírus DENV-1 A -4, ZIKV E CHIKV FORAM SUBMETIDOS À RT-PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO DIFERENTES TEMPERATURAS DE ANELAMENTO.	39
FIGURA 19 – AMPLIFICAÇÃO DE DENV-3 (A) E DENV-4 (B) COMPROVANDO O FUNCIONAMENTO DAS RESPECTIVAS SONDAS.	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ETAPA 1 DA DETECÇÃO: REAÇÃO PARA <i>SCREENING</i> PARA DENV E REAÇÃO PARA DETECÇÃO DE ZIKV E CHIKV.....	28
TABELA 2 – ETAPA 2 DA DETECÇÃO: REAÇÕES DE DETECÇÃO DO SOROTIPO DE DENV.....	29
TABELA 3 – PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO	29
TABELA 4 – VÍRUS UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	31
TABELA 5 – INDIVÍDUOS COM DOENÇAS FEBRIS OU EXANTEMÁTICAS RECRUTADOS.	32
TABELA 6 – MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PARTICIPANTES RECRUTADOS.....	32
TABELA 7 – PARTICIPANTES ASSINTOMÁTICOS RECRUTADOS	33
TABELA 8 – AMOSTRAS SELECIONADAS NO BIORREPOSITÓRIO “BANCO DE AMOSTRAS DE ARBOVÍRUS” (FCFRP N°06).....	34
TABELA 9 – CARACTERÍSTICAS DAS SONDAS E <i>PRIMERS</i> SELECIONADOS.	37
TABELA 10 – CTS OBTIDOS NO GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE SONDAS PARA QUATRO VÍRUS	39
TABELA 11 – CTS OBTIDOS NA RT-PCR EM TEMPO REAL ANALISANDO UM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE Mg^{+2}	40
TABELA 12 – CTS OBTIDOS COM AMOSTRAS TRATADAS E NÃO TRATADAS COM O APOH.	41
TABELA 13 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE RNAs/DNAs CELULARES NA DETECÇÃO VIRAL DURANTE A RT-PCR EM TEMPO REAL.	42
TABELA 14 – ANÁLISE DO IMPACTO DA REDUÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRA NA RT-PCR EM TEMPO REAL.....	42
TABELA 15 – AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO COM SONDAS. RT-PCRs PARA CHIKV, ZIKV E OS QUATRO SOROTIPOS DE DENV EM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE RNA VIRAL.....	43
TABELA 16 – AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO COM <i>SYBR GREEN</i> . RT-PCRs PARA CHIKV, ZIKV E OS QUATRO SOROTIPOS DE DENV, EM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE RNA VIRAL.....	43
TABELA 17 – ENSAIOS EM TRIPLICATA PARA AVALIAÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA DAS SONDAS DE CHIKV, ZIKV E PARA OS QUATRO SOROTIPOS DE DENV.....	44
TABELA 18 – RESULTADOS OBTIDOS NAS ANÁLISES DE PROPRIEDADES DAS NOVAS SONDAS DE DENV-3 E DENV-4 PELO <i>CLC MAIN WORKBENCH 8.0.1</i>	45
TABELA 19 – AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO PARA NOVAS SONDAS DENV-3 E -4. RT-PCRs PARA DENV-3 E -4, EM GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE RNA VIRAL PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO COM SONDAS APÓS MUDANÇA DE SEQUÊNCIA.....	46
TABELA 20 – AVALIAÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA DA RT-PCR UTILIZANDO AS NOVAS SONDAS DE DENV-3 E DENV-4	46
TABELA 21 - RESULTADOS DOS ENSAIOS COM AS AMOSTRAS CLÍNICAS (SORO E SALIVA) DOS PARTICIPANTES SADIOS RECRUTADOS NO ESTUDO.	47
TABELA 22 – RESULTADOS DOS ENSAIOS PARA DETECÇÃO VIRAL COM AS AMOSTRAS CLÍNICAS (SORO, URINA OU SALIVA) DO BIORREPOSITÓRIO.....	48
TABELA 23 – RESULTADOS DOS ENSAIOS PARA DETECÇÃO DO SOROTIPO DE DENV NAS AMOSTRAS CLÍNICAS (SORO, URINA OU SALIVA) DO BIORREPOSITÓRIO DETECTADAS POR RT-PCR COM <i>SYBR GREEN</i>	48
TABELA 24 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE RT-PCR PARA CHIKV, DENV E ZIKV COM AS AMOSTRAS CLÍNICAS (SORO E SALIVA) DOS PARTICIPANTES COM DOENÇAS FEBRIS OU EXANTEMÁTICAS RECRUTADOS NO ESTUDO.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ApoH	apolipoproteína H
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSQV	vírus Bussuquara
CHIKV	vírus da chikungunya
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DCSA	dengue com sinal de alarme
DENV	vírus da dengue
DG	dengue grave
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSSA	dengue sem sinal de alarme
EEEV	vírus da encefalite equina do Leste
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FC	fixação do complemento
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
IFN- α	interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	inibição da hemaglutinação
ILHV	vírus Ilhéus
Kb	Kilobases
MAYV	vírus mayaro
MUCV	vírus mucambo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucleico
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
pb	pares de bases

PBS	Solução tampão de fosfato
PFU	unidade formadora de placa
QSP.....	Quantidade suficiente para
RT-PCR	transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase
ROCV	vírus rocio
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema nervoso central
SLEV	Vírus da encefalite de Saint Louis
SMSRP	Secretaria Municipal da Saúde de Ribeirão Preto
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tm	<i>Melt temperature</i>
UBDS	Unidade Básica Distrital de Saúde
USF	Unidade de Saúde da Família
USP	Universidade de São Paulo
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultravioleta
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WEEV.....	vírus da encefalite equina do Oeste
WNV.....	vírus do oeste do Nilo
YFV	vírus da febre amarela
ZIKV	vírus Zika

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
SUMÁRIO	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Gênero <i>Flavivirus</i>	1
1.1.1. Dengue.....	2
1.1.2. Zika.....	4
1.2. Gênero <i>Alphavirus</i>	4
1.2.1. Chikungunya	6
1.3. Multiplicação dos <i>Flavivirus</i> e <i>Alphavirus</i>	6
1.4. Transmissão	7
1.5. Imunopatogênese, tratamento e profilaxia.....	9
1.6. Histórico e epidemiologia.....	14
1.7. Diagnóstico Clínico e laboratorial.....	17
1.8. Aumento da sensibilidade dos métodos de detecção genômica	20
1.9. Justificativa.....	21
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Local de estudo	23
3.2 População de estudo e coleta de amostra clínica	24
3.3 Organograma de estudo.....	26
3.4 Seleção e desenho das sondas e <i>primers</i>	26
3.5 Purificação de amostras e extração de RNA viral.....	27
3.6 Detecção e identificação viral (RT-PCR em tempo real)	28
3.7 Eletroforese.....	30
3.8 Determinação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivos e negativos da RT-PCR para dengue	30
3.9 Aumento da sensibilidade através de ApoH	31
3.10 Vírus	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Recrutamento de participantes e coleta de amostras clínicas	32
4.2 Desenho de <i>primers</i> e sondas	35

4.3	Análise inicial do funcionamento dos <i>primers</i> e sondas selecionados.....	37
4.4	Padronização das RT-PCRs em tempo real.....	38
4.4.1	Gradiente de temperatura	38
4.4.2	Gradiente de concentração de sonda	39
4.4.3	Gradiente de concentração de magnésio	40
4.4.4	Condições ideais do protocolo de RT-PCR em tempo real	40
4.5	Tratamento de amostras de soro com ApoH	41
4.6	Análise da interferência de RNAs/DNAs celulares das amostras de sangue total na detecção viral	41
4.7	Detecção viral relacionada ao volume de amostra	42
4.8	Limite de detecção do método	43
4.9	Avaliação da reação cruzada das RT-PCRs	44
4.10	Desenho e substituição de sondas para DENV-3 e DENV-4	44
4.11	Análise de funcionamento das novas sondas para DENV-3 e DENV-4.....	45
4.12	Limite de detecção das novas sondas DENV-3 e DENV-4.....	45
4.13	Avaliação da reação cruzada das novas sondas para DENV-3 e DENV-4.....	46
4.14	Análise das RT-PCRs utilizando amostras clínicas.....	46
4.14.1	Determinação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivos e negativos da RT-PCR para dengue	49
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS¹	57
	APÊNDICE A – TCLE de assentimento de participantes menores de idade.	68
	Apêndice B – TCLE de responsáveis por participantes menores de idade.	70
	Apêndice C – TCLE de participantes sintomáticos.	72
	Apêndice D – TCLE de participantes saudáveis.	74
	Apêndice E – TCLE para guarda de material.	76
	ANEXO A - Fluxograma para classificação de risco de dengue.	78
	ANEXO B - Parecer substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP	79
	ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP sobre emenda	82
	ANEXO D - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de dengue. .	86
	ANEXO E - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de chikungunya.	87
	ANEXO F - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de Zika.	88

1 INTRODUÇÃO

Os seres classificados como vírus são parasitas celulares obrigatórios devido sua penúria estrutural para multiplicação e possuidores de um único tipo de ácido nucleico como genoma, o qual é envolvido e protegido por uma estrutura proteica. As teorias de sua origem são muito controversas e, mesmo que descritos apenas no fim do século XIX, documentos arqueológicos registram sua existência desde os primórdios das atividades humanas, por este motivo desempenham papel de grande importância na história evolutiva das espécies animais, vegetais e microbiológicas (Trabulsi *et al.*, 1999; Dos Santos *et al.*, 2008).

Sir Peter Medawar em meados do século XX afirmou que “Os vírus são um pedaço de más notícias envolto em proteínas” (Schatzmayer e Cabral, 2012), porém, hoje podemos ter outra perspectiva a respeito destes seres que apesar de ainda causarem sérias doenças e prejuízos aos animais e aos vegetais, podem, em muitos casos, não ser patogênicos e também servir como artefato para viabilizar curas, controlar pragas e promover a evolução da ciência mundial.

Neste trabalho, em particular, trataremos de vírus envelopados, transmitidos por vetores artrópodes, os mosquitos antropofílicos dos gêneros *Aedes* spp e *Culex* spp., e de suas zoonoses que causam anualmente grandes problemas de saúde pública não só no Brasil como em tantos outros países situados, principalmente, nas regiões tropicais e subtropicais do globo.

São vírus que possuem ácido ribonucleico (RNA) senso positivo como ácido nucleico, pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* que causam as infecções denominadas dengue, Zika e chikungunya; doenças estas negligenciadas que podem ser sinalizadoras de outras arboviroses (infecções virais transmitidas por vetor artrópode) emergentes, as quais podem vir a aumentar o rol de enfermidades que atingem as regiões tropicais e subtropicais do globo ou tornarem-se ameaças mundiais à saúde humana e veterinária.

No Brasil existem diversos fatores que propiciam a emergências de arboviroses e, dentre eles, podemos citar as cidades populosas, urbanização desordenada e grande variedade de mosquitos antropofílicos que intensificam a importância do estudo da sistemática evolutiva destes agentes infecciosos e desenvolver métodos de controle para eles.

1.1. Gênero *Flavivirus*

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, são os mais importantes causadores de surtos e epidemias no mundo. O gênero *Flavivirus* está constituído por 53

membros que são transmitidos pela picada de mosquitos ou carrapatos e podem acometer grande número de espécies de vertebrados.

As apresentações clínicas de uma infecção por flavivírus podem variar desde uma doença febril inespecífica a uma febre aguda, hemorragia ou até infecções no sistema nervoso central. Entre os flavivírus causadores de doenças em humanos podemos citar especialmente os vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), Nilo ocidental (WNV), encefalite de Saint Louis (SLEV), Zika (ZIKV), Ilhéus (ILHV), Bussuquara (BSQV) e rocio (ROCV) (Lopes *et al.*, 2014; Donalisio *et al.*, 2017).

Os vírus deste gênero são esféricos com aproximadamente 50 nm de diâmetro e podem ser inativados em pH ácido, temperaturas acima de 40°C, solventes orgânicos, detergentes, luz ultravioleta ou radiação gama. Possuem um envelope lipídico derivado da célula hospedeira, na qual estão ancoradas as glicoproteínas virais de superfície, e que recobre o capsídeo icosaédrico que contem no seu interior o genoma viral (Figura 1). O genoma viral é um RNA de fita simples, senso positivo com aproximadamente 11 kilobases, possui um cap (m⁷G5'ppp5' A) na extremidade 5' e sem cauda poliA na extremidade 3'. O RNA dos flavivírus possui uma única ordem de leitura (ORF), a qual codifica uma grande poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (preM) e envelope (E), e 7 proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que são necessárias na multiplicação e montagem de novas partículas virais. Nas extremidades 5' e 3', há regiões não codificadoras (UTRs) com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Essas regiões possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que são cruciais na iniciação e regulação dos processos de replicação, tradução e empacotamento viral (David M. Knipe, 2013) (Figura 2).

1.1.1. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa causada pelo DENV e reconhecida como entidade clínica desde 1779, porém, somente em 1943 o vírus foi isolado e identificado por Kimura e Hotta. Seu nome pode ter sido derivado do árabe arcaico onde significa fraqueza, das línguas portuguesa ou espanhola com influência moura que dá a dengue o significado de afetação, ou ainda do dialeto de Zanzibar, onde, durante a epidemia de 1870, falava-se sobre “Ki-denga Pepo” significando pancada ou golpe dado por um mau espírito, provocando ataque doloroso semelhante à câimbra (Figueiredo e Fonseca, 2005; World Health Organization, 2018b); em todos os casos o nome remete aos sintomas da doença ou ao comportamento decorrente dela.

Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral de um *Flavivirus*.

Fonte: Figura adaptada de ViralZone (Hulo C, 2018).

Figura 2 – Representação esquemática do genoma de um *Flavivirus*.

Fonte: Figura adaptada de ViralZone (Hulo C, 2018).

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou causar doença cuja magnitude do quadro clínico pode variar de formas leves a graves.

Estima-se que mais de 390 milhões de infecções ocorrem todos os anos, dos quais 96 milhões apresentam alguma manifestação clínica (Bhatt *et al.*, 2013). Com base em testes sorológicos, quatro sorotipos antigenicamente distintos são conhecidos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Sabin, 1950; Sweet e Sabin, 1954; Hammon *et al.*, 1960).

É considerada já há muitos anos a arbovirose mais prevalente em humanos e, segundo a Organização mundial da saúde (OMS), cerca de metade da população mundial está em risco de ser infectada pelo vírus e a dengue grave (DG) lidera os casos de doenças sérias e mortes em crianças da América Latina e Ásia (World Health Organization, 2018b).

1.1.2. Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus emergente que foi isolado pela primeira vez em 1947 do sangue de um macaco do gênero *Rhesus* propositadamente colocado como sentinela na floresta de Zika em Uganda para estudo de vigilância de febre amarela (Dick *et al.*, 1952), local este que inspirou o seu nome.

Ele está filogenética e antigenicamente relacionado ao vírus Spondweni e, com base na sequência do gene da proteína NS5, três linhagens de origens geográficas distintas foram identificadas: Leste africano, Oeste africano e Asiático (Faye *et al.*, 2014). O vírus introduzido nas Américas pertence ao grupo Asiático (Calvet *et al.*, 2016; Enfissi *et al.*, 2016).

1.2. Gênero *Alphavirus*

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros com distribuição de espécies bem desigual. O gênero *Rubivirus* é composto por um único representante, o *Rubella vírus*, enquanto os outros 31 representantes da família, incluindo o vírus chikungunya (CHIKV), estão classificados no gênero *Alphavirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018).

São vírus esféricos envelopados com nucleocapsídeo icosaédrico de 65 a 70 nm, de fita simples de RNA senso positivo contendo 10 a 12 kb (Figura 3).

É um gênero constituído por arbovírus em sua maioria, contendo apenas 2 representantes aquáticos e 1 representante com infecção restrita aos insetos, portanto, são importantes causadores de epidemias pelo mundo, tais como os *Flavivirus*, compartilhando, inclusive, os

mesmos vetores, os mosquitos antropofílicos dos gêneros *Aedes* spp, *Anopheles* spp e *Culex* spp. (Pybus e Rambaut, 2009; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018).

Figura 3 – Representação esquemática da partícula viral de um *Alphavirus*.

Fonte: Figura adaptada de ViralZone (Hulo C, 2018).

Podem ser inativados se mantidos por períodos superiores a 30 minutos em temperatura igual ou superior a 56°C, e também quando expostos à luz ultravioleta (UV), ácidos, detergentes, ureia ou formaldeído.

Possuem um RNA genômico que inclui um cap 5' e uma calda poli-A 3'. A UTR 5' é composta por 76 nucleotídeos e a UTR 3' por 526 nucleotídeos; possui duas ORFs, sendo que uma delas codifica uma poliproteína com 2474 aminoácidos que é posteriormente clivada por proteases em 4 proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) as quais são requeridas na multiplicação e montagem de novas partículas virais, e a outra ORF, composta por 3735 nucleotídeos, codifica uma poliproteína com 1244 aminoácidos que é posteriormente clivada por proteases em 5 proteínas estruturais (CP, E3, E2, 6K e E1).

As glicoproteínas do envelope E2 e E1 são transmembrana tipo 1 e aparecem em triplicata. Estas glicoproteínas são responsáveis pelo reconhecimento através do receptor do vírus e pela entrada na célula alvo por fusão de membrana (Khan *et al.*, 2002; Paul e Bartenschlager, 2013; Khan *et al.*, 2014). Existem 68 nucleotídeos não codificadores na região de transição entre as duas ORFs. As sequências nos finais 5' e 3', assim como na região intergênica, tem sequência de elementos repetidos conservados que atuam de forma importante na regulação da síntese do RNA viral (Arias-Goeta *et al.*, 2014) (Figura 4).

Figura 4 – Representação esquemática do genoma de um *Alphavirus*.

Fonte: Figura adaptada de ViralZone (Hulo C. 2018).

1.2.1. Chikungunya

O nome chikungunya é oriundo do dialeto Makonde (falado na Tanzânia e no norte de Moçambique) e significa “aquele que se curva”, remetendo à característica mais marcante da doença, a artralgia incapacitante (Robinson, 1955; International Committee on Taxonomy of Viruses, 2018).

O vírus CHIKV foi isolado primeiramente em 1953 na Tanzânia, logo após a descrição deste agente no surto ocorrido em 1952 neste mesmo local, a partir de soro de pacientes com doença febril associada a fortes dores articulares (Robinson, 1955) e tornou-se uma grande ameaça à saúde pública brasileira a partir do surto dos anos 2015-2016 devido seu potencial de cronificação.

1.3. Multiplicação dos *Flavivirus* e *Alphavirus*

Os vírus-alvo deste trabalho adentram as células do hospedeiro através do processo de endocitose mediada por clatrina (Sourisseau *et al.*, 2007) e a multiplicação acontece no citoplasma celular (Trabulsi *et al.*, 1999) como pode ser visto na Figura 5.

Logo após a penetração e desnudamento viral inicia-se a multiplicação, que nada mais é que o processo de produção de novos genomas virais a partir do original, os quais serão envolvidos pelas proteínas dos capsídeos e formarão novas partículas, ou *virions*. Para que isso ocorra, os vírus controlam o maquinário celular e utilizam suas estruturas e organelas em favor próprio, motivo este de não ser possível o cultivo de vírus em meios artificiais ou sintéticos.

Figura 5 – Representação esquemática da multiplicação viral de *Flavivirus* e *Alphavirus*.

Fonte: Figura adaptada de (Perera *et al.*, 2008).

Os vírus de RNA com polaridade positiva são os mais frequentes na natureza e seu mecanismo de multiplicação é o menos complexo entre todos eles, excetuando os retrovírus. A multiplicação destes vírus segue estratégias básicas, tais como: tradução da poliproteína viral precursora completa ou somente as proteínas não-estruturais; processamento do precursor ou do precursor não-estrutural por proteases virais; transcrição da fita de RNA complementar (negativa) pela RpRd viral a partir do molde genômico; transcrição da fita de RNA genômico (positiva) pela RpRd viral a partir da fita de RNA negativo ou transcrição da fita de RNAsm subgenômico que servirão de molde para tradução de proteínas estruturais pela RpRd viral a partir da fita de RNA negativo e, finalmente, a transcrição pela RpRd viral da fita positiva de RNA genômico completa (Dos Santos *et al.*, 2008).

1.4. Transmissão

O CHIKV, o DENV e o ZIKV são transmitidos aos humanos através da picada de mosquitos hematófagos. O vírus, replicado nas glândulas salivares do mosquito, começa a ser transmitido pela saliva que entra em contato com o hospedeiro vertebrado destes artrópodes durante o repasto (Dubrulle *et al.*, 2009) somente após a incubação do vírus no mosquito, que

pode ser de 8 a 12 dias após a ingestão durante picada em um indivíduo infectado. Porém, caso a ingestão em um indivíduo infectado seja interrompida e o mosquito termine seu repasto em um hospedeiro suscetível, a transmissão do vírus pode ocorrer sem que haja incubação no artrópode (Pan American Health Organization, 2019).

Estes vírus persistem nas áreas urbanizadas através do ciclo urbano da doença que tem como vetor o *Aedes aegypti*, e podem ser transportados a novas áreas nos mais diversos meios de transporte utilizados pelos seres humanos, contidos no vetor ou no seu hospedeiro vertebrado que migra de uma área a outra (Figura 6). Há também hospedeiros nas áreas não urbanizadas, o que proporcionará aos vírus a manutenção de sua espécie no ciclo silvestre.

Figura 6 – Representação esquemática do ciclo urbano e do ciclo silvestre dos arbovírus.

