

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ANIELLY FERREIRA DE BRITO

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAN-FLAVI PARA A
DETECÇÃO DE FLAVIVÍRUS COM IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO
BRASIL

RIO DE JANEIRO

2022

ANIELLY FERREIRA DE BRITO

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAN-FLAVI PARA A
DETECÇÃO DE FLAVIVÍRUS COM IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO
MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA DO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
COMO REQUISITO À OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM FORMAÇÃO DE PESQUISA BIOMÉDICA

PATRÍCIA ALVAREZ DA SILVA BAPTISTA

RIO DE JANEIRO

2022

Ficha Catalográfica

Brito, Anielly Ferreira de.

Desenvolvimento e padronização do ensaio PAN-FLAVI para a detecção de flavivírus com importância epidemiológica no Brasil. / Anielly Ferreira de Brito. – Rio de Janeiro:Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

92 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Alvarez da Silva Baptista.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional Formação para a Pesquisa Biomédica, 2022.

Referências: f.78-92.

1. Flavivirus. 2. RNA Viral. 3. Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa. 4. Monitoramento Epidemiológico. 5. Formação para a Pesquisa Biomédica - Tese. I. Baptista, Patrícia Alvarez da Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação Mestrado

"DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAN-FLAVI PARA A DETECÇÃO DE FLAVIVÍRUS COM IMPORTÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO BRASIL"

ANIELLY FERREIRA DE BRITO

DISSERTAÇÃO DE Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica
SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 06 de Dezembro de 2022.

DR^A. FLAVIA FONSECA BLOISE (DOUTORA - UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)

DR^A. PATRÍCIA ALVAREZ DA SILVA BAPTISTA (DOUTORA - UFRJ) - ORIENTADORA

DR. DIEGO ALLONSO RODRIGUES DOS SANTOS DA SILVA (DOUTOR - UFRJ)

DR. JOSÉ PROCÓPIO MORENO SENNA (DOUTOR - UFRJ) - REVISOR

g v.b

Documento assinado digitalmente:
FILIPE VIEIRA SANTOS DE ABREU
Data: 12/07/2022 09:02:44 -0300
Verificação em: <https://portal.ufrj.br>

DR. FILIPE VIEIRA SANTOS DE ABREU (DOUTOR - FIOCRUZ)

DR^A. MARISA DE OLIVEIRA RIBFIRO (DOUTORA - UFRJ)

*Esta dissertação é dedicada ao meu maior patrimônio:
meu esposo Daniel, aos meus filhos Gabriel e Rafael e
aos meus pais por todo amor, cuidado e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Senhor e meu Deus, por me dá saúde, capacidade e oportunidade de vivenciar essa experiência e ter colocado pessoas maravilhas em meu caminho, cujo as quais, sem elas, essa dissertação não existiria.

Ao meu esposo que sempre me apoiou e me ajudou a lutar por meus sonhos, aos meus filhos que são mais que um incentivo para que eu dê sempre o meu melhor, e aos meus pais e queridos amigos que sempre me motivaram a completar a missão.

Um agradecimento especial a Dra. Marcia Castro, por sua amizade e mentoria desde o início da minha trajetória científica, ao Dr. Ricardo Lourenço por todo ensinamento e confiança e a Dra. Teresa por todo apoio na reta final desta dissertação.

A minha orientadora Dra. Patrícia Alvarez, terei gratidão eterna, pois sem ela essa dissertação não aconteceria. Agradeço muito por ter me acolhido na hora que mais precisei, por todo ensinamento, paciência e exemplo.

Agradeço a toda equipe do LATED/Bio-Manguinhos: Alexandre Vicente, Beatriz Vasconcello, Daniele Rocha, Elaine Motta, Elisabete Ferreira, Marisa Ribeiro e Pedro Cardoso por toda acolhida, ajuda e amizade. Ao Alexandre Calazans, Antônio Gomes, Ana Paula Bezerra e Mônica Arruda pelo incentivo e contribuições.