Fonte: (Tsetsarkin *et al.*, 2011)

O ciclo silvestre é normalmente enzoótico e zoonótico e tem como vetores o *Aedes albopictus* e o *Culex sp*, que são mosquitos com hábitos menos antropofílicos, mas com igual capacidade de transmissão que o *Aedes aegypti* (Figueiredo e Figueiredo, 2014). Uma mutação no genótipo Oeste Africano foi o que promoveu a adaptação do CHIKV ao *Aedes albopictus*, o qual prefere clima mais ameno, esse fator pode ser crucial à expansão do CHIKV pela Europa e outras regiões frias (Centro De Vigilância Epidemiológica, 2017).

A ligação entre o ciclo silvestre e o urbano pode acontecer quando o vetor silvestre entra em contato com um visitante ou habitante de arredores de áreas de mata ou peri-urbanas, e este indivíduo inadvertidamente infectado entra em contato com vetores do ambiente urbano.

No Brasil não se tem relatos de transmissão do CHIKV pelo ciclo silvestre, mas no continente africano esta transmissão é comum.

Nos períodos não epidêmicos os principais reservatórios destes vírus são mamíferos (macacos e roedores), aves e possivelmente alguns outros vertebrados não identificados até o momento; nos períodos epidêmicos os seres humanos tornam-se os reservatórios principais.

Aspectos epidemiológicos pouco comuns entre os flavivírus tem sido descritos para o ZIKV, como a transmissão por contato inter-humano, provavelmente durante relação sexual e perinatal (Besnard *et al.*, 2014; Musso, Roche, *et al.*, 2015). Também, há relatos sobre infecção congênita por ZIKV acometendo o sistema nervoso central (Calvet *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016; Rubin *et al.*, 2016) e transmissão vertical de DENV e CHIKV em *A. aegypti* e *A. albopictus*, como a transmissão venérea de mosquitos machos para fêmeas (Mavale *et al.*, 2010) e a transovariana em fêmeas infectadas pelo vírus (Martins *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2014).

O período de incubação costuma ser de 2 a 7 dias ou um pouco mais curto (2 a 4 dias) no caso do CHIKV, mas pode haver variação de até 12 dias.

1.5. Immunopatogênese, tratamento e profilaxia

Os vírus, assim como bactéria e outros parasitas, têm tropismo por determinadas células do hospedeiro vertebrado que possuem os receptores ou constituição interna interessante ao seu desenvolvimento, após a inoculação através da picada do artrópode, o vírus atinge o tecido subcutâneo e é fagocitado pelas células dendríticas que migram para os linfonodos e apresentam o antígeno ao sistema imune que ativa os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. A resposta imune inata é a primeira barreira contra esta invasão, a qual é predominantemente baseada em um interferon liberado que limita a propagação viral (Santos *et al.*, 2008; Schilte *et al.*, 2010). Caso o vírus consiga acessar o alvo, os monócitos/macrófagos, e consigam evadir-se do sistema imunológico do hospedeiro, se multiplicam e interagem com estas células e outros leucócitos, o qual induz a produção de interferon alfa (IFN- α) (Tsetsarkin *et al.*, 2007) que reduz a atividade da medula óssea. A renovação da linhagem celular sanguínea, que costuma ser rápida (plaquetas em 6 a 8 horas, granulócitos em 16 a 18 horas e monócitos em 24 horas) fica prejudicada devido à redução na atividade da medula o que leva ao aparecimento de alguns dos primeiros sintomas

dos pacientes de dengue, que são as petéquias (pontos hemorrágicos pelo corpo), a plaquetopenia e a leucocitose.

Os vírus podem atingir os órgãos-alvo através da corrente sanguínea devido seu tropismo natural, mas, além disso, o transporte destes vírus pode ser feito pelos monócitos/macrófagos infectados. Os órgãos-alvo para CHIKV são: músculos, articulações, fígado e cérebro; para DENV são: baço, fígado, nódulos linfáticos, medula óssea, pulmão, coração e intestino e para ZIKV são: sistema nervoso central, placenta e testículos (Jurado e Iwasaki, 2017; Rodriguez e J R. Walker, 2018).

A forma como o ZIKV consegue evadir-se do sistema imune e atingir órgãos que tem barreira imunológica altamente especializada ainda é uma grande incógnita para a ciência (Jurado e Iwasaki, 2017).

A chikungunya, a dengue e a Zika, principalmente na fase aguda, induzem sintomatologias muito semelhantes entre si e com outras doenças febris agudas como malária, tifo, leptospirose, sarampo, rubéola, gripe e várias arboviroses; além de possuírem oscilações nos padrões sintomáticos de acordo com a resposta imunofisiológica do indivíduo infectado, por isso, são frequentemente notificadas equivocadamente ou subnotificadas.

No ser humano, a infecção pelo DENV, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra reinfecção pelo mesmo sorotipo causador da doença, mas não contra outros sorotipos. Acreditava-se que as infecções secundárias (infecção por um sorotipo viral diferente ao da primeira infecção) e a presença de anticorpos pré-existentes contra DENV eram fatores de risco para desenvolvimento de dengue grave, porém, apesar do grande número de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para dengue grave e também há relatos em infecções primárias. Possivelmente fatores como a virulência da partícula infectante e a resposta do hospedeiro à infecção contribuam para o desenvolvimento deste quadro infeccioso mais intenso (Halstead, 1988; Monath, 1994; Mathew *et al.*, 1998; Rodenhuis-Zybert *et al.*, 2010).

Na dengue, a primeira manifestação frequentemente é a febre (39 a 40°C), de início abrupto que pode estar associada a cefaleia, adinamia, mialgias, artralgias, dor retro-orbitária e presença, ou não, de exantema e/ou prurido. Alguns pacientes podem evoluir para formas graves da doença e passam a apresentar aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento plasmático, ou choque hipovolêmico, que em alguns casos pode ser fatal. Anorexia, náuseas, vômito e diarreia podem estar associadas a esta fase febril, porém com menor frequência.

Os termos “dengue clássica” e “dengue hemorrágica” já não são mais utilizados pela comunidade médica e científica devido não serem representativos para todos casos de pacientes com a doença, por isso após reformulação de protocolos e análises da evolução da doença um grupo de especialistas de instituições nacionais e internacionais preparou a nova classificação para a dengue (ANEXO A) que substituiu os termos citados por “dengue sem sinal de alarme (DSSA)” (grupos A e B), “dengue com sinal de alarme (DCSA)” (grupo C) e “dengue grave (DG)” (grupo D). Classificação esta que o Brasil passou a adotar desde 2014 (Ministério Da Saúde, 2016).

Grande parte dos pacientes tem gradativa melhora e recuperação geral na fase febril, porém alguns casos podem entrar em fase crítica, por motivos intrínsecos ao hospedeiro, e apresentar sinais de alarme a partir do terceiro até o sétimo dia de sintomas, os quais podem ou não evoluir para a DG. Os sinais a serem observados são dor abdominal intensa, hipotensão postural, hepatomegalia, aumento de hematócrito e sangramento de mucosa, entre outros que estão listados no ANEXO A.

A DG caracteriza-se pelo agravamento dos sinais de alerta e consequente extravasamento de plasma que pode acumular-se no peritônio e causar desconforto respiratório, disfunção de órgãos como o coração, pulmão, rins, fígado e sistema nervoso central (SNC). Se o quadro não for revertido o paciente pode entrar em choque e vir a óbito no prazo de 12 a 24 horas (choque) ou de 24 a 48 horas (choque prolongado) devido ao alto volume plasmático perdido. Em alguns casos de DG pode ocorrer a hemorragia massiva sem choque prolongado, sendo mais comum em pacientes com histórico de comprometimento gástrico ou que ingeriram determinados medicamentos, como por exemplo o ácido acetilsalicílico (AAS) (Ministério Da Saúde, 2016).

Uma vacina contra DENV vem sendo desenvolvida desde 1929, quando os primeiros esforços para esta meta foram iniciados. Uma monovalente foi apresentada nos anos de 1944 e 45, porém, não se mostra eficaz nos dias atuais por não ser abrangente aos 4 sorotipos virais conhecidos, somente em 1971 os Estados Unidos iniciam a tentativa de desenvolvimento de uma vacina tetravalente e atualmente existem diversas construções candidatas em variados estágios de desenvolvimento, testes clínicos e pré-clínicos ao redor do mundo (Pan American Health Organization, 2019). Em 2015 a empresa Sanofi-Pasteur registrou no México uma vacina tetravalente recombinante para DENV chamada Dengvaxia que deve ser administrada em 3 doses (0/6/12 meses), porém, ainda não foi possível obter imunidade prolongada (Halstead e Thomas, 2018).

A febre de Zika caracteriza-se por sintomas similares aos da dengue, com maior intensidade de hiperemia conjuntival e exantema maculopapular frequentemente pruriginoso, a

febre, nestes casos, costuma ser mais baixa que nas infecções por DENV. Este quadro agudo costuma perdurar por três a sete dias. Alterações hematológicas relevantes como hemoconcentração e plaquetopenia não são observadas. Especialmente no estado de São Paulo, as gestantes que apresentem exantema devem ser submetidas à confirmação laboratorial da infecção por ZIKV; e os recém-nascidos expostos ao vírus, apresentando ou não alterações neurológicas, devem ser submetidos a coleta de urina, líquido (a critério do médico responsável), e ter coletado o sangue de seu cordão umbilical e fragmentos da placenta (Centro De Vigilância Epidemiológica, 2017).

Não há relatos de reinfecção pelo ZIKV, portanto, pode-se afirmar que uma infecção produz imunidade permanente (Pinto Junior *et al.*, 2015).

As associações de infecção por Zika com a síndrome de Guillain-Barré (SGB) ou com microcefalia são os agravantes que mais preocupam a população e as autoridades em épocas propícias a surtos deste vírus (período sazonal).

Durante as epidemias de Zika na Polinésia em 2013 e no Brasil em 2015, houve um aumento de notificação de casos de SGB, que se caracteriza por uma doença neurológica grave, pós-infecciosa, o que não invalida os casos de síndrome desencadeados por resposta autoimune, e que tem como princípio a produção de anticorpos contra gangliosídeos neuronais que, ao terem seus axônios agredidos, interrompem a neurotransmissão levando a paralisias nos pacientes (Oehler *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2016).

Há um forte consenso científico de que, considerando-se as evidências disponíveis a respeito de surtos do ZIKV e infecções por esse vírus durante a gravidez, a explicação mais plausível para o desencadeamento de quadros de SGB e de anomalias congênitas do sistema nervoso central, incluindo microcefalia, é que o ZIKV é o causador das mesmas. (Willison *et al.*, 2016; World Health Organization, 2016b; Del Campo *et al.*, 2017; Krauer F *et al.*, 2017)

A febre chikungunya tipicamente se manifesta após o período de incubação e a viremia persiste até 5 dias após a ausência dos sintomas, que incluem febre (92% dos casos), artralgia (87% dos casos), dor nas costas (67% dos casos) e dor de cabeça (62% dos casos), vômito, exantema e mialgia (Monath e Hinz, 1996). A febre começa subitamente e atinge 39-40°C, causando calafrios e normalmente duram 24-48 horas. A dor nas articulações é a característica principal da doença, normalmente é mais intensa no período da manhã, e a maioria dos pacientes tem uma poliartrite migratória, inclusive com derrame nas articulações. Os tornozelos, pulsos e pequenas articulações das mãos são os pontos mais afetados, entretanto, as grandes articulações como os joelhos, ombros e espinha dorsal podem também ser envolvidas. Em seguida da febre com 2-5 dias da doença pode aparecer um exantema maculopapular não

pruriginoso na face, membros e tronco que duram cerca de 10 dias. As manifestações neurológicas incluem convulsões febris, meningite e encefalite. Manifestações oculares como neurorretinites e uveítes são comuns. A febre, a artrite e o exantema podem reaparecer após um período de ausência. Em alguns casos a artrite debilitante e doença articular crônica podem ocorrer. Choque ou morte são raros em infecções por CHIKV. Apesar da febre chikungunya apresentar manifestações clínicas parecidas com a febre da dengue, requer um maior período de convalescença e leva o paciente a maiores períodos fora do trabalho (Simon *et al.*, 2011) ou até mesmo à artralgia crônica o que gera impacto econômico e social maior que o produzido pelo DENV e ZIKV (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

Um estudo que analisou as doenças articulares induzidas pelo CHIKV demonstrou solução completa para 87,9% dos casos enquanto que 3,7% tem dor esporádicas e rigidez articular, 2,8% tem rigidez articular persistente sem dor e 5,6% tem dor persistente no movimento das articulações (Kennedy *et al.*, 1980). Ainda não foram registrados relatos de reinfecção pelo CHIKV, portanto, até o momento afirmamos que uma infecção produz imunidade permanente (Santos *et al.*, 2008).

Há relatos de diversos casos de co-infecção por dois ou mais vírus (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015; Villamil-Gomez *et al.*, 2016; Iovine *et al.*, 2017; Vogels *et al.*, 2019) com variadas combinações entre eles, sendo alguns fatais e outros sem gravidade. As co-infecções podem ocorrer em transmissão simultânea dos vírus por um único vetor ou em transmissão sequencial por dois ou mais vetores.

Há diversas formulações de vacinas em desenvolvimento, porém, nenhuma disponível e/ou registrada para prevenir as infecções por ZIKV ou CHIKV.

Um estudo publicado na revista Science em 02/2019 relata casos de imunidade contra o ZIKV a partir de exposição prévia e alta resposta imunológica gerada pelo DENV em uma comunidade na Bahia. O grupo sugere que altas taxas de IgG contra DENV podem proteger o indivíduo contra a infecção por ZIKV, mas o mesmo não pode ser dito para os sorotipos do DENV (Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2019).

Quanto ao tratamento, excetuando-se os casos de cronicidade causada pelo CHIKV e malformações neurológicas congênitas ou de associação com a SGB provocadas pelo ZIKV, estas doenças, assim com a dengue, são autolimitadas e não possuem fármacos antivirais específicos, por isso os esforços concentram-se no alívio dos sintomas.

Os salicilatos (simpaticoaminas e aspirinas) não causam nem induzem os fenômenos hemorrágicos em doentes por ZIKV ou CHIKV, porém, como o diagnóstico clínico pode ser equivocado, não se aconselha o uso destes analgésicos para as dores musculares e articulares

por prevenção aos efeitos potencializadores que podem decorrer em uma infecção por DENV. A hipovolemia é tratada com hidratação permanente ou transfusão sanguínea nos casos onde constata-se a hemorragia; as febres com antitérmicos e os exantemas pruriginosos com anti-histamínicos (Trabulsi *et al.*, 1999). Para todos os casos recomenda-se repouso e hidratação intensos.

A profilaxia para tais doenças até que sejam consolidadas as vacinas que estão em desenvolvimento, consiste no combate ao vetor, principalmente na eliminação de criadouros, e proteção pessoal e residencial contra ele.

1.6. Histórico e epidemiologia

A primeira descrição de epidemia de dengue (epidemias simultâneas em Jacarta e Cairo) foi realizada por Benjamim Rush em 1780 na Filadélfia, Estados Unidos da América (Siler *et al.*, 1926; Santos *et al.*, 2008). Os primeiros surtos e epidemias brasileiros de dengue datam de 1846 no Rio de Janeiro, 1896 em Curitiba e 1917 no Rio Grande do Sul (Figueiredo e Fonseca, 2005). Com isso, a partir de 1903, uma campanha de erradicação do *Aedes aegypti* com intuito de combater a febre amarela foi empreendida por Emílio Ribas e Oswaldo Cruz, e apesar de ter-se intensificado a partir de 1920 com o apoio da Fundação Rockefeller e da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO), outra epidemia ocorre entre 1922 e 1923 no Rio de Janeiro e Niterói. No entanto, a campanha foi bem sucedida e não houve relatos de outras epidemias de dengue no Brasil até 1981 (Vasconcelos *et al.*, 1999).

Em 1950 as Filipinas e a Tailândia passam por um grande surto e registra-se, pela primeira vez, casos de DG.

Pouco tempo após o surto filipino-tailandês de dengue, surge no cenário mundial a febre chikungunya que foi descrita após um surto na Tanzânia em 1952. O CHIKV ocorreu com grande frequência somente na Ásia, África e Índia subcontinental até 2015 (World Health Organization, 2018b).

Em 1954 os primeiros três casos de infecção em humanos por ZIKV foram descritos, na Nigéria (Macnamara, 1954; Pinto Junior *et al.*, 2015).

Com novas introduções e expansão da dengue na América Central e Caribe, somada à nova infestação do Brasil pelo mosquito, um novo surto ocorreu em Boa Vista - RR, causado pelos DENV-1 e DENV-4 provocando doença febril indiferenciada e DSSA em 11.000 indivíduos (Osanai *et al.*, 1983).

Em 1986 o DENV-1 originado do Caribe foi introduzido em Nova Iguaçu, disseminando-se pela região metropolitana do Rio de Janeiro causando cerca de 95.000 casos notificados de febre indiferenciada e DSSA (Schatzmayer *et al.*, 1986; Nogueira *et al.*, 1988). Em 1987 foi introduzido no estado de São Paulo, e após 10 anos, em 1997, os relatos de casos autóctones associavam-se ao DENV-2 e em 2002 e 2011 ao DENV-3 e DENV-4 respectivamente (Centro De Vigilância Epidemiológica, 2017).

O DENV-1, então, disseminou-se para outros estados brasileiros gerando um problema de saúde pública até que, em 1990, a situação torna-se mais grave devido as cidades de Niterói e Rio de Janeiro serem afetadas por um surto de DENV-2, também proveniente do Caribe, resultando pela primeira vez em formas graves da doença no Brasil com confirmação pelo Ministério da Saúde de 435 casos de DG e 3 óbitos (Nogueira *et al.*, 1993).

O primeiro caso autóctone de DENV-3 foi detectado no ano 2000 no Rio de Janeiro (Nogueira *et al.*, 2001; Miagostovich *et al.*, 2002; De Simone *et al.*, 2004), disseminando-se por todo o país e contribuindo para que em 2002 fossem notificados quase 800.000 casos de DSSA, 270 casos de DG e 150 óbitos (Figueiredo e Fonseca, 2005). A partir de 2002, grandes epidemias ocasionadas, principalmente, pelo sorotipo 3 do DENV ocorreram no Brasil, causando infecções humanas de alta morbimortalidade (World Health Organization, 2009). Até o ano de 2006 os casos de DG ocorreram predominantemente na faixa etária dos 20 aos 40 anos de idade e, neste mesmo ano, casos importados do CHIKV foram relatados na Europa e nos Estados Unidos, assim como na América do Sul a Guiana Francesa relatou 30 casos importados da Índia (Center of Disease Control and Prevention, 2007).

Em 2007, além do aumento no número de casos de DENV com mais da metade deles registrada em menores de 15 anos de idade em várias regiões do Brasil (Cavalcanti *et al.*, 2011), o ZIKV emerge da Ásia e África pela primeira vez, causando uma epidemia na Ilha de Yap, na Micronésia (Musso, Cao-Lormeau, *et al.*, 2015) e o CHIKV causa mais de 1 milhão de infecções na Índia, com 1200 mortes, e na Itália, perto do Mar Adriático, foram relatados 220 casos e 1 morte. O surto italiano provavelmente foi iniciado por um caso importado (World Health Organization, 2007). Desde sua saída do continente asiático e africano até o mês de outubro de 2016, a transmissão do ZIKV foi documentada em 73 países e territórios (World Health Organization, 2016a).

Uma reemergência de DENV-1 no estado de São Paulo ocorreu em 2009 e este sorotipo passa a ser o mais prevalente no estado até o momento.

Na epidemia de 2013, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou a circulação dos quatro sorotipos sendo que o DENV-4 foi o de maior prevalência, correspondendo a 52,6% das

amostras analisadas até fevereiro de 2013; enquanto isso, outra nova grande epidemia de ZIKV foi registrada na Polinésia Francesa até o ano de 2014 de onde o vírus se disseminou para diversos países da Oceania (Musso, Cao-Lormeau, *et al.*, 2015; Krauer F *et al.*, 2017). Este surto também é a provável origem do ZIKV que foi introduzido nas Américas pelo Brasil e rapidamente se disseminou para diversos países do continente (Petersen *et al.*, 2016) e no final deste ano, mais especificamente no mês de dezembro de 2013, o genótipo asiático do CHIKV foi introduzido nas Américas pelo Caribe e o primeiro caso autóctone foi relatado em Saint Martin e nas Antilhas Francesas (Fischer *et al.*, 2014; Vega-Rúa *et al.*, 2014).

Em agosto de 2014 a epidemia de CHIKV atingiu a América Central (Nicarágua e El Salvador) e do Sul. Mais de 200 casos suspeitos foram relatados na Venezuela e mais de 1000 na Colômbia (Pan American Health Organization, 2014) e dezenas de casos no Brasil em viajantes vindos do Haiti, da República Dominicana e da Guiana Francesa. Logo após, no mês de setembro, acontecem os primeiros casos de transmissão autóctone do CHIKV no Brasil quando o Ministério da Saúde relatou dois casos de indígenas com febre chikungunya no estado do Amapá e um surto do genótipo asiático do CHIKV surge em Feira de Santana na Bahia com centenas de casos suspeitos. A situação a respeito do CHIKV na Bahia evoluiu rapidamente e na primeira semana de outubro, 722 casos suspeitos foram relatados em outras 10 cidades, sem contar outros casos no estado de Minas Gerais (Ministério Da Saúde, 2014).