Agradeço a toda equipe do LATHEMA/IOC: Alcione Rebelo, Alexandre Xavier, Aline Ferreira, Cristiane Vicente, Dinar Couto, Glauber Rocha, Ignez Lima, Jéssica Corrêa, Maycon Neves, Márcio Pavan, Marcelo Celestino, Marcelo Quintela, Mariana David, Mauro Meneses, Monique Motta, Nildimar Honório, Rafael de Freitas, Paulino Siqueira e Stephani Santos pela amizade, incentivo e compreensão. Sou grata também a amizade e parceria científica de Carolina Azevedo, Filipe Abreu, Ieda Ribeiro, Luciana Stanzani, Rafaella Miranda e Rosilainy Fernandes.

Não posso deixar de agradecer a Dra. Ana Bispo do LABFLA/IOC por me conceder algumas amostras para conclusão desta dissertação e a agradecer também a equipe e coordenação da Pós-graduação do MPT por todo suporte.

Para completar, um agradecimento especial as contribuições dadas a esta dissertação pela banca de prévia: Dra. Daniela Uziel, Dra. Flávia Barreto Dra., Nildimar Honório, e Dra. Mônica Arruda e pela banca da defesa: Dr. Diego Allonso, Dr. Filipe Abreu, Dra. Marisa Ribeiro, Dr. Rodrigo Brindeiro e ao revisor Dr. José Procópio.

*“Mesmo que tu já tenhas feito uma longa caminhada,
há sempre um caminho a fazer”*

Santo Agostinho

RESUMO

FERREIRA-DE-BRITO, Anielly. **Desenvolvimento e padronização do ensaio PAN-FLAVI para a detecção de flavivírus com importância epidemiológica no Brasil**. Dissertação (Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Os flavivírus geram grande preocupação para saúde pública no Brasil e no mundo, pois causam uma série de doenças aos homens e aos animais, implicando em questões sociais e econômicas. Os principais vírus circulantes no país, devido sua gravidade e potencial de disseminação, são os vírus da febre amarela, vírus Zika, vírus dengue e o vírus do Nilo Ocidental, porém existem outros flavivírus que também tem avançado para outras regiões, onde sua circulação não havia sido detectada ainda, causando novos surtos. Diante da necessidade de uma eficiente vigilância epidemiológica e da implementação de medidas de controle mais eficientes, é necessário melhorar o diagnóstico virológico em humanos, em hospedeiros vertebrados não-humanos e em artrópodes vetores. O presente trabalho teve como objetivo, através do desenvolvimento e padronização de um ensaio molecular com o uso de iniciadores e sondas gênero-específico (PAN-FLAVIVIRUS), ser capaz de realizar uma triagem com a detecção de vários membros do gênero de uma só vez, direcionando e auxiliando no diagnóstico espécie-específico. O presente ensaio foi capaz de detectar os flavivírus testados com especificidade, precisão e sensibilidade. As etapas do desenvolvimento seguiram os requisitos estabelecidos pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), visando a garantia da confiabilidade dos resultados obtidos. Este ensaio se destaca dos de outros PAN-FLAVIVIRUS, devido a todos os parâmetros analíticos analisados, além da diversidade de amostras utilizadas para testar o desempenho do ensaio.

Palavras-chave: Flavivírus; RT-qPCR; Vigilância.

ABSTRACT

FERREIRA-DE-BRITO, Anielly. Development and standardization of the PAN–FLAVI assay for the detection of epidemiologically important flaviviruses in Brazil. Dissertation (Professional Master's Degree in Biomedical Research), Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Flaviviruses generate great concern for public health in Brazil and in the world, as they cause a series of diseases to men and animals, resulting in social and economic issues. The main viruses circulating in the country, due to their severity and potential for dissemination, are the yellow fever virus, Zika virus, dengue virus and West Nile virus, but there are other flaviviruses that have also advanced to other regions, where their circulation does not had not yet been detected, causing new outbreaks. Faced with the need for efficient epidemiological surveillance and the implementation of more efficient control measures, it is necessary to improve virological diagnosis in humans, in non-human vertebrate hosts and in arthropod vectors. The present work aimed, through the development and standardization of a molecular assay with the use of primers and gender-specific probes (PAN-FLAVIVIRUS), to be able to carry out a screening with the detection of several members of the genus at once , directing and assisting in the species-specific diagnosis. The present assay was able to detect the tested flaviviruses with specificity, precision and sensitivity. The development stages followed the requirements established by the Health Surveillance Agency (ANVISA), aiming to guarantee the reliability of the results obtained. This assay stands out from other PAN-FLAVIVIRUS due to all the analytical parameters analyzed, in addition to the diversity of samples used to test the performance of the assay.