Primeiramente no Brasil, a ocorrência de infecções humanas por ZIKV foi identificada no início de 2015, na região nordeste (Campos *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2015; Zanluca *et al.*, 2015) e até janeiro de 2016, 21 estados, prevalentemente na região nordeste, confirmavam a circulação do vírus (Calvet *et al.*, 2016); porém, um estudo posterior estima que a introdução do ZIKV no Brasil ocorreu entre maio e dezembro de 2013, época de ocorrência de um grande evento esportivo (Copa das Confederações). A não correlação de casos ao ZIKV neste período de pouco mais de 12 meses possivelmente se deu por ausência de sintomas dos indivíduos infectados ou diagnóstico clínico equivocado (Faria *et al.*, 2016). A Secretaria da Saúde de Ribeirão Preto identificou os primeiros casos de Zika em dezembro de 2015 e em janeiro de 2016 notificou 445 casos suspeitos dentre os quais, 90 foram confirmados (Secretaria Municipal Da Saúde De Ribeirão Preto, 2019), mesmo ano em que um grande surto do CHIKV atingiu diversos países do continente americano (World Health Organization, 2018a).

Atualmente, os quatro sorotipos do DENV se encontram circulando no país, inclusive numa mesma região, e isso aumenta o risco de casos de DG (Villabona-Arenas *et al.*, 2014).

Considerando-se que ainda não estão disponíveis vacinas ou fármacos antivirais para os vírus em questão e o Brasil está infestado de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, o

controle de epidemias baseia-se unicamente no combate tradicional aos vetores (Vega-Rúa *et al.*, 2014; Weaver, 2014).

Segundo as “Diretrizes de controle das arboviroses urbanas no Estado de São Paulo” – Secretaria de Estado da Saúde (2017, p.7)

A incidência de casos pode ser reduzida por meio da ação coordenada entre as vigilâncias epidemiológica, entomológica, sanitária e laboratorial buscando prever a ocorrência de surtos e epidemias; do controle vetorial; do abastecimento regular e acondicionamento seguro de água; da coleta e o destino apropriado dos resíduos sólidos; da comunicação eficiente e capaz de gerar boas práticas de cuidado ambiental.

Figura 7 – Linha do tempo dos vírus CHIKV, DENV e ZIKV quanto aos principais acontecimentos em Ribeirão Preto, no Brasil e no mundo.

1.7. Diagnóstico Clínico e laboratorial

Conforme foi mencionado no item 1.5, a sintomatologia das doenças dengue, Zika e chikungunya é muito semelhante entre si e entre outras doenças infecciosas e, devido este fator, o diagnóstico clínico eficaz e diferencial torna-se comprometido, sendo as doenças febris exantemáticas enquadradas em uma classificação clínica de “febre dengue-like” ou “febre tipo-dengue” e frequentemente solicitam-se ensaios laboratoriais como ferramentas adicionais para confirmação ou exclusão deste diagnóstico.

O diagnóstico laboratorial de infecção por CHIKV, DENV e ZIKV pode ser realizado através da detecção da partícula, do genoma ou de antígenos virais, ou de anticorpos do hospedeiro, sendo os ensaios realizados individualmente ou em associação.

Para a fase aguda inicial destas doenças recomenda-se o uso de testes de detecção de antígenos, detecção de ácido nucléico ou isolamento e identificação viral através da inoculação em cultura de células, sendo este último o menos utilizado na rotina clínica devido ao tempo exigido para o teste. Ainda assim, o isolamento viral é considerado o padrão de referência para comparação com os demais métodos (Santos *et al.*, 2008).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos dos tipos Imunoglobulina G (IgG) e/ou Imunoglobulina M (IgM), tais como: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), neutralização, imunofluorescência (direta ou indireta) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), são os mais amplamente utilizados na fase aguda, a partir do quinto dia do início dos sintomas, e na fase de convalescença (World Health Organization, 2009).

As metodologias utilizadas para o diagnóstico precoce são técnicas moleculares cujo objetivo é a detecção do genoma viral, transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional e a RT-PCR em tempo real e, por fim, a hibridação de ácidos nucleicos que é aplicável tanto para amostras clínicas quanto para tecidos fixados provenientes de biópsia ou necropsia. Esta última com pouca utilização devido à complexidade para obter resultados com boa reprodutibilidade, o que a torna de difícil aplicação em rotina e é mais conveniente como ferramenta de pesquisa (Gubler, 1998).

A RT-PCR convencional é um método que possibilita a amplificação de sequências genômicas específicas do RNA viral e que serão visualizadas quando submetidas à eletroforese.

A aplicação de técnicas de fluorescência na RT-PCR, capaz de combinar amplificação, detecção e quantificação levou ao desenvolvimento do novo método denominado RT-PCR em tempo real. A RT-PCR em tempo real, assim como a convencional, possibilita a amplificação de fragmentos genômicos (*amplicons*), contudo a detecção dos produtos é feita diretamente na própria plataforma de instrumentação utilizando marcadores fluorescentes e métodos sensíveis de mensuração da fluorescência emitida. O método não requer manipulação após a amplificação, sendo por isso chamado de sistema fechado ou homogêneo. As principais vantagens deste sistema homogêneo são redução do tempo necessário para a realização do teste, possibilidade de quantificação da carga viral e baixo risco de contaminação com o produto amplificado (Heid *et al.*, 1996; Niesters, 2002). Foi descrito uma RT-PCR em tempo real de simples execução e de alta sensibilidade para diagnóstico precoce da dengue (Dos Santos *et al.*, 2008); este método se baseia no uso do agente intercalante de DNA, o *SYBR Green*, que emite

fluorescência ao ligar-se inespecificamente às fitas duplas de DNA, e um par de sequências iniciadoras (*primers*) que reconhecem uma região altamente conservada nos quatro sorotipos do DENV. Esta técnica mostrou ser útil, inclusive, para detecção do DENV em saliva e urina (Poloni *et al.*, 2010; Poloni *et al.*, 2016). Este método desenvolvido possui um grande potencial para o uso no diagnóstico precoce da doença, entretanto não permite a identificação viral precisa quando a região genômica é comum a mais de um sorotipo ou espécie, e este fator é de grande importância epidemiológica.

Com a contínua evolução tecnológica da RT-PCR em tempo real, foi desenvolvido um sistema que usa sondas capazes de interagir com o *amplicon* em formação e identificar com fidelidade espécies e sorotipos virais, essa tecnologia foi denominada *Taqman* e consiste de uma sequência complementar a uma parte da região do genoma a ser amplificada. Ligadas a esta sequência existem duas moléculas, uma está ligada na extremidade 5' e é denominada apresentadora (*Reporter* = *R*), a outra está ligada na extremidade 3' e é denominada capturadora de energia (*Quencher* = *Q*). Enquanto estiverem ligados, *Q* não permite que a energia de excitação da sonda seja suficiente para gerar luminosidade em *R*, esta energia só se tornará suficiente se a sonda estiver hibridizada ao fragmento-alvo e a enzima (*Taq* polimerase) romper a ligação entre *Q* e *R* durante a etapa de extensão (Mackay *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2008).

Uma forma de diminuir os custos da reação e aumentar a velocidade de diagnóstico é executar o *multiplex*-PCR, que consiste em incluir dois ou mais conjuntos de *primers* em uma única reação, possibilitando assim um diagnóstico diferencial ou múltiplo. O *multiplex*-PCR pode ser utilizado com *SYBR Green* quando os produtos amplificados tem temperaturas de melting (*T_m*) distintas, e também com sondas com leitura em comprimentos de onda diferentes (Mackay *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2008).

O diagnóstico específico da dengue pode ser também realizado pela detecção de um antígeno viral, como por exemplo, da proteína NS1 para a qual vários *kits* já foram desenvolvidos. A proteína NS1 é expressa na superfície das células infectadas e secretada para a circulação sanguínea durante a fase aguda da infecção, podendo ser detectada em amostras de soro do primeiro ao nono dia após a instalação da febre (Young *et al.*, 2000), entretanto, a sensibilidade e especificidade depende do sorotipo viral (Felix *et al.*, 2012).

Um estudo feito na Índia e no Colorado mostrou que as amostras de soro são mais sensíveis ao diagnóstico por RT-PCR no primeiro estágio da doença (2-5 dias) quando os anticorpos ainda não são detectáveis, e no estágio mais avançado da doença o teste de detecção de IgM por ELISA é o mais sensível (Reddy *et al.*, 2012).

1.8. Aumento da sensibilidade dos métodos de detecção genômica

Muitas vezes a falta de detecção de vírus em amostras clínicas se deve à carga viral estar abaixo do limite de detecção do ensaio ou a algum tipo de interferência presente na amostra. Sendo assim, é de grande importância a utilização de métodos que auxiliem na otimização do diagnóstico.

Uma alternativa para aumentar a eficiência de purificação das partículas virais em amostras clínicas é a utilização da tecnologia da Apolipoproteína H (ApoH). Esta proteína, isolada em 1961 por H. E. Schultze que a chamou de beta 2-glicoproteína I (B2GP1), é uma proteína de massa molecular de 50 kDa, presente no soro humano numa concentração de 0,2 mg/mL, exibindo 6,2% e 8,3% de cisteína e prolina, respectivamente e que ainda não tem sua função *in vivo* completamente estabelecida. Esta proteína pleiotrópica da fase aguda da imunidade inata tem a propriedade de capturar microrganismos prejudiciais (com afinidade relativamente alta, de 10 e 100 nM), incluindo vírus (Stefas *et al.*, 1997; Stefas *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2009; Apohtech, 2019). Por outro lado, ApoH não captura microrganismos não patogênicos como bactérias comensais ou certos vírus inativados. ApoH interage com antígenos prejudiciais não próprios por meio de várias vias, incluindo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e fosfolípidios aniônicos.

A empresa “ApoH-Technologies” com sede na Universidade de Montpellier, França, tem desenvolvido suportes sólidos cobertos com PEPS6, a ApoH totalmente sintética, tais como nanoesferas magnéticas de aproximadamente 200 nm de diâmetro, para captura e concentração eficiente de diferentes microrganismos, eliminando qualquer ação de potenciais fatores de inibição ou degradação para as subseqüentes etapas de detecção de patógenos. O tratamento com ApoH pode ser aplicado a um grande espectro de amostras biológicas como soro, plasma, fluido cérebro-espinhal, saliva, fezes, urina e tecidos, permitindo a purificação e subseqüente detecção do agente biológico, utilizando qualquer método de detecção. Esta etapa de purificação com a tecnologia de ApoH tem a capacidade de aumentar significativamente a sensibilidade e especificidade de todos os métodos de detecção. Assim, a tecnologia da ApoH pode ser uma ferramenta importante para tornar os métodos de diagnósticos mais sensíveis, incluindo o isolamento viral, já que o mesmo não induz degradação da partícula viral.

1.9. Justificativa

Considerando a circulação simultânea de CHIKV, DENV e ZIKV e a ameaça iminente à saúde pública no Brasil, além da dificuldade do diagnóstico clínico diferencial, é de grande importância o desenvolvimento de métodos de diagnóstico específicos para essas infecções virais. O diagnóstico precoce das doenças causadas por esses vírus é de suma importância para implementação rápida de tratamento do paciente e de medidas preventivas para evitar as epidemias. A RT-PCR em tempo real vem se tornando o método padrão para diagnóstico precoce dessas infecções virais por reduzir a manipulação e consequentemente a contaminação do ensaio. Apesar de já existirem métodos de diagnóstico por RT-PCR em tempo real disponíveis comercialmente para CHIKV, DENV e ZIKV, os mesmos não fazem a diferenciação do sorotipo dos DENV concomitantemente aos testes de ZIKV e CHIKV.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver métodos de RT-PCR em tempo real para diagnóstico precoce de chikungunya, dengue e Zika.

2.2 Específicos

- a) Desenvolver métodos de RT-PCR em tempo real em uma única etapa utilizando *primers* e sondas específicos para ZIKV, CHIKV e cada um dos quatro tipos do DENV.
- b) Avaliar o limite de detecção da RT-PCR em tempo real.
- c) Avaliar a reação cruzada da RT-PCR em tempo real para detecção dos CHIKV, DENV e ZIKV analisando outros *Flavivirus* e *Alphavirus*.
- d) Avaliar os métodos de RT-PCR em tempo real utilizando amostras de saliva, urina e soro de pacientes com doença febril ou exantemática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O estudo foi realizado em Ribeirão Preto, localizada a 313 Km a nordeste da capital do estado de São Paulo, em uma região quase totalmente desmatada por um processo iniciado na década de 1870 para a cafeicultura e que se agravou após 1929 com a agroindústria canavieira. Observa-se, em consequência disto, diferentes formas de organização do espaço geográfico com matas residuais e canaviais que entremeiam as cidades da região (Prefeitura Municipal De Ribeirão Preto, 2018). Em 06 de Julho de 2016 foi criada a Região Metropolitana de Ribeirão Preto que é composta por 34 municípios, no entanto, seus limites são com os municípios de Jardinópolis ao norte, Guataporã ao sul, Serrana ao leste, Dumont a oeste, Brodowski a nordeste, Sertãozinho a noroeste e Cravinhos a sudeste (Governo Do Estado De São Paulo, 2018) (Figura 8).

Figura 8 – Mapa do local de estudo. Região metropolitana e limites da cidade de Ribeirão Preto.

Fonte: Governo do Estado de São Paulo (Governo Do Estado De São Paulo, 2018)

Ribeirão Preto tem área de unidade territorial de 650,916 Km², é o sétimo município mais populoso do estado, exceto a capital, com população estimada de 694.534 habitantes (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística 2018). A cidade possui clima tropical com verão chuvoso (temperatura média de 30°C) e inverno seco (temperatura média de 19°C). Está a 518 metros de altitude e tem precipitação pluviométrica média de 1.426,80 mm/ano com média anual de umidade relativa do ar de 71%. O município está dividido em cinco distritos de saúde: Norte, Sul, Leste, Oeste e Central (Prefeitura Municipal De Ribeirão Preto, 2018).

3.2 População de estudo e coleta de amostra clínica

Após ser firmada a parceria entre a Universidade de São Paulo (USP) e a Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto (SMSRP), foram recrutados participantes com doenças febris ou exantemáticas na Unidade de Saúde da Família (USF) “César Augusto Arita” - Paulo Gomes Romeo e na Unidade Básica Distrital de Saúde (UBDS) “Marco Antônio Sahão” - Vila Virgínia, pertencentes ao distrito oeste da cidade, no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e no Centro de Pesquisas em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) (Figura 9).

Figura 9 – Mapa de localização dos centros de recrutamento.

Fonte: Figura adaptada de Google Maps (Brasil, 2018)

Os indivíduos com sintomatologia compatível com as doenças febris a serem estudadas no projeto de pesquisa, que procuravam por atendimento médico nos postos de saúde ou por orientação nos laboratórios acima citados, foram convidados a participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice C) e tiveram amostras de sangue e saliva coletadas. A amostra de saliva foi coletada diretamente da boca por expulsão provocada pelo próprio participante em tubos plásticos com capacidade para 50 mL, estéreis e com tampa. Duas amostras de sangue foram coletadas por punção venosa do braço do indivíduo; uma em tubo tratado com anticoagulante e a outra em tubo tratado com ativador de coágulo, ambas seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso (Andriolo *et al.*, 2010).

Os dados demográficos e clínicos de todos os participantes foram registrados em planilha no ato da coleta das amostras e foi solicitado um meio de comunicação para tornar possível o agendamento da coleta das amostras da fase de convalescença (entre 7 e 15 dias após a primeira coleta de amostras), seguindo os mesmos parâmetros das coletas de fase aguda acima citados.

Aos casos de participantes que não possuíam 18 anos completos no momento da entrevista foi solicitado seu assentimento (Apêndice A) e, complementarmente, solicitada autorização dos responsáveis legais através de assinatura do TCLE do responsável (Apêndice B). Participantes sem sintomatologia clínica (sadios) foram incluídos como grupo controle e recrutados nos mesmos locais seguindo as mesmas condições daqueles que possuíam sintomas, inclusive, com TCLE próprio para esta categoria (Apêndice D).

A todos os participantes incluídos no estudo foi solicitado a autorização para armazenamento das amostras coletadas no Biorrepositório “Banco de amostras de arbovírus” (FCFRP N° 006) do Laboratório de Virologia da FCFRP-USP (Apêndice E).

As amostras clínicas foram acondicionadas em recipientes refrigerados com gelo e imediatamente encaminhados ao Laboratório de Virologia da FCFRP-USP.

As amostras de sangue e saliva foram centrifugadas a 1000g para obtenção de soro e sobrenadante da saliva, respectivamente, as quais foram armazenadas a -80°C até seu uso. Amostras de soro e saliva de pacientes com suspeita de dengue, disponíveis no Biorrepositório “Banco de amostras de arbovírus” (FCFRP N° 006) do Laboratório de Virologia da FCFRP-USP também foram incluídas no estudo.

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP e aprovado conforme o parecer consubstanciado número 1.845.548 em 01 de dezembro de 2016 (ANEXO B) e parecer de emenda 3.007.788 em 08 de novembro de 2018 (ANEXO C).

Os critérios de inclusão adotados para os participantes sintomáticos foram: ter mais de um ano de idade no ato da entrevista e estar apresentando sintomas (tais como febre, hiperemia conjuntival, exantema maculopapular, artralgia, edema das extremidades, dor de cabeça, dor retro-orbital, vertigem e/ou mialgia) por não mais que 5 dias.

O critério de inclusão adotado para os participantes sadios foi: não apresentar qualquer dos sintomas listados para os participantes sintomáticos.

Os critérios adotados para exclusão dos participantes foram: apresentar infecção bacteriana aparente (tais como amigdalite, otite, faringite e infecção urinária) ou declarar-se soropositivo para HIV ou possuir algum tipo de imunossupressão.

3.3 Organograma de estudo

Figura 10 – **Organograma do Projeto.** Fluxo de coleta de dados e análise de resultados referentes à pesquisa.

3.4 Seleção e desenho das sondas e primers

Os primers e sondas para CHIKV, DENV e ZIKV foram desenhados com base em sequências representativas do CHIKV, do ZIKV e dos quatro sorotipos virais do DENV. Estas sequências obtidas do GenBank, foram alinhadas com diversas sequências representativas do mesmo tipo viral ($n > 10$) utilizando o software *CLC Main Workbench 8.0.1* (QIAGEN Aarhus A/S - EUA). As sequências candidatas de sondas foram manualmente selecionadas em uma região altamente conservada previamente definida para os primers de DENV (Dos Santos *et al.*, 2008), os quais foram utilizados sem alterações neste trabalho. Tomando a região do genoma do DENV como base, foram selecionadas as regiões a serem amplificadas no genoma

do flavivírus ZIKV e do alfavírus CHIKV, e assim, designadas as sequências para o par de *primers* e ambas sondas específicas para estes tipos virais.

Estas sequências foram analisadas no *CLC Main Workbench 8.0.1* segundo os seguintes critérios ideais: a T_m do *primer* e da sonda que deve ter valor próximo a 60°C para melhor performance durante o anelamento com a sequência-alvo; o valor determinado para *self-annealing* e *self end-annealing* deve ser baixo, ou seja, aproximadamente 35 para o primeiro e < 15 para o segundo; o conteúdo de GC da sequência deve ser $\geq 40\%$ e o valor para dobramento em estrutura secundária deve ser o mais baixo possível com valores abaixo de 10.

As sequências que apresentaram as melhores características foram avaliadas quanto a sua identidade utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) [National Center for Biotechnology Information (NCBI), EUA] e aquelas com identidades $\geq 95\%$ com o vírus em questão e $\leq 80\%$ com sequências díspares ao vírus alvo foram selecionadas. A empresa *Life Technologies by ThermoFisher Scientific* (EUA) foi responsável por sintetizar os *primers* e sondas selecionados.

3.5 Purificação de amostras e extração de RNA viral

As amostras de saliva foram centrifugadas, logo após a coleta, a 2000 rpm por 5 minutos e em seguida fracionadas em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL. As amostras de sangue total foram homogeneizadas e em seguida fracionadas em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL. Após completa coagulação nos tubos contendo sangue em presença de ativadores de coágulo, os tubos coletores foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos e em seguida o soro foi fracionados em tubos plásticos com capacidade de 1,5 mL.

O RNA viral foi extraído a partir de 50-200 μ L de amostra de sangue total, soro, saliva, urina ou sobrenadante de cultura celular infectada (estoque viral após cultivo) utilizando os *kits* *PureLink Viral RNA/DNA* (Invitrogen, EUA), *PureLink Total RNA Blood Purification* (Invitrogen, EUA) e *QIAamp Viral RNA* (QIAGEN) seguindo os protocolos recomendados pelos fabricantes. Para os volumes inferiores a 200 μ L, como descrito no item 4.7, houve necessidade de ajuste para que o volume a ser purificado estivesse adequado ao protocolo do kit, desta forma, foi adicionado solução tampão de fosfato (PBS) 1x em quantidade suficiente para (QSP) atingir o valor estipulado.

As amostras fracionadas e purificadas foram devidamente identificadas e armazenadas no *freezer* -80°C no Laboratório de Virologia da FCFRP-USP.

3.6 Detecção e identificação viral (RT-PCR em tempo real)

O diagnóstico da infecção pelo CHIKV, DENV ou ZIKV foi realizado pela detecção do genoma viral pela técnica de RT-PCR em tempo real. Para tal, *primers* e sondas específicas para estes vírus foram desenhados conforme descrito nos itens 3.4 e 4.2.

A RT-PCR em tempo real foi realizada com os *kits SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit* (Invitrogen, EUA) e *SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit* (Invitrogen, EUA). Protocolos de amplificação com diversas temperaturas, concentrações de sondas e íons magnésio (Mg^{+2}) foram avaliados para otimização do ensaio.

As RT-PCRs executadas neste trabalho tinham 25 μ L como volume final de reação nos 4 protocolos padronizados (item 4.4). A etapa 1 consiste de duas reações concomitantes, o *screening* para DENV e a reação de detecção de ZIKV e CHIKV (Tabela 1). A etapa 2, onde faz-se a detecção do sorotipo viral somente é executada nos casos onde os resultados do *screening* são positivos (Tabela 2).

Tabela 1 – **Etapa 1 da detecção:** Reação para *Screening* para DENV e reação para detecção de ZIKV e CHIKV

Reação para <i>Screening</i> para DENV		
Item	Volume utilizado	Concentração na reação
RNC5_S (<i>primer forward</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
RNC5_C (<i>primer reverse</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
Enzima (<i>SuperScript III</i>)	0,5 μ L	-
Master mix com <i>SYBR Green</i>	12,5 μ L	-
ROX (<i>reference Dye</i>)	0,5 μ L	-
Amostra	9,5 μ L	-
Reação para detecção de ZIKV e CHIKV		
Item	Volume utilizado	Concentração na reação
ZIKV_S (<i>primer forward</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
ZIKV_C (<i>primer reverse</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
Sonda de ZIKV	1,0 μ L	250 nM
CHIKV_S (<i>primer forward</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
CHIKV_C (<i>primer reverse</i>)	1,0 μ L	0,6 μ M
Sonda de CHIKV	1,0 μ L	250 nM
Enzima (<i>SuperScript III</i>)	0,5 μ L	-
Master mix com ROX	12,5 μ L	-
Amostra	6,0 μ L	-

Tabela 2 – Etapa 2 da detecção: Reações de detecção do sorotipo de DENV

Reação para detecção do sorotipo de DENV-1 e DENV-2		
Item	Volume utilizado	Concentração na reação
RNC5_S (<i>primer forward</i>)	1,0 µL	0,6 µM
RNC5_C (<i>primer reverse</i>)	1,0 µL	0,6 µM
Sonda de DENV-1	1,0 µL	250 nM
Sonda de DENV-2	1,0 µL	250 nM
Enzima (<i>SuperScript III</i>)	0,5 µL	-
Master mix com ROX	12,5 µL	-
Amostra	8,0 µL	-
Reação para detecção do sorotipo de DENV-3 e DENV-4		
Item	Volume utilizado	Concentração na reação
RNC5_S (<i>primer forward</i>)	1,0 µL	0,6 µM
RNC5_C (<i>primer reverse</i>)	1,0 µL	0,6 µM
Sonda de DENV-3	1,0 µL	250 nM
Sonda de DENV-4	1,0 µL	250 nM
Enzima (<i>SuperScript III</i>)	0,5 µL	-
Master mix com ROX	12,5 µL	-
Amostra	8,0 µL	-

Para a realização dos testes, o aparelho *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante e configurado segundo a Tabela 3.

Tabela 3 – Protocolo de amplificação

Configuração utilizada para amplificação no <i>StepOnePlus Real-Time PCR System</i>			
Modo da corrida	Standard	Fluorescência das sondas para DENV-1 e DENV-4	NED
Volume final de reação	25,0 µL	Fluorescência das sondas para DENV-2 e CHIKV	FAM
		Fluorescência das sondas para DENV-3 e ZIKV	VIC
		Fluorescência das reações com <i>SYBR Green</i>	SYBR
Etapa de Amplificação	Temperatura	Tempo	Quantidade de ciclos
Transcrição reversa	50°C	20 minutos	1
Inativação da transcriptase reversa	95°C	5 minutos	1
Abertura da dupla fita de DNA	95°C	15 segundos	45
Anelamento	60°C	40 segundos	45
Extensão	72°C	30 segundos	45
Início da curva de Melting	95°C	15 segundos	1
Desenvolvimento da curva de Melting	60-95°C	variável	1

3.7 Eletroforese

A eletroforese em gel a 1,8% agarose foi utilizada para confirmação da detecção do genoma viral pela técnica de RT-PCR em tempo real.

Nestas eletroforeses foi utilizado o corante *SybrSafe DNA gel stain 10000x concentrate in DMSO* (Invitrogen, USA), como referência o marcador *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, USA) e as corridas foram executadas a 100V por aproximadamente 40 minutos.

3.8 Determinação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivos e negativos da RT-PCR para dengue

A sensibilidade do método refere-se à capacidade deste método de identificar corretamente os verdadeiros positivos quando comparado ao padrão ouro do ensaio, já a especificidade refere-se à capacidade deste método de não identificar como positivos aquelas amostras que são sabidamente negativas.

O valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de um resultado positivo para o ensaio em questão estar coerente com a condição de saúde do indivíduo doador da amostra, assim como, o valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade de um resultado negativo para o ensaio em questão condizer com a ausência de infecção do indivíduo doador da amostra (Kawamura, 2002).

Os cálculos foram executados conforme as fórmulas abaixo:

		Verdade		
		+	-	Total
Teste	+	A	b	(a+b)
	-	C	d	(c+d)
Total		(a+c)	(b+d)	n

$$\text{Sensibilidade} = a/(a+c) \times 100$$

$$\text{Especificidade} = d/(b+d) \times 100$$

$$\text{VPP} = a/(a+b) \times 100$$

$$\text{VPN} = d/(c+d) \times 100$$

3.9 Aumento da sensibilidade através de ApoH

Os testes com a tecnologia ApoH foram realizados com o *kit ApoH-CaptoVIR* (ApoH Technologies, França) segundo protocolo recomendado pelo fabricante (Figura 11).

Figura 11 – Representação esquemática do processo de purificação de amostras a partir da tecnologia ApoH

Fonte: Figura adaptada de (Apohtech, 2019).

3.10 Vírus

A Tabela 4 mostra os vírus utilizados neste trabalho pertencentes ao banco de vírus do Centro de Pesquisas em Virologia da FMRP-USP.

Tabela 4 – Vírus utilizados neste estudo.

Gênero	Vírus	Cepa	Gênero	Vírus	Cepa
<i>Flavivirus</i>	DENV-1	Mochizuki	<i>Alphavirus</i>	CHIKV	S27 –African strain
	DENV-2	NGC		EEEV	Spain 1472 An14723
	DENV-3	H87		MAYV	BeAn243
	DENV-4	H241		MUCV	BeAn8
	ROCV	18200LD50		WEEV	Rio 1257
	SLEV	B1H			
	WNV	NY99-4132			
	YFV	17D			
	ZIKV	Isolado de paciente			

4 RESULTADOS

4.1 Recrutamento de participantes e coleta de amostras clínicas

O recrutamento de participantes foi realizado de forma aleatória desde fevereiro de 2017 até fevereiro de 2019 nos quatro centros de coleta já descritos no item 3.2 e, neste período, foi possível coletar amostras clínicas (sangue total, soro e saliva) de 18 participantes com doenças febris ou exantemáticas e outros 10 participantes saudáveis.

Tabela 5 – Indivíduos com doenças febris ou exantemáticas recrutados.

Identificação	Data da coleta	Sexo	Idade (anos)	Dias de sintomas
LV01	10/02/2017	Feminino	25	2
LV02	13/02/2017	Masculino	69	3
PGR01	29/03/2017	Feminino	53	3
LV03	04/04/2017	Feminino	32	2
LV04	07/04/2017	Feminino	53	4
PGR02	26/04/2017	Masculino	25	2
PGR03	27/03/2018	Masculino	19	2
PGR04	04/04/2018	Masculino	32	3
PGR05	16/04/2018	Feminino	30	4
VV01	27/04/2018	Feminino	30	4
VV02	27/04/2018	Masculino	21	2
VV03	02/05/2018	Feminino	24	2
PGR06	07/05/2018	Feminino	19	3
LV05	14/07/2018	Feminino	12	9
LV09	04/02/2019	Masculino	54	2
LV10	14/02/2019	Masculino	30	5
LV11	15/02/2019	Feminino	28	3
LV12	19/02/2019	Masculino	27	7

Tabela 6 – Manifestações clínicas apresentadas pelos participantes recrutados.

Tipo de manifestação clínica	Número de participantes	%
Febre	15	83,33
Cefaleia	12	66,67
Dor articular	11	61,11
Disfagia	9	50,00
Dor retro-orbital	9	50,00

Tipo de manifestação clínica	Número de participantes	%
Fraqueza nos membros superiores	8	44,44
Mialgia	8	44,44
Náuseas	7	38,89
Prurido	7	38,89
Sonolência	7	38,89
Fraqueza nos membros inferiores	6	33,33
Diarreia	6	33,33
Exantemas	5	27,78
Vômito	5	27,78
Petéquias	4	22,22
Dor de garganta	4	22,22
Tosse	4	22,22
Hiperemia conjuntival	4	22,22
Dor abdominal	3	16,67
Hiperreflexia / arreflexia	2	11,11
Visão turva	2	11,11
Tremores	1	5,55
Diplopia	1	5,55

Tabela 7 – Participantes assintomáticos recrutados

Identificação	Data da coleta	Sexo	Idade (anos)
PGR07	11/12/2018	Feminino	45
PGR08	11/12/2018	Feminino	31
PGR09	11/12/2018	Feminino	34
PGR10	11/12/2018	Feminino	31
PGR11	11/12/2018	Feminino	50
PGR12	11/12/2018	Feminino	29
PGR13	11/12/2018	Feminino	52
LV06	11/12/2018	Masculino	44
LV07	11/12/2018	Masculino	25
LV08	11/12/2018	Feminino	39

Amostras clínicas (soro, saliva ou urina) disponíveis no biorrepositório do Laboratório de Virologia da FCFRP-USP foram incluídas no estudo, sendo elas pertencentes a pacientes que tiveram isolamento viral confirmado (n=39) (Tabela 8).

Tabela 8 – Amostras selecionadas no biorrepositório “Banco de amostras de arbovírus” (FCFRP nº06)

Identificação	Data da Coleta	Sexo	Idade (anos)	Material coletado			Sorotipo
				Sangue	Saliva	Urina	
1	16/03/2010	Masculino	22	Sim	Sim	Sim	DENV-3
2	11/03/2010	Feminino	20	Sim	Não	Não	DENV-2
4	30/03/2010	Feminino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-2
5	30/03/2010	Feminino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-3
6	29/07/2010	Masculino	4	Sim	Não	Não	DENV-3
7	07/04/2010	Feminino	27	Sim	Não	Não	DENV-1
8	13/04/2010	Masculino	NI	Sim	Sim	Sim	DENV-1
10	06/05/2010	Feminino	13	Sim	Sim	Sim	DENV-2
15	27/04/2010	Masculino	15	Sim	Sim	Não	DENV-1
16	29/04/2010	Masculino	5	Sim	Não	Não	DENV-3
19	02/05/2010	Masculino	NI	Sim	Sim	Sim	DENV-2
20	05/05/2010	Feminino	17	Sim	Sim	Sim	DENV-3
22	06/05/2010	Feminino	13	Sim	Sim	Sim	DENV-3
28	14/05/2010	Masculino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-1
29	14/05/2010	Feminino	13	Sim	Sim	Sim	DENV-3
31	18/05/2010	Feminino	4	Sim	Sim	Não	DENV-3
36	03/02/2011	Feminino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-1
42	11/02/2011	Feminino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-1
43	11/02/2011	Feminino	14	Sim	Sim	Sim	DENV-1
45	22/02/2011	Feminino	13	Sim	Sim	Sim	DENV-1
46	26/02/2011	Masculino	14	Sim	Sim	Sim	DENV-1
47	26/02/2011	Masculino	11	Sim	Sim	Sim	DENV-1
50	01/03/2011	Feminino	5	Sim	Sim	Sim	DENV-1
51	01/03/2011	Feminino	10	Não	Sim	Não	DENV-1
52	01/03/2011	Masculino	10	Sim	Sim	Sim	DENV-1
54	17/03/2011	Feminino	14	Não	Não	Sim	DENV-1
58	21/03/2011	Masculino	7	Não	Não	Sim	DENV-1
59	25/03/2011	Feminino	12	Não	Não	Sim	DENV-2
60	28/03/2011	Feminino	11	Não	Não	Sim	DENV-1
63	04/04/2011	Feminino	7	Não	Não	Sim	DENV-1
64	05/04/2011	Masculino	7	Não	Sim	Sim	DENV-1
65	12/04/2010	Masculino	NI	Sim	Sim	Sim	DENV-1
66	14/04/2010	Feminino	NI	Não	Sim	Sim	DENV-1
69	15/04/2011	Feminino	13	Não	Sim	Sim	DENV-1
70	18/04/2011	Masculino	14	Não	Não	Sim	DENV-1
71	18/04/2011	Masculino	12	Não	Não	Sim	DENV-1
72	19/04/2011	Masculino	9	Não	Não	Sim	DENV-1
73	18/04/2011	Masculino	10	Não	Não	Sim	DENV-3
78	01/06/2011	Feminino	NI	Não	Não	Sim	DENV-2

Fonte: (Poloni *et al.*, 2010; Soares, 2014)

NI: Não informado

4.2 Desenho de *primers* e sondas

Pelo menos 10 sequências representativas de cada vírus foram alinhadas utilizando o software *CLC Main Workbench 8.0.1*, como mostrado na Figura 12, para seleção de *primers* e sondas para os vírus de interesse.

Figura 12 – Exemplo de alinhamento das sequências genômicas de DENV-2 para seleção de *primers* e sondas.

Um par de *primers* para amplificação de uma região 150 pares de bases (pb) da extremidade 5' do genoma dos quatro sorotipos do DENV, previamente selecionado (Aquino *et al.*, 2006), foi utilizado neste estudo (Figura 13). Sondas específicas para os quatro sorotipos de DENV foram selecionadas na região compreendida entre esses *primers*.

Figura 13 – Representação do genoma dos DENV com destaque à região genômica selecionada para anelamento dos *primers* e sondas destes tipos virais.

Tendo como referência a estratégia utilizada para o DENV, foram selecionadas as regiões para os *primers* e sondas para o ZIKV e CHIKV. A mesma região genômica, ou seja, a extremidade 5', foi selecionada no genoma do ZIKV resultando numa sequência de 185 pb (Figura 14), e no genoma do CHIKV resultando numa sequência de 170 pb (Figura 15).

Figura 14 – Representação do genoma do ZIKV com destaque à região genômica selecionada para anelamento dos *primers* e sondas deste tipo viral.

Figura 15 – Representação do genoma do CHIKV com destaque à região genômica selecionada para anelamento dos *primers* e sondas deste tipo viral.

Diversas sequências de *primers* e sondas sugeridas pelo programa *CLC Main Workbench* foram analisadas com o programa BLAST para verificação de identidade. As sequências selecionadas foram aquelas com identidade $\geq 95\%$ com o vírus alvo e $\leq 80\%$ com sequências de outras espécies. A Tabela 9 mostra as sequências de *primers* e sondas selecionadas para o CHIKV, DENV e ZIKV.

Tabela 9 – Características das sondas e *primers* selecionados.

Nome	Sequência	Temperatura de Melting	Fluoróforo	Posição no genoma	Cepa de referência
RNC5_S	AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA	62,01	NA	1-23	M93130
RNC5_C	CGCGTTTCAGCATATTGAAAG	57,81	NA	129-149	M93130
CHIKV_S	GGATCCTGTGTACGTGGACATC	61,58	NA	51-72	MG049915
CHIKV_C	CGGGGTCAATTCCTGCTCT	61,52	NA	201-220	MG049915
ZIKV_S	AGTTGTTGATCTGTGTGAGTCAGAC	61,63	NA	1-25	MG758786
ZIKV_C	GGGGTTTACACGGGCTACTCCGCGT	71,07	NA	160-184	MG758786
Sonda DENV-1	CAACCAACGGAAAAAGACGGGTCGACCGTC	71,05	NED	100-129	KC692517
Sonda DENV-2	CTTTGAGGGAGCTAAGCTCAACGTAGTTCT	66,23	FAM	36-65	JX073928
Sonda DENV-3	CAACCAACGGGAAGAAGACGGGAAAACCGTC	69,50	VIC	100-129	EF643017
Sonda DENV-4	AAGCAAGCTTCCGATTGGAAGTGTCCGTG	69,39	NED	27-53	NC002640
Sonda ZIKV	GGATTTGGAACGAGAGTTTCTGGTCA	63,88	VIC	81-107	MG758786
Sonda CHIKV	CGGTGTGACCTGCCTTGGTTCCACCTCAA	71,96	FAM	122-150	MG049915

4.3 Análise inicial do funcionamento dos *primers* e sondas selecionados

Uma análise inicial foi realizada para avaliar o funcionamento dos *primers* e sondas desenhados. Para tal, uma RT-PCR em tempo real foi realizada mostrando amplificações de CHIKV, ZIKV e os DENV-1 a -4 (*Threshold cycles* (Cts) = 20, 26, 27, 24, 33 e 23, respectivamente) (Figura 16).

Figura 16 – Análise do funcionamento dos *primers* e sondas: RT-PCR em tempo real com sondas mostrando amplificações de DENV-1 e -4 (A); DENV-2 e CHIKV (B); e DENV-3 e ZIKV

Para confirmar que os produtos de amplificação detectados correspondem aos vírus em questão, uma eletroforese em gel de agarose foi realizada, mostrando produtos de amplificação de tamanhos esperados para cada um dos vírus: 150 pb para os quatro sorotipos de DENV, 185 pb para ZIKV e 170 pb para CHIKV (Figura 17).

Figura 17 – **Análise do tamanho dos amplicons das RT-PCRs.** Eletroforese em gel de agarose 1,8% dos produtos das RT-PCRs em tempo real do ZIKV, do CHIKV e dos quatro sorotipos do DENV. A coluna 6 mostra o marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

4.4 Padronização das RT-PCRs em tempo real

Diversos protocolos foram analisados modificando as temperaturas de anelamento, concentração de sondas e Mg^{+2} para obtenção das melhores condições de detecção e amplificação dos diferentes vírus em estudo.

4.4.1 Gradiente de temperatura

Inicialmente, um gradiente de temperatura foi realizado para selecionar a melhor condição de temperatura na fase de anelamento dos *primers* e sondas na RT-PCR em tempo real para o CHIKV, o ZIKV, e os quatro sorotipos de DENV, garantindo assim alta especificidade e sensibilidade na reação. A Figura 18 é um gráfico representativo do conjunto completo de Cts obtidos em todas as temperaturas de anelamento testadas para os seis vírus. Os Cts mais baixos encontrados foram: DENV-1 = 25,60; DENV-2 = 23,57; DENV-3 = 30,94; DENV-4 = 23,98; ZIKV = 26,97 e CHIKV = 20,86.

Figura 18 – **Gradiente de temperatura.** Os vírus DENV-1 a -4, ZIKV e CHIKV foram submetidos à RT-PCR em tempo real utilizando diferentes temperaturas de anelamento.

A variação de Ct observada para os diferentes vírus foi de dois a três ciclos, portanto, foi selecionada a temperatura de 60°C como ideal, considerando-se que: não houve unanimidade em nenhuma das temperaturas; que os Cts obtidos a 60°C variam em média 1 Ct dos menores valores obtidos em todos os vírus; e que 60°C é a maior temperatura onde essa variação é mínima permitindo, assim, uma maior especificidade da RT-PCR.

4.4.2 Gradiente de concentração de sonda

Outra variável analisada foi a concentração das sondas na reação de RT-PCR em tempo real. Nestes ensaios foram testadas as concentrações de 150, 200, 250 e 300 nM de sondas para DENV-2, DENV-4, ZIKV e CHIKV, e os Cts podem ser conferidos na Tabela 10.

Os Cts obtidos em todas as concentrações foram muito similares, não ultrapassando 1 Ct de variação em 93,75% dos casos. A concentração de 250 nM foi selecionada para os testes posteriores.

Tabela 10 – Cts obtidos no gradiente de concentração de sondas para quatro vírus

Sonda	Concentração da sonda na reação final			
	150 nM	200 nM	250 nM	300 nM
DENV-2	23,95	23,45	23,38	22,52
DENV-4	32,97	32,57	32,74	32,47
ZIKV	35,09	35,51	35,61	35,67
CHIKV	23,59	23,24	23,18	23,10

4.4.3 Gradiente de concentração de magnésio

A concentração de Mg^{+2} também é um fator importante a ser avaliado no protocolo de amplificação. Uma RT-PCR em tempo real foi realizada para os vírus DENV-4, DENV-2, ZIKV e CHIKV contendo Mg^{+2} em concentrações de 3, 4, 5 e 6 mM na mistura final de reação e os Cts obtidos podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 – Cts obtidos na RT-PCR em tempo real analisando um gradiente de concentração de Mg^{+2} .

Vírus	Concentração de Mg^{+2}			
	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM
DENV-4	23,03	22,23	22,03	23,59
DENV-2	23,04	22,72	22,36	22,29
DENV-2	22,89	22,01	21,84	21,92
ZIKV	34,34	35,05	35,51	35,95
CHIKV	23,96	23,52	23,39	22,99

Observou-se apenas pequenas variações nos Cts obtidos, os quais foram de aproximadamente 1 Ct de diferença, portanto, foi selecionada a concentração de 3 mM de Mg^{+2} , recomendada pelo fabricante do kit de RT-PCR em tempo real.