Keywords: *Flavivirus*; RT-qPCR; Surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemáticas de possíveis ciclos de transmissão vetorial de arbovírus.	19
Figura 2. Exemplo da estrutura viral dos flavivírus a partir do vírus Zika.....	23
Figura 3. Representação esquemática do genoma dos flavivírus, com setas indicando os sítios de clivagem.....	23
Figura 4. Figura esquemática do ciclo de vida dos flavivírus.	24
Figura 5. Mapa mostra a distribuição global de quatro flavivírus (transmissão local atual ou passada). Pequenos quadrados referem-se ao período da primeira detecção documentada em humanos (introdução do vírus).....	25
Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada na dissertação.....	39
Figura 7. Gráfico do ensaio PAN-FLAVI com a ciclagem do artigo (tabela 2).....	50
Figura 8. Gráfico do ensaio PAN-FLAVI com a ciclagem ZDC modificada (tabela 2).....	50
Figura 9. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio com o sistema Flavi P P1.S1....	51
Figura 10. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio com o sistema Flavi P P2.S1..	51
Figura 11. Perfil da curva de plasma negativo após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.....	52
Figura 12. Perfil da curva de YFV após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR..	52
Figura 13. Perfil da curva de ZKV após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.	52
Figura 14. Perfil da curva de WNV após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR	52
Figura 15. Perfil da curva de DENV-1 após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.	52
Figura 16. Perfil da curva de DENV-2 após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR	52

Figura 17. Perfil da curva de DENV-3 após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.	53
Figura 18. Perfil da curva de DENV-4 após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.	53
Figura 19. Gráfico da curva de PCR em tempo Real do ensaio de especificidade do sistema de PAN-FLAVI: A: curva do controle positivo (DENV 4) em azul.....	54
Figura 20. Gráfico da curva de PCR em tempo Real do ensaio de especificidade a outros patógenos, como: CHIKV, MAYV, HIV, HCV, HBV, Inf A e Inf B e SARC-COV-2. Controle positivo: DENV 4.	55
Figura 21. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 1 do teste de repetibilidade. ...	61
Figura 22. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 2 do teste de repetibilidade. ...	61
Figura 23. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 3 do teste de repetibilidade. ...	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Vetores e ocorrência dos flavivírus (DENV, ZIKV, YFV, ILHEV, ROCV, SLEV, WNV) que circulam no Brasil.....	26
Quadro 2. Culturas virais utilizadas nos ensaios de desenvolvimento e validação do sistema PAN-FLAVI.....	41
Quadro 3. Listagem de referências bibliográficas consultadas para a escolha de sequências conservadas dos flavivírus.....	41
Quadro 4. Sequências dos iniciadores e sondas PAN-FLAVI desenhados para RT-PCR em tempo real.	47
Quadro 5. Conjuntos de iniciadores e sondas desenhados para formação do sistema de RT-qPCR PAN-FLAVI.	48
Quadro 6. Resultados dos testes realizados com os conjuntos de iniciadores e sondas para formação do sistema PAN-FLAVI.....	48
Quadro 7. Sequências de iniciadores e sondas utilizados para formação dos conjuntos testados no ensaio PAN-FLAVI (P1.S1-S2 e P2.S1-S2).	49
Quadro 8. Composição dos conjuntos de iniciadores testados no ensaio PAN-FLAVI (P1.S1-S2 e P2.S1-S2).....	49
Quadro 9. Mapa de aplicação de amostras do teste de especificidade para o sistema PAN-FLAVI.	53
Quadro 10. Mapa de aplicação do ensaio de especificidade ou reação cruzada do sistema PAN-FLAVI para outros patógenos.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação da concentração de iniciadores e sondas utilizados no ensaio de RT-qPCR do PAN-FLAVI.....	44
Tabela 2. As ciclagens testadas no termociclador nos ensaios para validação do sistema PAN-FLAVI.	45
Tabela 3. Reagentes da mistura de PCR para o sistema PAN-FLAVI.....	51
Tabela 4. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de ZIKV com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição	55
Tabela 5. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de YFV com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.	56
Tabela 6. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-1 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.	57
Tabela 7. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-2 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.	57
Tabela 8. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-3 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.	58
Tabela 9. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-4 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.	59