4.4.4 Condições ideais do protocolo de RT-PCR em tempo real

A partir dos ensaios realizados para padronização da RT-PCR em tempo real, as condições ideais de amplificação e detecção dos diferentes vírus estudados foram as seguintes:

- mistura de reação: de 0,6 μ M de cada *primer*, 250 nM de sondas, 3 mM de Mg^{+2} e 6 a 8 μ L de RNA em 25 μ L de volume final de reação;
- protocolo de amplificação: 50°C por 20 minutos para a transcriptase reversa agir transformando a fita simples de RNA em fita simples de DNA complementar, 95°C por 5 minutos para desnaturação total da transcriptase reversa seguida de 45 ciclos consecutivos de 95°C por 15 segundos para abertura das fitas duplas, 60°C por 40 segundos para anelamento dos *primers* e sondas e 72°C por 30 segundos para ação da DNA polimerase que posicionará os novos nucleotídeos que formarão a fita complementar.

4.5 Tratamento de amostras de soro com ApoH

Para tentar aumentar a sensibilidade da RT-PCR em tempo real, amostras de soro foram tratadas com ApoH a fim de eliminar os possíveis agentes inibidores contidos nestas amostras. Quatro amostras sabidamente positivas para dengue obtidas do biorrepositório foram tratadas, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do *kit ApoH-CaptoVIR*. O RNA viral foi purificado a partir das amostras tratadas e, comparativamente, a partir das mesmas amostras sem o tratamento. O RNA viral foi submetido à RT-PCR em tempo real com *SYBR Green*. Os resultados da RT-PCR foram similares independentemente do tratamento ou não com ApoH (Tabela 12), portanto, esta etapa foi eliminada para simplificar o método de detecção.

Tabela 12 – Cts obtidos com amostras tratadas e não tratadas com o ApoH.

Amostra	1	2	3	4
	Ct	Ct	Ct	Ct
Com ApoH	35,97	38,60	N	28,34
Sem ApoH	36,14	N	24,98	30,93

N: negativo

4.6 Análise da interferência de RNAs/DNAs celulares das amostras de sangue total na detecção viral

Para analisar a interferência de RNAs/DNAs celulares, amostras de sangue total sabidamente negativa para o vírus da dengue foram misturadas com RNA de DENV-2 nas concentrações de $2,42 \times 10^6$, $2,42 \times 10^5$, $2,42 \times 10^4$ e $2,42 \times 10^3$ cópias/mL. Após a purificação conforme o protocolo do *kit PureLink Total RNA Blood Purification* (Invitrogen, EUA), as alíquotas foram testadas em triplicata por RT-PCR em tempo real com sonda específica. Estes resultados foram comparados com aqueles obtidos a partir de amostras sem RNA/DNA celular contendo as mesmas concentrações de vírus e também analisadas em triplicata (Tabela 13). Sendo os Cts entre as amostras com e sem RNA/DNA muito similares, pode-se concluir que não há interferência dos mesmos na detecção viral durante a RT-PCR em tempo real. Entretanto, decidiu-se pela utilização somente do soro e não do sangue total devido à simplicidade no processamento da amostra e na purificação do RNA viral.

Tabela 13 – Análise da interferência de RNAs/DNAs celulares na detecção viral durante a RT-PCR em tempo real.

Tipo de amostra	Ct relativo à concentração de RNA viral (cópias/mL)			
	2,42x10 ⁶	2,42x10 ⁵	2,42x10 ⁴	2,42x10 ³
Sangue total 1	32,25	35,82	39,71	N
Sangue total 2	32,09	38,28	39,06	N
Sangue total 3	31,95	36,52	39,83	N
Cultura viral em células*	31,02	35,47	36,58	37,58

N: negativo * média de triplicata

4.7 Detecção viral relacionada ao volume de amostra

O volume de amostra a ser utilizado na purificação para os ensaios pode ser fator limitante, pois, pode ocorrer que o volume de amostra coletado não seja suficiente para suprir os diversos ensaios previstos. Desta forma, foram feitos testes para analisar o impacto da redução do volume de amostra no processo de purificação e, consequentemente, no de detecção do genoma viral durante a RT-PCR em tempo real. Para tal, uma amostra de soro sabidamente negativa para dengue foi misturada com o DENV-2 em uma concentração de 4,03x10⁵ cópias/mL. A partir de frações de 200, 50 e 10µL dessa mistura, o RNA foi purificado conforme protocolo do *kit PureLink Viral RNA/DNA* (Invitrogen, EUA).

A Tabela 14 reúne resultados obtidos na RT-PCR em tempo real executada em duplicata com três alíquotas, mostrando que uma redução de até 75% no volume de soro não altera de forma significativa o resultado. Desta forma, foi adotado para os testes subsequentes o volume de 50µL de amostras clínicas para purificação no protocolo de diagnóstico por RT-PCR em tempo real.

Tabela 14 – Análise do impacto da redução do volume de amostra na RT-PCR em tempo real

Volume de amostra	Concentração final	Ct 1	Ct 2	Média dos Cts
200µL	4,03x10 ⁵ cópias/mL	31,07	31,22	31,15
50µL	1,00x10 ⁵ cópias/mL	33,10	32,83	32,97
10µL	2,02x10 ⁴ cópias/mL	35,36	35,50	35,43

4.8 Limite de detecção do método

Um dos pontos mais importantes de um método diagnóstico por PCR é a sua capacidade de detectar valores mínimos do material genético alvo em uma amostra clínica. Para determinação do limite de detecção, foram executados alguns ensaios de RT-PCR em tempo real com sondas específicas utilizando diluições decimais seriadas dos quatro sorotipos de DENV (estoque viral 10^7 cópias/mL), do ZIKV (estoque viral 10^4 PFU/mL) e do CHIKV (estoque viral 10^9 PFU/mL).

O limite de detecção obtido para cada vírus pelo método proposto com sondas se encontra descrito na Tabela 15.

Tabela 15 – Avaliação do limite de detecção do método com sondas. RT-PCRs para CHIKV, ZIKV e os quatro sorotipos de DENV em gradiente de concentração de RNA viral.

Vírus	Concentração (cópias/mL)	Ct (média de triplicata)	Vírus	Concentração (PFU/mL)	Ct (média de triplicata)
DENV-1	$9,90 \times 10^4$	39,94	ZIKV	$1,25 \times 10^0$	36,57
DENV-2	$2,42 \times 10^2$	39,41	CHIKV	$5,25 \times 10^0$	38,00
DENV-3	$6,55 \times 10^6$	39,15			
DENV-4	$3,70 \times 10^4$	39,75			

Para comparação da sensibilidade, os limites de detecção pelo método de RT-PCR em tempo real com *SYBR Green* também foram analisados, conforme descrito na Tabela 16. Estes limites, quando comparados com a RT-PCR em tempo real utilizando sondas, mostraram-se relativamente inferiores para DENV-1, DENV-3 e DENV-4 e similares para DENV-2, ZIKV e CHIKV.

Tabela 16 – Avaliação do limite de detecção do método com *SYBR Green*. RT-PCRs para CHIKV, ZIKV e os quatro sorotipos de DENV, em gradiente de concentração de RNA viral

Vírus	Concentração (cópias/mL)	Ct*	Tm*	Vírus	Concentração (PFU/mL)	Ct*	Tm*
DENV-1	$9,90 \times 10^0$	36,19	80,07	ZIKV	$1,25 \times 10^1$	34,16	80,53
DENV-2	$2,42 \times 10^1$	33,86	79,33	CHIKV	$5,25 \times 10^0$	33,23	83,85
DENV-3	$6,55 \times 10^3$	35,73	79,93				
DENV-4	$3,70 \times 10^1$	33,56	80,18				

* Média de triplicata

4.9 Avaliação da reação cruzada das RT-PCRs

Para avaliar a reação cruzada, as RT-PCRs desenvolvidas para cada vírus foram testadas em triplicata com RNAs dos outros vírus incluídos neste estudo e de outros membros dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* (Tabela 17).

Tabela 17 – Ensaios em triplicata para avaliação de reação cruzada das sondas de CHIKV, ZIKV e para os quatro sorotipos de DENV.

Gênero	Vírus	Sondas					
		DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	ZIKV	CHIKV
<i>Flavivirus</i>	DENV-1	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	DENV-2	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
	DENV-3	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	DENV-4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	ZIKV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
	YFV	Negativo	Negativo	NT	NT	Negativo	NT
	WNV	Negativo	Negativo	NT	NT	Negativo	NT
	SLEV	Negativo	Negativo	NT	NT	Negativo	NT
	ROCV	Negativo	Negativo	NT	NT	Negativo	NT
<i>Alphavirus</i>	CHIKV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
	WEEV	NT	NT	NT	NT	NT	Negativo
	MAYV	NT	NT	NT	NT	NT	Negativo
	MUCV	NT	NT	NT	NT	NT	Negativo
	EEEV	NT	NT	NT	NT	NT	Negativo

NT: Não Testado

As RT-PCRs contendo as sondas de DENV-3 e DENV-4 apresentam reação cruzada com DENV-1, além da sonda de DENV-4 também detectar o DENV-3. Desta forma, fez-se necessário o desenho de novas sondas de DENV-3 e DENV-4.

4.10 Desenho e substituição de sondas para DENV-3 e DENV-4

As novas sondas para o DENV-3 e DENV-4 foram desenhadas seguindo a metodologia explícita nos itens 3.4 e 4.2. Novamente as sequências representativas de ambos os vírus foram alinhadas utilizando o software *CLC Main Workbench 8.0.1* e as características das sondas obtidas pela análise de suas propriedades estão expostas na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados obtidos nas análises de propriedades das novas sondas de DENV-3 e DENV-4 pelo *CLC Main Workbench 8.0.1*.

Nome	Sequência	Temperatura de Melting	Fluoróforo	Posição no genoma	Cepa de referência
Sonda DENV-3	TTTCCCGTCTTCTTCCGTTGGTTGTTCATC	67,35	VIC	94-123	KF973484
Sonda DENV-4	CATTTTCCAGAGATCTGCTCTCTATTCAA	61,77	NED	75-104	KJ596660

4.11 Análise de funcionamento das novas sondas para DENV-3 e DENV-4

Uma análise foi realizada para avaliar o funcionamento das novas sondas desenhadas. Para tal, uma RT-PCR em tempo real foi executada com DENV-3 e DENV-4, na qual comprovou-se o funcionamento das mesmas Figura 19.

Figura 19 – Amplificação de DENV-3 (A) e DENV-4 (B) comprovando o funcionamento das respectivas sondas.

4.12 Limite de detecção das novas sondas DENV-3 e DENV-4

A determinação do limite de detecção para as novas sondas foi executada através de alguns ensaios de RT-PCR em tempo real utilizando diluições decimais seriadas de DENV-3 e DENV-4 a partir da concentração de 10^7 cópias/mL. Os novos limites de detecção obtidos para estes vírus pelo método proposto com sondas se encontra descrito na Tabela 19.

Em comparação com os resultados expostos na Tabela 15, nota-se que o limite de detecção para DENV-3 não sofre alteração, enquanto o limite para a sonda de DENV-4 está 2 logs acima do limite obtido com a sonda DENV-4 anterior.

Tabela 19 – Avaliação do limite de detecção do método para novas sondas DENV-3 e -4. RT-PCRs para DENV-3 e -4, em gradiente de concentração de RNA viral para avaliação do limite de detecção do método com sondas após mudança de sequência.

Vírus	Concentração (cópias/mL)	Ct (média de triplicata)
DENV-3	6,55 x 10 ⁶	40,63
DENV-4	3,70 x 10 ⁶	39,93

4.13 Avaliação da reação cruzada das novas sondas para DENV-3 e DENV-4

Foram executados ensaios de RT-PCR em tempo real em triplicata, desafiando as novas sondas de DENV-3 e DENV-4 com RNAs dos vírus incluídos neste estudo e de outros *Flavivirus* (Tabela 20). A sonda anterior de DENV-3 detectava cruzadamente o DENV-1, enquanto a sonda de DENV-4 detectava o DENV-1 e o DENV-3. A sonda nova de DENV-3 continua detectando o DENV-1, mas a sonda de DENV-4 passou a detectar cruzadamente somente o DENV-2.

Tabela 20 – Avaliação de reação cruzada da RT-PCR utilizando as novas sondas de DENV-3 e DENV-4 .

Vírus	Sondas	
	DENV-3	DENV-4
DENV-1	39,00	ND
DENV-2	ND	37,87
DENV-3	37,40	ND
DENV-4	ND	36,80
ZIKV	ND	ND
CHIKV	ND	ND
YFV	ND	ND
WNV	ND	ND
SLEV	ND	ND
ROCV	ND	ND

4.14 Análise das RT-PCRs utilizando amostras clínicas

Considerando que o limite de detecção da RT-PCR para dengue utilizando *SYBR Green* mostrou-se mais sensível que quando utilizadas as sondas, decidiu-se por analisar primeiramente as amostras clínicas com a RT-PCR contendo *SYBR Green* para identificação dos indivíduos com dengue. Concomitantemente, outro tubo de reação contendo sondas para

identificação de CHIKV e ZIKV foi preparado para identificação desses vírus. Posteriormente, as amostras positivas para dengue foram submetidas a outras duas reações de RT-PCR, uma contendo mistura das sondas de DENV-1/DENV-2 e outra com mistura das sondas de DENV-3/DENV-4 para identificação do sorotipo viral com base nas análises de reação cruzada.

Para as amostras clínicas incluídas neste estudo foi seguido o protocolo em 2 etapas, descrito acima e no item 3.6.

Inicialmente, as amostras de soro e saliva de participantes sadios ($n = 10$) foram analisadas, sendo todas negativas para CHIKV, DENV e ZIKV (Tabela 21).

Posteriormente, amostras clínicas (soro, urina ou saliva) de indivíduos com dengue, com isolamento viral confirmado (Soares, 2014), disponíveis no biorrepositório, foram analisadas, sendo que o DENV foi detectado em 64% do total de amostras ($n = 25/39$), em 81,82% das amostras de soro ($n = 18/22$), em 58,33% das amostras de urina ($n = 7/12$) e em nenhuma das amostras de saliva ($n = 0/5$) (Tabela 22). Apenas uma das amostras clínicas coletadas por indivíduo se encontrava ainda disponível no biorrepositório.

As RT-PCRs em tempo real para determinação do sorotipo viral também foram executadas nas amostras do biorrepositório onde o DENV foi detectado pelo *SYBR Green* (Tabela 23). Foi possível detectar o mesmo sorotipo viral determinado pelo isolamento em 48% dos casos ($n = 12/25$).

Tabela 21 - Resultados dos ensaios com as amostras clínicas (soro e saliva) dos participantes sadios recrutados no estudo.

Identificação	Soro			Saliva		
	DENV	ZIKV	CHIKV	DENV	ZIKV	CHIKV
PGR07	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR08	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR09	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR10	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PGR13	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
LV06	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
LV07	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
LV08	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabela 22 – Resultados dos ensaios para detecção viral com as amostras clínicas (soro, urina ou saliva) do biorrepositório.

Identificação	Tipo de amostra	DENV	ZIKV	CHIKV	Identificação	Tipo de amostra	DENV	ZIKV	CHIKV
1	Saliva	N	N	N	46	Soro	P	N	N
2	Soro	P	N	N	47	Soro	P	N	N
4	Soro	N	N	N	50	Soro	P	N	N
5	Soro	P	N	N	51	Saliva	N	N	N
6	Soro	P	N	N	52	Soro	P	N	N
7	Soro	N	N	N	54	Urina	N	N	N
8	Saliva	N	N	N	58	Urina	P	N	N
10	Soro	N	N	N	59	Urina	P	N	N
15	Soro	P	N	N	60	Urina	N	N	N
16	Soro	P	N	N	63	Urina	P	N	N
19	Saliva	N	N	N	64	Urina	P	N	N
20	Saliva	N	N	N	65	Soro	P	N	N
22	Soro	P	N	N	66	Urina	N	N	N
28	Soro	P	N	N	69	Urina	P	N	N
29	Soro	P	N	N	70	Urina	P	N	N
31	Soro	P	N	N	71	Urina	N	N	N
36	Soro	P	N	N	72	Urina	P	N	N
42	Soro	N	N	N	73	Urina	N	N	N
43	Soro	P	N	N	78	Soro	P	N	N
45	Soro	P	N	N	-	-	-	-	-

N: Negativo P: Positivo

Tabela 23 – Resultados dos ensaios para detecção do sorotipo de DENV nas amostras clínicas (soro, urina ou saliva) do biorrepositório detectadas por RT-PCR com *SYBR Green*.

Sorotipo viral identificado						Sorotipo viral identificado					
Amostra	DENV				Sorotipo no isolamento	Amostra	DENV				Sorotipo no isolamento
	1	2	3	4			1	2	3	4	
2	19,00	22,14	N	32,25	DENV-2	47	33,19	N	N	N	DENV-1
5	N	35,15	N	38,80	DENV-3	50	22,49	N	27,23	N	DENV-1
6	31,89	31,89	N	39,52	DENV-3	52	38,92	N	N	N	DENV-1
15	31,50	35,94	38,88	34,55	DENV-1	58	N	N	N	N	DENV-1
16	N	35,60	N	33,66	DENV-3	59	N	N	37,24	N	DENV-1
22	N	29,87	38,46	33,77	DENV-3	63	N	N	N	N	DENV-2
28	29,22	37,74	35,09	38,20	DENV-1	64	N	N	38,14	N	DENV-1
29	N	36,12	38,65	35,26	DENV-3	65	25,11	22,24	N	30,92	DENV-1
31	28,14	33,83	N	35,00	DENV-3	69	N	31,06	32,71	33,82	DENV-1
36	19,97	N	25,08	39,83	DENV-1	70	N	N	N	N	DENV-1
43	18,79	11,97	23,62	N	DENV-1	72	N	N	N	30,64	DENV-1
45	N	30,32	40,16	31,55	DENV-1	78	NE	NE	NE	NE	DENV-1
46	18,86	N	23,81	N	DENV-1	-	-	-	-	-	-

N: Negativo NE: Não executado

Amostras de soro e saliva de indivíduos com doenças febris ou exantemáticas (n = 18) recrutados neste estudo também foram analisadas com as RT-PCRs para CHIKV, DENV e

ZIKV (Tabela 24). O DENV foi detectado em 5 indivíduos, sendo 1 no ano de 2018 e 4 no ano de 2019. O sorotipo 2 do DENV foi identificado em 4 indivíduos e apenas 1 apresentou o sorotipo 4.

Tabela 24 – Resultados dos ensaios de RT-PCR para CHIKV, DENV e ZIKV com as amostras clínicas (soro e saliva) dos participantes com doenças febris ou exantemáticas recrutados no estudo.

Identificação	Soro			Saliva			Sorotipo
	DENV	ZIKV	CHIKV	DENV	ZIKV	CHIKV	
LV01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
LV02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
LV03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
LV04	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR04	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
VV01	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DENV-2
VV02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
VV03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
PGR06	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
LV05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	NA
LV09	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DENV-2
LV10	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DENV-2
LV11	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DENV-2
LV12	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	DENV-4

NA: Não se aplica

4.14.1 Determinação da sensibilidade, especificidade e dos valores preditivos positivos e negativos da RT-PCR para dengue

Os resultados obtidos com as amostras de soro de indivíduos assintomáticos e das amostras de sangue, saliva e urina do biorrepositório foram utilizados para determinar a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da RT-PCR para dengue.

Desta forma, conclui-se que o método desenvolvido pelo estudo tem 54% de sensibilidade e 100% de especificidade quando abrange o universo das amostras analisadas para dengue. Os VPP e VPN para este universo de amostras são de 100% e 75% respectivamente.

		Dengue		
		+	-	Total
RT-PCR	+	21	0	21
	-	18	10	28
Total		39	10	49

Por outro lado, as mesmas análises também foram feitas para um universo constituído somente de amostras de soro, as quais foram base dos processos de isolamento e sequenciamento, portanto, os valores referentes à sensibilidade e à especificidade neste caso são de 82% e 100%, respectivamente. Os VPP e VPN para este universo de amostras são de 100% e 71% respectivamente.

		Isolamentos		
		+	-	Total
RT-PCR	+	18	0	18
	-	4	10	14
Total		22	10	32

5 DISCUSSÃO

A última grande epidemia de dengue registrada na região de Ribeirão Preto ocorreu no verão de 2015-2016, quando os casos suspeitos de dengue ultrapassaram a marca de 50.000 notificações, e destes, 31.444 foram confirmados. Os casos suspeitos para dengue foram acompanhados por alguns registros de suspeitas de febre chikungunya e por altos índices de suspeita para a febre Zika (aproximadamente 4000 casos) (anexos ANEXO D, ANEXO E e ANEXO F) (Secretaria Municipal Da Saúde De Ribeirão Preto, 2019). Esta epidemia resultou também em mais de 300.000 notificações de CHIKV em todo o Brasil até 2017 e os casos brasileiros correspondiam a 90% dos casos confirmados das Américas (Darrigo *et al.*, 2018).

A queda no número de casos após grandes epidemias é comum, pois a população se mobiliza junto às autoridades no combate ao vetor, além de a imunidade contra o vírus circulante se solidificar. Epidemiologicamente, um período de 2 a 3 anos é o suficiente para o restabelecimento da população de vetores na região epidêmica e há risco de novos surtos acontecerem. Como pode ser comprovado nos anexos ANEXO D, ANEXO E e ANEXO F, uma queda acentuada (cerca de 97% nos casos notificados de DENV e de 98% nos casos suspeitos de ZIKV no período sazonal de 2017) aconteceu exatamente no período de início das coletas de amostras para este estudo e teve pouca oscilação até recentemente, momento de conclusão do mesmo. Como não foi possível coletar volume de amostras clínicas estatisticamente suficientes no período do estudo (Tabela 5), foi necessário executar complementarmente, testes com amostras disponíveis no biorrepositório “Banco de amostras de arbovírus” (FCFRP N° 006) do Laboratório de Virologia da FCFRP-USP. Estas amostras foram coletadas entre março de 2010 e junho de 2011 (Tabela 8) (Poloni *et al.*, 2016), e foram isoladas e sequenciadas em estudo prévio do laboratório de virologia da FCFRP-USP (Soares, 2014).

Foram selecionados e avaliados métodos, condições de teste e aporte financeiro para o desenvolvimento do estudo. Para isto, o método de RT-PCR em tempo real, o qual é um método de grande confiabilidade e com baixo índice de contaminação, foi o escolhido para basear os ensaios (Pongsiri *et al.*, 2012). Os imunoenaios também foram considerados como comprovação de resultados, porém, existem relatos de altos índices de reação cruzada comum entre os flavivírus em métodos imunológicos. Já foram relatados casos em que infecções por ZIKV confirmadas por RT-PCR apresentaram resultados positivos para DENV através de análise de IgM, mesmo quando o RNA de DENV não pôde ser encontrado na RT-PCR (Lanciotti *et al.*, 2008; Cabral-Castro *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2017).

A estratégia primária para o desenho das sondas que compõem o estudo era a de tornar possível a diferenciação do CHIKV, ZIKV e dos 4 sorotipos do DENV utilizando um único par de *primers* para os DENV, que já havia sido testado e possui eficiência comprovada por outros estudos, e utilizar a mesma região genômica altamente conservada e minimamente passível de mutações para os desenhos referentes aos demais vírus. Alguns estudos indicam protocolos de RT-PCR em tempo real similares ao que foi desenvolvido neste estudo, porém, raros (Pabbaraju *et al.*, 2016) atingem o objetivo principal deste trabalho, que é diferenciar os flavivírus do alfavírus e distinguir os sorotipos do DENV. No entanto, comumente acontecem três situações: ou existe a detecção do DENV, ZIKV e CHIKV sem a diferenciação dos sorotipos do DENV (Mansuy *et al.*, 2018; Santiago *et al.*, 2018); ou somente a distinção dos sorotipos do DENV (Johnson *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2019); ou ainda detectam-se apenas dois vírus (Lu *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015). Os ensaios primários para verificação do correto funcionamento destes pares de *primers* e suas respectivas sondas foram executados e comprovaram sua eficácia (Figura 16 e Figura 17).

A partir de então, foram executados ensaios para avaliação das melhores condições de amplificação na RT-PCR em tempo real, tais como: qual a melhor temperatura para o anelamento dos *primers* e sondas, a melhor concentração de sondas na reação e se fazia-se necessário a adição de cloreto de magnésio à reação.

Estudos mostraram a utilização de uma concentração de sondas para dengue entre 200 e 300 nM e, algumas vezes, concentrações menores para o ZIKV e CHIKV (Pabbaraju *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2018; Santiago *et al.*, 2018; Yousseu *et al.*, 2018; Mun *et al.*, 2019). Os resultados obtidos nas análises onde as concentrações variaram de 150 a 300 nM de sondas para o DENV-2, DENV-4, ZIKV e CHIKV mostraram mínima diferença de Ct entre si, por esta razão, foi selecionada a concentração de 250 nM para todas as sondas. Mesmo sendo possível utilizar uma concentração menor, como comprovado, preferiu-se não fugir aos protocolos já desenvolvidos por outros grupos e manter uma parcimônia e um padrão para todos os vírus em estudo. A mesma bibliografia acima citada foi utilizada em auxílio para definição da temperatura ideal de anelamento dos *primers* e sondas.

Quanto à avaliação da concentração de Mg^{+2} na reação foi comprovado que o aumento na concentração dos íons não interfere positiva ou negativamente na detecção do genoma viral, desta forma, manter a concentração de 3 mM do íon, já presente no mastermix do kit, evita-se uma manipulação extra e reduz os riscos de contaminação da reação.

Até que fossem executados os ensaios de aprimoramento da sensibilidade com a tecnologia ApoH (item 4.5) e das análises de interferência dos RNAs e DNAs celulares (item

4.6), hipotetizava-se que haveriam sérios prejuízos à RT-PCR em tempo real decorrentes de inibidores presentes nas amostras, contudo, foi verificado que, mesmo sendo a tecnologia ApoH um ponto importante na detecção de alguns organismos (Vutukuru *et al.*, 2016), ela não gerava grandes melhorias para o protocolo de RT-PCR desenvolvido neste momento, além de ser uma etapa extra bastante laboriosa e financeiramente dispendiosa a ser adicionada ao processo de purificação. A comprovação da ausência de interferência na RT-PCR em tempo real pelos RNAs e DNAs celulares presentes nas amostras de sangue total só corrobora com a decisão tomada com relação ao ApoH, porém, a utilização de amostras de soro em contrapartida às amostras de sangue total se mostrou muito mais prática para os ensaios.

Durante as coletas de amostras foi constatado, principalmente nas coletas de saliva, que os volumes podem não ser suficientes para suprir mais de um protocolo de purificação, algumas vezes necessário para repetições de ensaios. Desta forma, foi necessário analisar se o volume de amostras poderia ser reduzido sem prejuízo da RT-PCR em tempo real. Os testes mostram que a utilização de um quarto do volume exigido pelo kit de purificação não altera significativamente os resultados e promove uma possibilidade de repetições mesmo quando os volumes de amostras coletadas são reduzidos.

Os casos de infecção por DENV em humanos costumam atingir altos valores de carga viral no sangue (viremia) durante a fase aguda (em torno de 10^9 cópias/mL), mas os títulos virais caem acentuadamente logo após a fase aguda da doença (Chen *et al.*, 2015) e é devido esta característica que um limite de detecção baixo para o método proposto pode ser crucial no diagnóstico diferencial. Os limites encontrados para os ensaios baseados em sondas descritos neste trabalho são suficientes para detecção dos vírus em amostras clínicas e, excetuando-se os valores para DENV-3, encontram-se justapostos aos resultados descritos na literatura (Chen *et al.*, 2015; Simmons *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2018).

O ensaio baseado em *SYBR Green* tem melhor custo-benefício que aqueles baseados em sondas, porém, o *SYBR Green* é um intercalante inespecífico de fitas duplas e produtos de dímeros de *primers* podem gerar resultados falso-positivos nesta técnica (Chen *et al.*, 2015), no entanto, os ensaios baseados em *SYBR Green* descritos neste trabalho são destinados somente à detecção do DENV e foram testados com base em estudos anteriores utilizando o mesmo par de *primers*, os quais demonstraram grande eficácia de resultados (Aquino *et al.*, 2006; Dos Santos *et al.*, 2008; Poloni *et al.*, 2010; Poloni *et al.*, 2016).

Também se fazia necessário determinar se as sondas desenhadas no estudo eram específicas, ou seja, se havia reação cruzada entre elas e outros vírus do mesmo gênero ou até entre elas e os vírus envolvidos em reações de multiplex. Após vários ensaios executados para

este fim, foi verificado que ambas as sondas de DENV-3 e DENV-4 apresentam reação cruzada com DENV-1, e também a sonda de DENV-4 detectava o DENV-3, causando um grande problema quanto à dinâmica do multiplex, pois não seria possível nenhuma combinação sem que se aumentasse o número de reações a serem executadas.

Desta forma, foram desenhadas novas sondas sob a condição de que ainda estivessem contidas na região genômica delimitada pelo par de *primers* para que estes não tivessem que ser também redesenhados. Assim foi feito e as novas sondas foram submetidas a todos os testes para avaliação de correto funcionamento, limite de detecção e reação cruzada.

Infelizmente, a reação cruzada persistiu, porém, com menor impacto. A nova sonda de DENV-3 continuou detectando o sorotipo 1 e a sonda de DENV-4 passou a reagir cruzadamente somente com o sorotipo 2. Neste cenário, é possível fazer um duplex de sondas para DENV-1 e DENV-2 e outro duplex de sondas para DENV-3 e DENV-4, e caso haja amplificação no segundo duplex ele deverá ser comparado aos resultados do primeiro a fim de proceder-se uma análise de exclusão para o diagnóstico diferencial.

Quanto aos vírus pertencentes ao mesmo gênero, porém, alheios ao protocolo de diagnóstico desenvolvido, não houve reação cruzada com nenhum dos testados.

A partir destas análises e ensaios foi que se padronizou o protocolo padrão para os testes que foram executados com as amostras clínicas de participantes recrutados e do biorrepositório.

Como pode ser observado nas Tabela 22 e Tabela 23, foi possível detectar o vírus em 64% das amostras e há concordância nos sorotipos identificados no protocolo do estudo com o sorotipo referido no isolamento 48% das vezes. A ausência de detecção pode ter ocorrido por degradação da amostra devido ao longo tempo de armazenagem ou até mesmo devido alterações no pH durante o armazenamento, ou utilização de amostra pertencente ao mesmo indivíduo, porém, sem que fosse a amostra alvo do isolamento.

Das amostras clínicas coletadas de indivíduos com doenças febris ou exantemáticas recrutados entre 2017 e 2019, foi possível detectar DENV em 5 dos 18 participantes, porém a confirmação destes resultados e dos negativos de outros 8 participantes, não foi possível devido ausência de exames laboratoriais comprobatórios. Foi investigado se os exames solicitados pelo sistema público ou privado de saúde (detecção da proteína NS1, prova do laço, hematócrito, hemograma completo, etc.) confirmavam o diagnóstico negativo para DENV, porém, somente em 5 casos negativos para os 3 vírus nos nossos ensaios houve esta confirmação de doenças alheias aos vírus do estudo.

Por fim, foram executados os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da RT-PCR para dengue.

Quando avaliado o total de amostras do biorrepositório, onde podemos encontrar amostras de saliva e urina somadas às amostras de soro, o método desenvolvido neste estudo tem 54% de sensibilidade, 100% de especificidade, 100% de VPP e 75% de VPN. Levando-se em consideração que os isolamentos e sequenciamentos são feitos a partir de amostras de soro, fizemos cálculos extras excluindo as amostras de saliva e urina que poderiam não ser positivas para os vírus mesmo pertencendo ao mesmo indivíduo doador infectado. Para o grupo de amostras exclusivas de soro temos 82% de sensibilidade, 100% de especificidade, 100% de VPP e 71% de VPN.

Estes valores são muito similares aos encontrados em estudos publicados para o DENV (Pongsiri *et al.*, 2012; Simmons *et al.*, 2016; Prado *et al.*, 2018).

6 CONCLUSÃO

- 1 – A detecção diferencial dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV é eficaz em uma única etapa.
- 2 – As sondas e *primers* desenhados para o DENV-1, DENV-2, ZIKV e o CHIKV são fiéis ao seu tipo viral, não ocorrendo reação cruzada com outros flavivírus e alfavírus, respectivamente.
- 3 – As sondas de DENV-3 e DENV-4 reagem cruzadamente com os DENV-1 e DENV-2 respectivamente.
- 4 – A determinação do sorotipo para os casos positivos para DENV é possível através de reações em duplex de sondas em etapa extra.
- 5 – Os limites de detecção do método permitem a identificação de indivíduos infectados.
- 6 – Os RNAs e DNAs celulares não interferem na detecção viral.
- 7 – O volume de amostra a ser utilizado para purificação pode ser reduzido em 75% sem gerar prejuízo na RT-PCR.
- 8 – A detecção viral através de amostras de saliva é possível, porém as amostras de soro ainda são as mais indicadas para diagnóstico.
- 9 – O método tem alta especificidade e sensibilidade.

REFERÊNCIAS¹

- AGARWAL, A. et al. **Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in Aedes aegypti**. In: (Ed.). *PLoS Negl Trop Dis*, v.8, 2014. ISBN 1935-2727 (Print)1935-2735 (Electronic). Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002990>>
- ANDRIOLO, A. et al. **Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica - medicina laboratorial para coleta de sangue venoso**. Barueri, SP: Manole Editora, 2010. ISBN 978-85-98416-94-6. Disponível em: <<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>>.
- APOHTECH. **Apolipoprotein H**. 2019. Disponível em: <<https://www.apotech.com/index.php?id=43>>.
- AQUINO, V. H. et al. **Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004**. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, n. 4, p. 710-5, Oct 2006. ISSN 0002-9637. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17038699>>.
- ARIAS-GOETA, C. et al. **Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein**. *Infect Genet Evol*, v. 24, p. 116-26, Jun 2014. ISSN 1567-7257. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681263>>.
- BESNARD, M. et al. **Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014**. *Euro Surveill*, v. 19, n. 13, 2014. ISSN 1560-7917. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538>>.
- BHATT, S. et al. **The global distribution and burden of dengue**. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 504, 2013-04-07 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature12060>>.
- BRASIL. **Ribeirão Preto - subsetor Oeste**. <https://www.google.com.br/maps>, 2018. Disponível em: <<https://www.google.com/maps/d/u/0/viewer?hl=pt-BR&hl=pt-BR&mid=1T1wUfe98Fzn9fjLzy-kA6sBIXra8TDyO&ll=-21.16823542100352%2C-47.85141194714356&z=14>>.
- CABRAL-CASTRO, M. J. et al. **Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients**. *J Clin Virol*, v. 82, p. 108-111, Sep 2016. ISSN 1386-6532. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.017>>.
- CALVET, G. et al. **Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study**. *Lancet Infect Dis*, Feb 2016. ISSN 1474-4457. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>>.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. **Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil**. *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 10, p. 1885-6, Oct 2015. ISSN 1080-6059. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26401719>>.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

CARDOSO, C. W. et al. **Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil.** *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 12, p. 2274-6, Dec 2015. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26584464> >.

CAVALCANTI, L. P. et al. **Change in age pattern of persons with dengue, northeastern Brazil.** *Emerg Infect Dis*, v. 17, n. 1, p. 132-4, Jan 2011. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192876> >.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **First Report of Chikungunya in Western hemisphere. Press release.** CDC: Center of Disease Control and Prevention(CDC) 2007. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2013/p1218-chikungunyas.html/>>

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Diretrizes para prevenção e controle das arboviroses urbanas no estado de São Paulo** SAÚDE, G. D. E. D. S. P.-S. D. www.saude.sp.gov.br 2017.

CHEN, H. et al. **Development and Evaluation of a SYBR Green-Based Real-Time Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection and Serotyping of Dengue and Chikungunya Viruses.** *J Mol Diagn*, v. 17, n. 6, p. 722-8, Nov 2015. ISSN 1525-1578. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.06.008> >.

DARRIGO, L. G.; DE SANT'ANNA CARVALHO, A. M.; MACHADO, C. M. **Chikungunya, Dengue, and Zika in Immunocompromised Hosts.** In: (Ed.). *Curr Infect Dis Rep*, v.20, 2018. ISBN 1523-3847 (Print)1534-3146 (Electronic). Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11908-018-0612-2>>

DAVID M. KNIPE, P. M. H. **Fields Virology**. 6. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. ISBN 10: 1-4511-0563-0.

DE SIMONE, T. S. et al. **Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 98, n. 9, p. 553-62, Sep 2004. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251405> >.

DEL CAMPO, M. et al. **The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome.** *American Journal of Medical Genetics*, 2017. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.a.38170> >.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. **Zika virus. I. Isolations and serological specificity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 46, n. 5, p. 509-20, Sep 1952. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12995440> >.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. **Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health.** *Rev Saude Publica*, v. 51, p. 30, Apr 10 2017. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889> >.

DOS SANTOS, H. W. et al. **A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection.** *J Med Virol*, v. 80, n. 8, p. 1426-33, Aug 2008. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18551599> >.

DUBRULLE, M. et al. Chikungunya Virus and Aedes Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. In: (Ed.). **PLoS One**, v.4, 2009. ISBN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005895>>

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. **Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014.** In: (Ed.). **Emerg Infect Dis**, v.21, 2015. p.381-2. ISBN 1080-6040 (Print)1080-6059 (Electronic). Disponível em: < https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1553_article>

EDITORS, B. C. **Marie Curie Biography.** <https://www.biography.com/people/marie-curie-9263538>, 2019.

ENFISSI, A. et al. **Zika virus genome from the Americas.** *Lancet*, v. 387, n. 10015, p. 227-8, Jan 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26775124> >.

FARIA, N. R. et al. **Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings.** *Science*, v. 352, n. 6283, p. 5, 2016-04-15 2016. Disponível em: < <https://science.sciencemag.org/content/352/6283/345> >.

FAYE, O. et al. **Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421913> >.

FELIX, A. C. et al. **Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010.** *Clin Vaccine Immunol*, v. 19, n. 12, p. 1972-6, Dec 2012. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100478> >.

_____. **Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection.** *J Med Virol*, v. 89, n. 8, p. 1477-1479, Aug 2017. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24789> >.

FIGUEIREDO, L.; FONSECA, B. **Dengue.** In: Roberto Focaccia. *Tratado de infectologia*. 3ª Ed. Sao Paulo: 2005.

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. **Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro.** *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 47, n. 6, p. 677-83, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645> >.

FISCHER, M.; STAPLES, J. E.; ARBOVIRAL DISEASES BRANCH, N. T. C. F. E. A. Z. I. D., C. D. C. **Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas - Caribbean and South America, 2013-2014.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 63, n. 22, p. 500-1, Jun 2014. ISSN 1545-861X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898168> >.

GODOY, P. et al. **Andes virus antigens are shed in urine of patients with acute hantavirus cardiopulmonary syndrome.** *J Virol*, v. 83, n. 10, p. 5046-55, May 2009. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279096> >.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **EMPLASA - Empresa Paulista de Planejamento Metropolitano** 2018. Disponível em: < <https://www.emplasa.sp.gov.br/> >

GUBLER, D. J. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** *Clin Microbiol Rev*, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979> >.

HALSTEAD, S. B. **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** *Science*, v. 239, n. 4839, p. 476-81, Jan 1988. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3277268> >.

HALSTEAD, S. B.; THOMAS, S. J. **Licensed Vaccines and Vaccines in Development.** In: ELSEVIER (Ed.). *Plotkin's Vaccines*. 7, 2018. cap. 2, p.241-251. ISBN 978-0-323-35761-6.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. **Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand.** *Science*, v. 131, n. 3407, p. 1102-3, Apr 1960. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14399343> >.

HEID, C. A. et al. **Real time quantitative PCR.** *Genome Research*, v. 6, n. 10, p. 986-94, Oct 1996. ISSN 1088-9051 (Print)1088-9051. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/gr.6.10.986> >.

HULO C, D. C. E., MASSON P, BOUGUELERET L, BAIROCH A, XENARIOS I, LE MERCIER P. **ViralZone.** 2018. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/> >.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **IBGE Cidades** 2018. Disponível em: < <https://cidades.ibge.gov.br/> >

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Viral Taxonomy** 2018. Disponível em: < https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/ >

IOVINE, N. M. et al. **Coinfection With Zika and Dengue-2 Viruses in a Traveler Returning From Haiti, 2016: Clinical Presentation and Genetic Analysis.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 1, p. 72-75, 2017. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <https://academic.oup.com/cid/article-pdf/64/1/72/8485315/ciw667.pdf> >.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. **Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay.** *J Clin Microbiol*, v. 43, n. 10, p. 4977-83, Oct 2005. ISSN 0095-1137 (Print)0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.43.10.4977-4983.2005> >.

JURADO, K. A.; IWASAKI, A. **Zika virus targets blood monocytes.** *Nat Microbiol*, v. 2, n. 11, p. 1460-1461, Nov 2017. ISSN 2058-5276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-017-0049-7> >.

KAWAMURA, T. **Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste.** http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2002001300015: Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 79: 437-441 p. 2002.

KENNEDY, A. C.; FLEMING, J.; SOLOMON, L. **Chikungunya viral arthropathy: a clinical description.** *J Rheumatol*, v. 7, n. 2, p. 231-6, 1980 Mar-Apr 1980. ISSN 0315-162X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7373626> >.

KHAN, A. H. et al. **Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site.** *J Gen Virol*, v. 83, n. Pt 12, p. 3075-84, Dec 2002. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12466484> >.

KHAN, M. et al. **Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus.** *J Med Virol*, v. 86, n. 7, p. 1169-75, Jul 2014. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24105844> >.

KRAUER F et al. **Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review.** *PLoS Med*, v. 14, n. 1, 2017. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002203> >.

LANCIOTTI, R. S. et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** *Emerg Infect Dis*, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18680646> >.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes na Brasil.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014. ISSN 2176-6223. Disponível em: < <http://revista.iec.pa.gov.br/> >.

LU, X. et al. **Rapid identification of Chikungunya and Dengue virus by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method.** *Am J Trop Med Hyg*, v. 87, n. 5, p. 947-53, Nov 2012. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0721> >.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Res*, v. 30, n. 6, p. 1292-305, Mar 2002. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884626> >.

MACNAMARA, F. N. **Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 48(2): 139-45 p. 1954.

MANSUY, J. M. et al. **Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR.** *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 92, n. 4, p. 284-287, Dec 2018. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.019> >.

MARTINS, V. E. P. et al. **Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil.** *Plos One*, 2012. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0041386> >.

MATHEW, A. et al. **Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection.** *J Virol*, v. 72, n. 5, p. 3999-4004, May 1998. ISSN 0022-538X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9557687> >.

MAVALE, M. et al. **Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae).** *Am J Trop Med Hyg*, v. 83, n. 6, p. 1242-4, Dec 06 2010. ISSN 0002-9637 (Print)1476-1645 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0577> >.

MIAGOSTOVICH, M. P. et al. **Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001.** *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 8, p. 869-72, Aug 2002. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12185377> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletins sobre Chikungunya 2014.** Brasil: Ministério da Saúde 2014. Disponível em: < http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim_Chikungunya_BA_N1_30092014.pdf >

_____. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança.** 5ª edição. Brasil: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016. ISBN 978-85-334-2344-2.

MLAKAR, J. et al. **Zika Virus Associated with Microcephaly.** *N Engl J Med*, v. 374, n. 10, p. 951-8, Mar 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862926> >.