Tabela 10. Resultados do <i>Probit</i> com positividade de 50% e 95%, para amostras de ZIKA, FA, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os valores estão expressos em PFU/mL.	59
Tabela 11. Teste de Repetibilidade do Ensaio PAN-FLAVI com os vírus ZIKV, YFV, DENV1 a DENV-4 e WNV. Média em Ct dos 3 ensaios, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos vírus testados.....	60
Tabela 12. Análise de substâncias interferentes na amplificação dos alvos do ensaio PAN-FLAVI: Ct dos alvos DENV-1 e DENV-4.....	62
Tabela 13. Resultado das amostras de YFV comparando o sistema PAN-FLAVI com o método in house de Domingo C., et al. 2012. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.....	64
Tabela 14. Resultado das amostras de DENV comparando o sistema PAN-FLAVI com o Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.	65
Tabela 15. Resultado das amostras de ZIKV comparando o sistema PAN-FLAVI com o Kit molecular ZDC Bio-Manguinhos. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.....	68
Tabela 16. Resultado das amostras de SLEV, ILHV e WNV utilizando o sistema PAN-FLAVI de RT-qPCR..	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSQV - Vírus Bussuquara

cDNA – DNA complementar

CHIKV – Vírus Chikungunya

Cp – cópias

CPCV -Vírus Cacipacoré

Ct – Cycle Threshold

DENV – Vírus Dengue

DENV-1 – Vírus Dengue sorotipo 1

DENV-2 – Vírus Dengue sorotipo 2

DENV-3 – Vírus Dengue sorotipo 3

DENV-4 – Vírus Dengue sorotipo 4

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPR – Desvio padrão relativo

EEV - vírus da Encefalite Equina do Leste

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GBS - síndrome de Guillain-Barré

IGUV - Vírus Iguape

ILHV – Vírus Ilhéus

Kb – Quilobase

LABFLA - Laboratório de Flavivírus

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

LATED - Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LATHEMA – Lab. de Mosquitos Transmissores de Hematozoários

LOD – limite de detecção

MAYV – Vírus Mayaro

Min – minutos

mL – mililitro

MS – Ministério da saúde

ND – não detectável

NJLV - Vírus Naranjal

OMS - Organização mundial da saúde

ORF – quadro aberto de leitura

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFU – unidade formadora de placa

PN – plasma negativo

POP - procedimento operacional padrão

PRNT – de neutralização por redução de placas

RNA – ácido ribonucleico

ROCV - Vírus Rocio

rpm – rotações por minuto

RT-qPCR – Transcrição reversa seguido da reação em cadeia da polimerase em tempo real

SEPLA - Seção de processamento de plasma

SLEV – Vírus da encefalite de Saint Louis

SLEV - Vírus da encefalite de Saint Louis

Tm – temperatura de anelamento

uL - microlitro

WNV – Vírus da febre do Nilo Ocidental

FNO - Febre do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da Febre amarela

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1.	Introdução	18
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVIRUS	18
1.1.1	Ciclo de transmissão dos arbovírus	18
1.2	FLAVIVÍRUS.....	21
1.2.1	Taxonomia.....	21
1.2.2	Características moleculares dos flavivírus	22
1.2.3	Estrutura e Ciclo de vida do flavivírus:.....	23
1.2.4	Distribuição dos flavivírus	25
1.2.5	Os flavivírus de importância à saúde pública no Brasil	26
1.2.5.1	Dengue	26
1.2.5.2	Zika	28
1.2.5.3	Febre do Nilo Ocidental	30
1.2.5.4	Febre Amarela.....	31
1.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	32
1.3.1	Parâmetros analíticos.....	35
1.4	JUSTIFICATIVA	36
2	Objetivo.....	38
2.1	OBJETIVO GERAL:.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	38
3	Materiais e Métodos.....	39
3.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO E DIRETRIZES	39
3.2	AMOSTRAS.....	40
3.2.1	Amostras de plasma humano negativo	40
3.2.2	Vírus de cultura e amostras positivas	40
3.3	DESENHO DE INICIADORES E SONDAS <i>TaqMan</i> [®] :.....	41
3.4	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	43
3.5	RT-qPCR	43
3.6	PARÂMETROS DE ANÁLISE DA RT-qPCR	45
3.7	CRITÉRIOS DE ANÁLISE DO SISTEMA PAN-FLAVI	45
4	Resultados	46
4.1	DEFINIÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ALVO	46
4.2	PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAN FLAVI.....	51
4.3	CRITÉRIOS DE ANÁLISE	53