MONATH, T. P. **Dengue: the risk to developed and developing countries.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n. 7, p. 2395-400, Mar 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146129> >.

MONATH, T. P.; HINZ, F. X. **The Alpha viruses.** *Fields Virology*: Lippincott-Raven, Philadelphia: 843-898 p. 1996.

MUN, M. J. et al. **One-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of dengue virus.** *Mol Cell Probes*, v. 43, p. 86-91, Feb 2019. ISSN 0890-8508. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2018.10.001> >.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. **Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?** *Lancet*, v. 386, n. 9990, p. 243-4, Jul 2015. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26194519> >.

MUSSO, D. et al. **Potential sexual transmission of Zika virus.** *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 2, p. 359-61, Feb 2015. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625872> >.

NIESTERS, H. G. **Clinical virology in real time.** *J Clin Virol*, v. 25 Suppl 3, p. S3-12, Dec 2002. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467772> >.

NOGUEIRA, R. M. et al. **Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 7, p. 925-6, Oct 2001. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685256> >.

_____. **Dengue epidemic in the stage of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes.** *Epidemiol Infect*, v. 111, n. 1, p. 163-70, Aug 1993. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8348928> >.

_____. **Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 83, n. 2, p. 219-25, 1988 Apr-Jun 1988. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2593823> >.

OEHLER, E. et al. **Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013.** *Euro Surveill*, v. 19, n. 9, 2014. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626205> >.

OSANAI, C. H. et al. **Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 25, n. 1, p. 53-4, 1983 Jan-Feb 1983. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6879054> >.

PABBARAJU, K. et al. **Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay.** *J Clin Virol*, v. 83, p. 66-71, Oct 2016. ISSN 1386-6532. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.09.001> >.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chikungunya outbreaks:** Pan American Health Organization (PAHO) 2014.

_____. **Dengue: General Information** 2019.

PAUL, D.; BARTENSCHLAGER, R. **Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories.** *World J Virol*, v. 2, n. 2, p. 32-48, May 2013. ISSN 2220-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175228> >.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. **Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design.** *Antiviral Res*, v. 80, n. 1, p. 11-22, Oct 2008. ISSN 0166-3542 (Print)1872-9096 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.05.004> >.

PETERSEN, E. et al. **Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games.** *Int J Infect Dis*, v. 44, p. 11-5, Mar 2016. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26854199> >.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. **Zika Virus: A Review to Clinicians.** *Acta Med Port*, v. 28, n. 6, p. 760-5, 2015 Nov-Dec 2015. ISSN 1646-0758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26849762> >.

POLONI, T. R. et al. **High prevalence of clinically unsuspected dengue disease among children in Ribeirao Preto city, Brazil.** *J Med Virol*, v. 88, n. 10, p. 1711-9, Oct 2016. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24533> >.

_____. **Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR.** *Virol J*, v. 7, p. 22, 2010. ISSN 1743-422X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105295> >.

PONGSIRI, P. et al. **Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus.** *Asian Pac J Trop Med*, v. 5, n. 5, p. 342-6, May 2012. ISSN 1995-7645. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645\(12\)60055-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1995-7645(12)60055-8) >.

PRADO, P. S. 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*, v. 113, n. 8, p. e170433, Jun 25 2018. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170433> >.

PREFEITURA MUNICIPAL DE RIBEIRÃO PRETO. **Dados Geográficos.** 2018. Disponível em: < <https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/crp/dados/local/i01local.php> >.

PYBUS, O. G.; RAMBAUT, A. **Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease.** *Nat Rev Genet*, v. 10, n. 8, p. 540-50, Aug 2009. ISSN 1471-0064. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19564871> >.

REDDY, V. et al. **Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever.** *J Med Virol*, v. 84, n. 11, p. 1771-8, Nov 2012. ISSN 1096-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997080> >.

ROBINSON, M. C. **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373834> >.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. **Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity.** *Cell Mol Life Sci*, v. 67, n. 16, p. 2773-86, Aug 2010. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20372965> >.

RODRIGUEZ, J. A. O.; J.R. WALKER, I. **Chikungunya Fever.** 2018/11/15 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. **Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region.** *Science*, v. 363, n. 6427, p. 607-610, Feb 8 2019. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.aav6618> >.

RUBIN, E. J.; GREENE, M. F.; BADEN, L. R. **Zika Virus and Microcephaly.** *N Engl J Med*, v. 374, n. 10, p. 984-5, Mar 2016. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862812> >.

SABIN, A. B. **The dengue group of viruses and its family relationships.** *Bacteriol Rev*, v. 14, n. 3, p. 225-32, Sep 1950. ISSN 0005-3678. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772197> >.

SANTIAGO, G. A. et al. **Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses.** *Nat Commun*, v. 9, n. 1, p. 1391, Apr 11 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03772-1> >.

SANTOS, N. S. D. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana.** 2. ed. Rio de Janeiro: 2008. 532 ISBN 978-85-277-1456-3.

SCHATZMAYR, H. G.; CABRAL, M. C. **Virologia no Estado do Rio de Janeiro - Uma visão Global.** 2ª edição. 2012. 176.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 81, n. 2, p. 245-6, 1986 Apr-Jun 1986. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587006> >.

SCHILTE, C. et al. **Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells.** *J Exp Med*, v. 207, n. 2, p. 429-42, Feb 2010. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123960> >.

SECRETARIA MUNICIPAL DA SAÚDE DE RIBEIRÃO PRETO. **Boletim Epidemiológico mensal de Dengue-Zika-Chikungunya.** EPIDEMIOLOGICA, D. D. V. 2019.

SILER, J. F.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. **Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention.** *Philipp, J. Sci.*, v. 29, n. 1-2, p. 1-304, 1926.

SIMMONS, M. et al. **Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Dengue and Chikungunya Viruses.** *J Clin Microbiol*, v. 54, n. 7, p. 1766-1773, Jul 2016. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00299-16> >.

SIMON, F. et al. **Chikungunya virus infection.** *Curr Infect Dis Rep*, v. 13, n. 3, p. 218-28, Jun 2011. ISSN 1534-3146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21465340> >.

SOARES, A. M. **Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011.** 2014. 95 FCFRP, USP

SOURISSEAU, M. et al. **Characterization of Reemerging Chikungunya Virus.** In: (Ed.). **PLoS Pathog**, v.3, 2007. ISBN 1553-7366 (Print)1553-7374 (Electronic). Disponível em: < <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030089> >

STEFAS, E. et al. **Human plasmatic apolipoprotein H binds human immunodeficiency virus type 1 and type 2 proteins.** *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 13, n. 1, p. 97-104, Jan 1997. ISSN 0889-2229. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989432> >.

STEFAS, I. et al. **Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H.** *Hepatology*, v. 33, n. 1, p. 207-17, Jan 2001. ISSN 0270-9139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124838> >.

SWEET, B. H.; SABIN, A. B. **Properties and antigenic relationships of hemagglutinins associated with the dengue viruses.** *J Immunol*, v. 73, n. 5, p. 363-73, Nov 1954. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13212058> >.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TSETSARKIN, K. A. et al. **Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence.** *Curr Opin Virol*, v. 1, n. 4, p. 310-7, Oct 1 2011. ISSN 1879-6257 (Print)1879-6265 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004> >.

_____. **A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential.** *PLoS Pathog*, v. 3, n. 12, p. e201, Dec 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18069894> >.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. ***Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American countries-past and present situation and future perspective.** In: (Ed.). *Dengue Bulletin*, v.23, 1999. p.55 - 66.

VEGA-RÚA, A. et al. **High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus.** *J Virol*, v. 88, n. 11, p. 6294-306, Jun 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24672026> >.

VILLABONA-ARENAS, C. J. et al. **Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 2, p. e2620, Feb 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587454> >.

VILLAMIL-GOMEZ, W. E. et al. **Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia.** *Int J Infect Dis*, v. 51, p. 135-138, Oct 2016. ISSN 1201-9712. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.07.017> >.

VOGELS, C. B. F. et al. **Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern?** *PLoS Biol*, v. 17, n. 1, p. e3000130, Jan 2019. ISSN 1544-9173. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3000130> >.

VUTUKURU, M. R. et al. **A rapid, highly sensitive and culture-free detection of pathogens from blood by positive enrichment.** *J Microbiol Methods*, v. 131, p. 105-109, Dec 2016. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.008> >.

WEAVER, S. C. **Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health.** *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2014. Disponível em: < <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002921> >.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; DOORN, P. A. V. **Guillain-Barré syndrome.** *The Lancet*, v. 388, n. 10045, p. 717-727, 2016. Disponível em: < [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)00339-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)00339-1/fulltext) >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of outbreaks of Chikungunya 2005, 2006, 2007:** World Health Organization (WHO) 2007. Disponível em: < <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/7759>>

_____. **Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control.** 2009. ISBN 9789241547871. Disponível em: < <https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>

_____. **Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome:** World Health Organization 2016a. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250590>>

_____. **Zika situation report.** WHO: World Health Organization 2016b. Disponível em: < <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/31-march-2016/en/>>

_____. **News/fact sheets.** News/Fact sheets 2018a. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/>>

_____. **World Health Organization - News** 2018b. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room>>

YOUNG, P. R. et al. **An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients.** *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 3, p. 1053-7, Mar 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698995> >.

YOUSSEU, F. B. S. et al. **Detection and serotyping of dengue viruses in febrile patients consulting at the New-Bell District Hospital in Douala, Cameroon.** *PLoS One*, v. 13, n. 10, p. e0204143, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0204143> >.

ZANLUCA, C. et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569-72, Jun 2015. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061233> >.

APÊNDICE A – TCLE de assentimento de participantes menores de idade.

1

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO – USP LABORATORIO DE
VIROLOGIA****TERMO DE ASSENTIMENTO**

NOME DA PESQUISA: “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA – Orientador

VERONICA LIPPI OLIVEIRA DA SILVA – Mestranda

Gostaria de te convidar para participar de um estudo sobre o diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika, para isso preciso da sua autorização e que um adulto, maior de 18 anos, permita que você participe.

Os vírus que causam a chikungunya, a dengue e a Zika circulam ao mesmo tempo e nas mesmas regiões no Brasil. Existe grande dificuldade de diagnosticar e diferenciar estas doenças porque elas tem sintomas muito parecidos, é de grande interesse o desenvolvimento de formas de diferenciar essas doenças, dizer rapidamente qual vírus causou a doença e começar o tratamento correto do paciente para prevenir as epidemias.

Você passou por avaliação de um médico que suspeita que você esteja infectado(a) com o vírus da chikungunya, da dengue ou da Zika. Se você aceitar o nosso convite e o(a) responsável por você permitir, um pouco do seu sangue e saliva serão colhidos para confirmar por qual vírus você está infectado(a). Uma pessoa experiente fará a retirada de um pouquinho do seu sangue com seringa e agulha fina, será aproximadamente 5mL (mais ou menos uma colher de chá). A sua saliva será recolhida também por pessoa treinada através de aspiração com um tubinho (pipeta) plástico colocado na sua boca, aproximadamente 1mL (meia colher de café). Todo o material utilizado é descartável, ou seja, só será usado em você e depois vai para o lixo. No sangue e na saliva que você nos doar faremos dois exames: Um chamamos de PCR (que é a abreviação para Reação em Cadeia da Polimerase) onde procuraremos o vírus da chikungunya, da dengue e da Zika; O outro chamamos de sorologia e procuramos os anticorpos que você produziu contra estes vírus.

Vamos precisar que você nos doe outra amostra de sangue quando você já estiver melhorando, mais ou menos 15 dias depois desse nosso encontro para repetir os mesmos exames que já te expliquei, assim vamos medir como você reagiu à doença. Vamos ligar para você e iremos à sua casa para colher esta outra amostra de sangue se você e o(a) seu(sua) responsável permitirem. Todas as amostras de sangue e saliva serão guardadas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames de chikungunya, dengue e Zika. Quando a gente for coletar o sangue pode ser que você se sinta um pouquinho desconfortável com a picadinha da agulha, mas ela é fina e tudo será feito bem rápido, com muito carinho e muito cuidado. Os riscos que você corre são mínimos, algumas pessoas podem ficar com uma marquinha levemente arroxada no local que logo desaparece, mas para evitar isto será feito um pequeno curativo. Você e seu(sua) responsável não terão nenhum gasto por participarem deste estudo.

A parte boa é que você e o médico vão saber rapidinho qual o vírus que você tem, e aí o médico vai poder receitar remédios que vão te deixar melhor mais depressa. Com a sua ajuda neste estudo poderemos desenvolver métodos de diagnóstico para a chikungunya, a dengue e a Zika que no futuro ajudarão outras pessoas com doenças que causam febre. Quando o estudo terminar, os resultados serão divulgados a todas as pessoas que possam ser beneficiadas com esse

conhecimento e também serão publicados na comunidade científica, mas ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der.

Você e a pessoa responsável por você serão informados(as) sobre os resultados dos exames que fizemos. Sintam-se à vontade para perguntar, pedir informações sobre a pesquisa e esclarecer suas dúvidas, para isso, basta entrarem em contato com os pesquisadores responsáveis através dos telefones e endereços que estão no fim deste termo. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, você pode dizer “não” a qualquer momento. Não há problema algum se isso acontecer.

O seu tratamento médico não será prejudicado se você não quiser participar dessa pesquisa e este estudo não muda nenhum tratamento de rotina recomendado pelo seu médico.

Se você tiver lido o termo de assentimento (ou se ele tiver sido explicado para você), tiver entendido as informações e concordar voluntariamente em participar, por favor, assine abaixo. Você receberá uma via deste termo e a outra ficará guardada no arquivo dos pesquisadores responsáveis. O endereço dos pesquisadores é: Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Via do Café, s/n-14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo Brasil. Telefone: (16) 3315-0246 e (16) 3315-4510.

Eu expliquei o motivo deste estudo ao(à) voluntário(a). Estou certo de que ele(a) entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo.

Data: _____

_____
Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
(16) 3315-4510 / (16) 99992-8048

_____
Veronica Lippi Oliveira da Silva
(16) 3315-0246 / (16) 98816-6097

Consentimento do(a) Participante de Pesquisa

Eu _____ aceito voluntariamente participar da pesquisa “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.” doando amostras de sangue e saliva. Entendi tudo que pode acontecer e entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com a pessoa maior de 18 anos responsável por mim. Recebi uma via deste termo de assentimento, li e concordo em participar da pesquisa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do(a) participante

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP, Ribeirão Preto – SP. Fone (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcrp.usp.br

APÊNDICE B – TCLE de responsáveis por participantes menores de idade.

1

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO - USP
LABORATORIO DE VIROLOGIA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DA PESQUISA: “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA – Orientador

VERONICA LIPPI OLIVEIRA DA SILVA - Mestranda

Gostaria de convidar o(a) menor sob sua responsabilidade, e solicitar a sua autorização, para participar de um estudo sobre o diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika. Os vírus que causam a chikungunya, a dengue e a Zika circulam ao mesmo tempo e nas mesmas regiões no Brasil. Existe grande dificuldade de diagnosticar e diferenciar estas doenças porque elas tem sintomas muito parecidos, é de grande interesse o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam específicos para essas doenças. O diagnóstico rápido e correto do vírus causador é importante para o tratamento eficiente do paciente e de medidas de prevenção às epidemias.

O(A) menor sob sua responsabilidade passou por avaliação médica e está com suspeita de estar infectado com o vírus da chikungunya, da dengue ou da Zika. Se ele(a) aceitar o nosso convite, e você autorizar sua participação, um pouco do sangue e saliva dele serão colhidos para confirmar por qual vírus ele(a) está infectado. Uma pessoa experiente e treinada coletará aproximadamente 5mL (mais ou menos uma colher de chá) de sangue com seringa e agulha fina. A saliva, aproximadamente 1mL (meia colher de café), será colhida também por pessoa treinada através de aspiração diretamente da boca com um tubinho (pipeta) plástico. Todo o material a ser utilizado é descartável. Nas amostras colhidas faremos dois exames: Um chamamos de PCR (que é a abreviação para Reação em Cadeia da Polimerase) onde procuraremos o vírus da chikungunya, da dengue e da Zika no material que ele(a) nos doar; O outro chamamos de sorologia e procuramos os anticorpos que ele(a) produziu contra estes vírus.

Uma nova amostra de sangue será necessária para realização dos mesmos exames 15 dias após a coleta desta primeira amostra para medir como ele(a) reagiu à doença. Vamos ligar para você e iremos à sua casa para colher esta outra amostra de sangue. Todas as amostras de sangue e saliva serão estocadas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames de chikungunya, dengue e Zika. Na coleta de sangue é esperado um pequeno desconforto pela agulha, mas ela é fina, apropriada para cada idade e a coleta será feita de modo muito cuidadoso. Poderá ficar uma pequena marca levemente arroxeadas no local, mas para evitar isto será feito um pequeno curativo com material esterilizado. A participação não lhes trará nenhum gasto.

O benefício imediato que vocês terão neste estudo é a confirmação se ele(a) está infectado ou não com algum desses vírus e assim receber o tratamento que for mais adequado. A participação dele(a) neste estudo também possibilitará o desenvolvimento de métodos específicos de diagnóstico para a chikungunya, a dengue e a Zika que futuramente ajudará outras pessoas com doenças febris. Após o estudo, os resultados serão divulgados a todas as pessoas que possam ser beneficiadas com esse conhecimento e também serão publicados na comunidade científica, mas ele(a) não será identificado(a).

Vocês serão informados sobre os resultados dos exames realizados. Sintam-se à vontade para perguntar, pedir informações sobre a pesquisa e esclarecer suas dúvidas, para isso, basta entrarem em contato com os pesquisadores responsáveis através dos telefones e endereços que estão no fim deste termo.

Ele(a) não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito dele(a) desistir a qualquer momento e não há nenhum problema se isso acontecer. Você também pode retirar o seu consentimento a qualquer momento sem sofrer nenhum prejuízo.

Este estudo não muda nenhum tratamento de rotina recomendado pelo médico do(a) menor. Você não renuncia a nenhum direito legal ao assinar este termo de consentimento.

Se você tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você), tiver entendido as informações e concordar em autorizar o(a) menor em participar voluntariamente deste estudo, por favor, assine abaixo. Você receberá uma via deste termo e a outra ficará guardada no arquivo dos pesquisadores responsáveis. O endereço dos pesquisadores é: Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Via do Café, s/n-14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo Brasil. Telefone: (16) 3315-0246 e (16) 3315-4510.

_____
Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
(16) 3315-4510 / (16) 99992-8048

_____
Veronica Lippi Oliveira da Silva
(16) 3315-0246 / (16) 98816-6097

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como responsável pelo(a) participante de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP, Ribeirão Preto – SP. Fone (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Consentimento do(a) Responsável pelo(a) Participante de Pesquisa

Eu, _____, telefone: ( ) _____
após tomar conhecimento da pesquisa “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”, entendi e autorizo que o(a) menor _____
participe como voluntário(a), doando amostras de sangue e saliva para fins de pesquisa científica. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre a pesquisa, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes da sua participação. Foi garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me cause qualquer prejuízo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do(a) responsável pelo(a) menor participante

APÊNDICE C – TCLE de participantes sintomáticos.

1

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO - USP LABORATORIO DE VIROLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA – Orientador

VERONICA LIPPI OLIVEIRA DA SILVA - Mestranda

Gostaria de convidá-lo(a) e solicitar a sua autorização para participação de um estudo sobre o diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika. Os vírus que causam a chikungunya, a dengue e a Zika circulam ao mesmo tempo e nas mesmas regiões no Brasil. Existe grande dificuldade de diagnosticar e diferenciar estas doenças porque elas tem sintomas muito parecidos, é de grande interesse o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam específicos para essas doenças. O diagnóstico rápido e correto do vírus causador é importante para o tratamento eficiente do paciente e de medidas de prevenção às epidemias.

Você passou por avaliação médica e está com suspeita de estar infectado(a) com o vírus da chikungunya, da dengue ou da Zika. Se você aceitar o nosso convite, um pouco do seu sangue e saliva serão colhidos para confirmar por qual vírus você está infectado. Uma pessoa experiente e treinada coletará aproximadamente 5mL (mais ou menos uma colher de chá) de sangue com seringa e agulha fina. A saliva, aproximadamente 1mL (meia colher de café), será colhida também por pessoa treinada através de aspiração diretamente da boca com um tubinho (pipeta) plástico. Todo o material a ser utilizado é descartável. Nas amostras colhidas faremos dois exames: Um chamamos de PCR (que é a abreviação para Reação em Cadeia da Polimerase) onde procuraremos o vírus da chikungunya, da dengue e da Zika no material que você nos doará; O outro chamamos de sorologia e procuramos os anticorpos que você produziu contra estes vírus.

Uma nova amostra de sangue será necessária para realização dos mesmos exames 15 dias após a coleta desta primeira amostra para medir como você reagiu à doença. Vamos ligar para você e iremos à sua casa para colher esta outra amostra de sangue. Todas as amostras de sangue e saliva serão estocadas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames de chikungunya, dengue e Zika. Na coleta de sangue é esperado um pequeno desconforto pela agulha, mas ela é fina, apropriada para cada idade e a coleta será feita de modo muito cuidadoso. Poderá ficar uma pequena marca levemente arroxeadas no local, mas para evitar isto será feito um pequeno curativo com material esterilizado. A participação não lhe trará nenhum gasto.

O benefício imediato que você terá neste estudo é a confirmação se está infectado(a) ou não com algum desses vírus e assim receber o tratamento que for mais adequado. Sua participação neste estudo também possibilitará o desenvolvimento de métodos específicos de diagnóstico para a chikungunya, a dengue e a Zika que futuramente ajudará outras pessoas com doenças febris. Após o estudo, os resultados serão divulgados a todas as pessoas que possam ser beneficiadas com esse conhecimento e também serão publicados na comunidade científica, mas você não será identificado.

Você será informado(a) sobre os resultados dos exames realizados. Sinta-se à vontade para perguntar, pedir informações sobre a pesquisa e esclarecer suas dúvidas, para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores responsáveis através dos telefones e endereços que estão no fim deste termo.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu desistir a qualquer momento e não há nenhum problema se isso acontecer.

Este estudo não muda nenhum tratamento de rotina recomendado pelo seu médico. Você não renuncia a nenhum direito legal ao assinar este termo de consentimento.

Se você tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você), tiver entendido as informações e concordar voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo. Você receberá uma via deste termo e a outra ficará guardada no arquivo dos pesquisadores responsáveis. O endereço dos pesquisadores é: Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Via do Café, s/n-14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo Brasil. Telefone: (16) 3315-0246 e (16) 3315-4510.

_____
Prof .Dr Victor Hugo Aquino Quintana
(16) 3315-4510 / (16) 99992-8048

_____
Veronica Lippi Oliveira da Silva
(16) 3315-0246 / (16) 98816-6097

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP, Ribeirão Preto – SP. Fone (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Consentimento do(a) Participante de Pesquisa

Eu, _____, telefone: (   ) _____
após tomar conhecimento da pesquisa “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”, entendi e concordo em participar como voluntário(a), doando amostras de sangue e saliva para fins de pesquisa científica. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre a pesquisa, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me cause qualquer prejuízo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do(a) participante

APÊNDICE D – TCLE de participantes sadios.

1

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO - USP
LABORATORIO DE VIROLOGIA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

NOME DA PESQUISA: “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA – Orientador

VERONICA LIPPI OLIVEIRA DA SILVA - Mestranda

Gostaria de convidá-lo(a) e solicitar a sua autorização para participação de um estudo sobre o diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika. Os vírus que causam a chikungunya, a dengue e a Zika circulam ao mesmo tempo e nas mesmas regiões no Brasil. Existe grande dificuldade de diagnosticar e diferenciar estas doenças porque elas tem sintomas muito parecidos, é de grande interesse o desenvolvimento de métodos de diagnóstico que sejam específicos para essas doenças. O diagnóstico rápido e correto do vírus causador é importante para o tratamento eficiente do paciente e de medidas de prevenção às epidemias.

Se você está se sentindo bem, não tem suspeita de estar infectado(a) com o vírus da chikungunya, da dengue ou da Zika, é vacinado(a) contra a febre amarela e/ou já esteve doente por dengue no passado, poderá contribuir com nossa pesquisa participando do grupo de controle e ajudando no desenvolvimento de métodos de diagnósticos que diferencie o vírus da dengue do vírus da Zika ou da chikungunya com mais eficácia. Se você aceitar o nosso convite em participar desta pesquisa um pouco do seu sangue e saliva serão colhidos por uma pessoa experiente e treinada. Serão coletados aproximadamente 5mL (mais ou menos uma colher de chá) de sangue com seringa e agulha fina. A saliva, aproximadamente 1mL (meia colher de café), será colhida também por pessoa treinada através de aspiração diretamente da boca com um tubinho (pipeta) plástico. Todo o material a ser utilizado é descartável. Nas amostras colhidas faremos dois exames: Um chamamos de PCR (que é a abreviação para Reação em Cadeia da Polimerase) onde procuraremos o vírus da chikungunya, da dengue e da Zika no material que você nos doará; O outro chamamos de sorologia e procuramos os anticorpos que você produziu contra estes vírus.

Todas as amostras de sangue e saliva serão estocadas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames de chikungunya, dengue e Zika. Na coleta de sangue é esperado um pequeno desconforto pela agulha, mas ela é fina, apropriada para cada idade e a coleta será feita de modo muito cuidadoso. Poderá ficar uma pequena marca levemente arroxeadas no local, mas para evitar isto será feito um pequeno curativo com material esterilizado. A participação não lhe trará nenhum gasto.

Você não terá benefício direto neste estudo, porém você dará grande contribuição ao desenvolvimento de exames específicos para diagnosticar as doenças do chikungunya, da dengue e do Zika em outras pessoas. Após o estudo, os

resultados serão divulgados a todas as pessoas que possam ser beneficiadas com esse conhecimento e também serão publicados na comunidade científica, mas você não será identificado(a).

Você será informado(a) sobre os resultados dos exames realizados. Sinta-se à vontade para perguntar, pedir informações sobre a pesquisa e esclarecer suas dúvidas, para isso, basta entrar em contato com os pesquisadores responsáveis através dos telefones e endereços que estão no fim deste termo.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu desistir a qualquer momento e não há nenhum problema se isso acontecer.

Você não renuncia a nenhum direito legal ao assinar este termo de consentimento.

Se você tiver lido o termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você), tiver entendido as informações e concordar voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo. Você receberá uma via deste termo e a outra ficará guardada no arquivo dos pesquisadores responsáveis. O endereço dos pesquisadores é: Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), Via do Café, s/n-14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo Brasil. Telefone: (16) 3315-0246 e (16) 3315-4510.

_____
Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
(16) 3315-4510 / (16) 99992-8048

_____
Veronica Lippi Oliveira da Silva
(16) 3315-0246 / (16) 98816-6097

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP, Ribeirão Preto – SP. Fone (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

Consentimento do(a) Participante de Pesquisa

Eu, _____, telefone: ( ) _____
após tomar conhecimento da pesquisa “Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”, entendi e concordo em participar como voluntário(a), doando amostras de sangue e saliva para fins de pesquisa científica. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) sobre a pesquisa, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso me cause qualquer prejuízo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do(a) participante

APÊNDICE E – TCLE para guarda de material.*TCLE Biorrepositório – p. 1*

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA GUARDA DE MATERIAL
(Armazenamento de Amostras Biológicas)

Você está sendo convidado a doar uma amostra do seu sangue e saliva, ou do menor sob sua responsabilidade, para a pesquisa intitulada **“Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”** e para futuras pesquisas científicas.

Se você for menor de 18 anos, tanto você quanto o(a) responsável por você deverão concordar em doar essas amostras clínicas.

A cada nova pesquisa com esse material, vocês serão procurados para receber explicações e autorizar ou não a utilização da amostra já guardada.

Se você concordar, uma pessoa experiente e treinada coletará 5mL (mais ou menos uma colher de chá) de sangue com seringa e agulha fina. A saliva, aproximadamente 1mL (meia colher de café), será colhida também por pessoa treinada através de aspiração diretamente da boca com um tubinho (pipeta) plástico. Todo o material a ser utilizado é descartável. Você pode sentir um pequeno desconforto pela picada da agulha, mas ela será feita de modo muito cuidadoso e às vezes pode formar uma pequena mancha arroxeadada no local da picada. As amostras serão levadas para o Laboratório de Virologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a realização dos exames necessários e guardadas para futuras pesquisas por no máximo 10 anos, com o nome de BIORREPOSITÓRIO “Banco de amostras de arbovírus” sob minha responsabilidade. As suas amostras e os seus dados serão identificados por um código para garantir o sigilo. Ao final deste tempo de armazenamento, as sobras das amostras serão jogadas fora.

Você pode desistir de participar a qualquer momento. Para isso, basta entrar em contato com o pesquisador principal responsável por esta pesquisa nos endereços constantes no final deste documento, para que eu possa retirar as suas amostras do Biorrepositório e elas poderão ser entregues à você, se assim desejar, ou jogadas fora após o seu consentimento por escrito.

Caso não concorde em doar as amostras ou desista de permitir que se guarde estas amostras, essa decisão não lhe trará qualquer penalização ou prejuízo do atendimento que lhe for prestado. Garanto que o resultado será dado só para você.

A doação dessas amostras nesse momento não lhe trará nenhum benefício. **Entretanto, você estará ajudando em pesquisas que poderão ajudar outras pessoas.**

Declaro que toda nova pesquisa, utilizando sua amostra biológica, será realizada somente após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP e com a sua autorização.

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
e-mail: vhugo@fcrp.usp.br
Telefone: (16) 3315-0246 / Celular (16) 99992-8048
Laboratório de Virologia FCFRP-USP

Consentimento do(a) Participante de Pesquisa

Se você for menor de 18 anos, deve preencher abaixo se concorda ou não em doar as amostras de sangue e saliva para a pesquisa **“Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”** e para as pesquisas futuras:

Eu _____

( ) concordo em doar   ( ) não concordo em doar.

_____
Assinatura do(a) participante
(menor de 18 anos)

Eu, _____,
maior de 18 anos, telefone: ( ) _____ ( ) participante da pesquisa ou ( ) responsável
pelo(a) menor _____, aceito
que ( ) as minhas amostras de sangue e saliva ou ( ) as amostras de sangue e saliva do(a) menor sob
minha responsabilidade, sejam utilizadas para a pesquisa **“Desenvolvimento de métodos para
diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika.”** e sejam guardadas pelo Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para fins de pesquisa científica. Declaro estar ciente de que a previsão de guarda do material é de no
máximo 10 (dez) anos.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

_____
Assinatura do(a) participante

_____
Assinatura do(a) responsável pelo(a) participante
menor de 18 anos

Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como participante de pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Avenida do Café, s/n, FCFRP/USP, CEP 14040-903, Ribeirão Preto – SP. Fone/Fax (16) 3315-4213 e-mail: cep@fcfrp.usp.br

ANEXO A - Fluxograma para classificação de risco de dengue.

Fonte: (Ministério Da Saúde, 2016).

ANEXO B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika

Pesquisador: Victor Hugo Aquino Quintana

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 59464816.4.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.845.548

Apresentação do Projeto:

Consultar parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Consultar parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Consultar parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Consultar parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados adequadamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam ao solicitado quanto às pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado ad referendum do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), em 01/12/2016. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA

Continuação do Parecer: 1.845.548

alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772445.pdf	16/11/2016 20:43:00		Aceito
Outros	Declaracao_de_Conclusao_de_Pendencias_versao_2.pdf	16/11/2016 20:42:04	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Aceite_CAPP_SMSRP.pdf	31/10/2016 22:53:54	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Conclusao_de_Pendencias.pdf	31/10/2016 22:48:53	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Carta_de_Solicitacao_de_Mudanca.jpeg	31/10/2016 22:47:52	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AquinoVH_CEP_FCFRP_2016_versao_2.pdf	31/10/2016 22:44:59	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores_FMRP_versao_2.jpg	31/10/2016 22:40:21	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores_FCFRP_versao_2.pdf	31/10/2016 22:39:25	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Dr_Tadeu.pdf	01/09/2016 16:45:45	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento.pdf	23/08/2016 15:47:07	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.pdf	23/08/2016 15:36:55	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorrepositorio.pdf	23/08/2016 15:34:50	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@cfcrp.usp.br

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DE RIBEIRÃO PRETO DA**

Continuação do Parecer: 1.845.548

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.pdf	23/08/2016 15:34:22	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Sintomaticos.pdf	23/08/2016 10:25:12	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado.pdf	22/08/2016 12:11:33	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_Dr_Harnoldo.pdf	22/08/2016 08:31:02	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	22/08/2016 08:13:38	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 01 de Dezembro de 2016

Assinado por:

Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Endereço: Avenida do café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP sobre emenda

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de métodos para diagnóstico de chikungunya, dengue e Zika

Pesquisador: Victor Hugo Aquino Quintana

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 59464816.4.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.007.788

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda para incluir novo centro de coleta de amostras clínicas.

Objetivo da Pesquisa:

Desenvolver métodos de RT-PCR para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika; identificar epítopos específicos do ZIKV nas proteínas E e NS1.3; desenvolver métodos de diagnóstico para detecção de anticorpos específicos e antígenos do ZIKV. Os objetivos não foram alterados em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram relatados adequadamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, a emenda justifica-se pela necessidade de ampliação da área de cobertura de coleta de amostras clínicas, com a inclusão da UBS Vila Virgínia como centro de coleta adicional. Essa inclusão se faz necessária devido aos baixos índices de ocorrências de doenças febris na USF Paulo Gomes Romeo, que foi o centro de coleta proposto originalmente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram devidamente apresentados. A solicitação está adequadamente instruída com os seguintes documentos:

- Ofício de "Declaração de Submissão de Emenda de Projeto na Plataforma Brasil", devidamente assinado pelos pesquisadores;

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.007.788

- Declaração da UBDS Vila Virgínia, assinada pelo gerente da Unidade Guilherme Gonçalves Conceição, autorizando o recrutamento de pacientes e a coleta de amostras de sangue e saliva para este projeto de pesquisa;
- Formulário da Plataforma Brasil devidamente preenchido com a inclusão do novo centro de coleta.

Recomendações:

Recomendo aprovação da emenda solicitada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusões: No Formulário da Plataforma Brasil, foram alterados os itens abaixo relacionados, para inclusão do novo centro de coleta:

1. Campo "Metodologia Proposta", página 4;
2. Campo "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador", página 5.

Não há pendências ou inadequações - emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

EMENDA aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) em sua 179ª reunião ordinária. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP/FCFRP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo CEP, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". O TCLE deve ser apresentado ao participante da pesquisa em documento impresso frente e verso e as assinaturas não devem ficar em folhas separadas do texto do TCLE. Cabe ao pesquisador responsável manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Avenida do Café s/nº		CEP: 14.040-903
Bairro: Monte Alegre		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3315-4213	Fax: (16)3315-4892	E-mail: cep@fcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-

Continuação do Parecer: 3.007.766

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_114807_3_E1.pdf	18/06/2018 11:05:37		Aceito
Outros	Submissao_Emenda_2018.pdf	18/06/2018 11:01:00	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_UBDS_Vila_Virginia_2018.pdf	18/06/2018 11:00:24	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Conclusao_de_Pendencias_versao_2.pdf	16/11/2016 20:42:04	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Aceite_CAPP_SMSRP.pdf	31/10/2016 22:53:54	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_de_Conclusao_de_Pendencias.pdf	31/10/2016 22:48:53	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Carta_de_Solicitacao_de_Mudanca.jpeg	31/10/2016 22:47:52	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AquinoVH_CEP_FCFRP_2016_versao_2.pdf	31/10/2016 22:44:59	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores_FMRP_versao_2.jpg	31/10/2016 22:40:21	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Pesquisadores_FCFRP_versao_2.pdf	31/10/2016 22:39:25	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Dr_Tadeu.pdf	01/09/2016 16:45:45	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Assentimento.pdf	23/08/2016 15:47:07	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.pdf	23/08/2016 15:36:55	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Biorepositorio.pdf	23/08/2016 15:34:50	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.pdf	23/08/2016 15:34:22	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Sintomaticos.pdf	23/08/2016 10:25:12	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento_detalhado.pdf	22/08/2016 12:11:33	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito
Outros	Declaracao_Dr_Harnoldo.pdf	22/08/2016	Veronica Lippi	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 3.007.788

Outros	Declaracao_Dr_Harnoldo.pdf	08:31:02	Oliveira da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	22/08/2016 08:13:38	Veronica Lippi Oliveira da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 08 de Novembro de 2018

Assinado por:

Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/rp

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-903

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-4213

Fax: (16)3315-4892

E-mail: cep@fcrp.usp.br

ANEXO D - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de dengue.

**PREFEITURA DA CIDADE
RIBEIRÃO PRETO**
SECRETARIA DA SAÚDE

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO

Divisão de Vigilância Epidemiológica
Departamento de Vigilância em Saúde

Data da Publicação: 15/02/2019

Dados Consolidados até dia 15/02/2019

Quadro 1: Casos **notificados (suspeitos)** de Dengue, segundo mês de início dos sintomas, em pacientes residentes de Ribeirão Preto / SP, nos anos, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Mês de Início dos Sintomas	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Janeiro	1.111	156	243	16.449	361	199	690
Fevereiro	3.921	225	638	21.227	424	195	664
Março	11.476	385	1.564	12.519	344	175	
Abril	8.496	529	2.441	5.270	164	133	
Maio	2.712	525	2.203	796	190	125	
Junho	514	336	974	116	89	72	
Julho	134	190	498	91	57	61	
Agosto	128	196	418	102	105	60	
Setembro	147	175	322	122	246	49	
Outubro	119	191	462	201	288	102	
Novembro	136	151	794	241	192	122	
Dezembro	162	131	2.610	228	145	199	
Total	29.056	3190	13.167	57.362	2.605	1.492	1.354

Fonte: Sinan Net - Sinan Online

Quadro 2: Casos **confirmados de Dengue**, segundo mês de início dos sintomas, em pacientes residentes de Ribeirão Preto / SP, nos anos, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Mês de Início dos Sintomas	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Janeiro	357	6	57	9.346	16	45	124
Fevereiro	1.340	28	166	13.319	14	37	73
Março	4.530	55	485	8.141	12	28	
Abril	4.935	94	1.143	3.554	4	42	
Maio	1.636	78	1.095	522	6	35	
Junho	273	43	442	70	2	17	
Julho	34	36	156	23	11	11	
Agosto	19	18	114	10	25	5	
Setembro	20	15	64	12	47	1	
Outubro	10	10	87	10	44	6	
Novembro	14	10	242	16	39	4	
Dezembro	11	5	638	20	26	15	
Total	13.179	398	4.689	35.043	246	246	197

Fonte: Sinan Net - Sinan Online

ANEXO E - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de chikungunya.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO
Divisão de Vigilância Epidemiológica
Departamento de Vigilância em Saúde

Data da Publicação: 15/02/2019
Dados Consolidados até dia 15/02/2019

Chikungunya

Quadro 4: Casos notificados (suspeitos) de Febre do Chikungunya, segundo mês de início dos sintomas, em pacientes residentes de Ribeirão Preto/SP, nos anos, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Mês de Início dos Sintomas	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Janeiro	0	0	53	10	14	25
Fevereiro	0	3	61	14	10	8
Março	0	0	15	34	7	
Abril	0	1	6	25	7	
Maio	0	3	6	30	9	
Junho	0	2	2	13	3	
Julho	0	2	2	12	5	
Agosto	0	1	2	19	5	
Setembro	0	4	1	25	3	
Outubro	2	1	2	17	5	
Novembro	2	2	0	19	5	
Dezembro	1	9	3	7	3	
Total	5	28	153	225	76	33

Fonte: SINAN Net – Sinan Online

Quadro 5: Casos confirmados de Febre do Chikungunya, segundo mês de início dos sintomas, em pacientes residentes de Ribeirão Preto / SP, nos anos, 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Mês de Início dos Sintomas	2015	2016	2017	2018	2019
Janeiro	0	3	0	0	1
Fevereiro	0	2	8	0	0
Março	0	0	16	1	
Abril	0	2	3	1	
Maio	0	2	4	1	
Junho	0	0	1	1	
Julho	1	0	2	0	
Agosto	0	0	2	1	
Setembro	1	0	1	1	
Outubro	0	0	1	2	
Novembro	0	0	2	0	
Dezembro	0	0	0	0	
Total	2	9	40	8	1

Fonte: SINAN Net – Sinan Online

Observação:

Casos confirmados importados da Bahia: 2 de 2015 e 1 de janeiro de 2016.
Os demais casos são autóctones.

ANEXO F - Boletim epidemiológico do departamento de vigilância em saúde para os casos de Zika.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO Divisão de Vigilância Epidemiológica Departamento de Vigilância em Saúde

Data da Publicação: 15/02/2019
Dados Consolidados até dia 15/02/2019

Quadro 8: Casos notificados (suspeitos) de Zika Vírus (incluindo Gestantes com Exantema), segundo mês de Notificação, de pacientes notificados em Ribeirão Preto / SP, ano de 2015, 2016, 2017, 2018 e 2019.

Mês de Início dos Sintomas	2015	2016	2017	2018	2019
Janeiro	0	445	24	8	14
Fevereiro	0	2.095	16	4	1
Março	0	1.800	15	12	
Abril	0	729	11	7	
Maio	1	240	8	4	
Junho	1	50	5	0	
Julho	0	26	3	5	
Agosto	0	15	19	2	
Setembro	0	29	9	1	
Outubro	0	40	11	3	
Novembro	8	17	8	2	
Dezembro	62	23	7	7	
Total	72	5.509	136	55	15

Fonte: Sistema de Notificação Online – SMS Ribeirão Preto / SinanNet - DATASUS

Quadro 9: Casos Notificados e Confirmados de Gestantes com Exantema, segundo mês início de sintomas, em pacientes residentes de Ribeirão Preto / SP, ano de 2016, 2017 e 2018

Mês de Início dos Sintomas	2016		2017		2018		2019	
	Notificados e Investigados	Confirmados	Notificados e Investigados	Confirmados	Notificados e Investigados	Confirmados	Notificados e Investigados	Confirmados
Janeiro	156	90	12	0	2	0	2	0
Fevereiro	302	169	5	0	4	0	0	0
Março	17	109	4	0	3	0		
Abril	87	48	6	0	1	0		
Maio	19	7	1	0	2	0		
Junho	9	6	2	0	0	0		
Julho	3	0	4	0	1	0		
Agosto	6	0	1	0	1	0		
Setembro	11	0	2	0	0	0		
Outubro	7	1	1	0	2	0		
Novembro	7	0	5	0	2	0		
Dezembro	6	5	1	0	2	0		
Total	800	428	44	0	18	0	2	0

Fonte: RESP – CEVESP

Obs.: Considerando que nos últimos dois anos não foram confirmados casos de infecção pelo vírus Zika em gestantes e consequentemente não ocorreu casos de síndrome congênita pelo vírus Zika, as planilhas com os casos de microcefalia foram retiradas do boletim. Caso seja detectada a recirculação do Zika em gestantes, a planilha será reapresentada.