4.3.1	Especificidade.....	53
4.3.2	Sensibilidade do Sistema PAN-FLAVI.....	55
4.3.3	Repetibilidade.....	60
4.3.4	Interferentes	62
4.3.5	Resultado das Amostras testadas com o sistema PAN-FLAVI.....	63
5	Discussão.....	71
6	Conclusões	78
7	Referências.....	79

1. Introdução

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVIRUS

As arboviroses são doenças causadas por Arbovírus (ar = *arthropod* + bo= *borne* + *viruses*) que se replicam nos artrópodes vetores e são transmitidos aos vertebrados suscetíveis (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Esses vírus geram grande preocupação para saúde pública mundial, implicando num grande fardo social e econômico, pois causam uma série de doenças não só aos homens, mas também aos animais, resultando em grandes desafios na sua prevenção e controle (GIRARD; NELSON; PICOT; GUBLER, 2020).

Considerando-se o histórico das arboviroses emergentes, percebemos que algumas causaram epidemias globalmente, principalmente em áreas tropicais, como resultado do impacto do aumento da densidade populacional humana por meio da urbanização. Outros aspectos interferem na disseminação das arboviroses pelo mundo, tais como o desenvolvimento de sistemas de transporte globais, as mudanças climáticas, e outros fatores que vêm facilitando a mudança nos padrões de interação vírus-vetor-hospedeiro vertebrado, durante os últimos séculos (GOULD; PETTERSSON; HIGGS; CHARREL *et al.*, 2017; GUBLER, 2002; GUZMÁN; CALDERÓN; MATTAR; TADEU-FIGUEREIDO *et al.*, 2020).

Estima-se que haja mais de 534 espécies de arbovírus, dentre este quantitativo, 150 são relacionadas a doenças humanas, sendo a maioria zoonóticas. Essas espécies foram identificadas e inseridas no Catálogo Internacional de Arbovírus Incluindo Certos Outros Vírus de Vertebrados (CDC, 2022a; KARABATSOS, 1985).

A maioria dos arbovírus de importância para a saúde pública pertence a cinco famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (OMS, 1985). Os de maior relevância no Brasil são pertencentes aos gêneros *Flavivirus* (família *Flaviviridae*) e *Alphavirus* (família *Togaviridae*). Destacam-se as arboviroses Dengue, Zika, Febre Amarela e Chikungunya, por sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação em áreas urbanas, diretamente envolvidas no cenário epidemiológico atual do Brasil (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; LIMA-CAMARA, 2016; SVS, 2018; 2022c).

1.1.1 Ciclo de transmissão dos arbovírus

O ciclo natural dos arbovírus se inicia a partir da replicação em vetores artrópodes hematófagos, seguida de transmissão para hospedeiros vertebrados durante a alimentação de

sangue. O vírus se replica em vertebrados susceptíveis e, posteriormente, passa a circular em sua corrente sanguínea. Quando ocorre viremia elevada, diz-se que o vertebrado é um eficaz hospedeiro amplificador, no qual os repastos sanguíneos feitos por artrópodes susceptíveis resultam na infecção, disseminação e transmissão do vírus a outro vertebrado, após um período de incubação extrínseco (WEAVER; BARRETT, 2004).

A maioria dos arbovírus patogênicos aos humanos é transmitido por mosquitos ou carrapatos. Tais arbovírus são inicialmente mantidos em um ciclo enzoótico silvestre envolvendo geralmente roedores, pássaros ou primatas não humanos como hospedeiros reservatórios/amplificadores. Alguns desses vírus podem atingir maior amplificação em animais domésticos dentro de uma epizootia rural. Outros podem alterar sua gama de hospedeiros, de primatas não humanos a humanos, levando ao ciclo de transmissão urbana ou epidêmico. Como demonstrado na Figura 1 (WEAVER; BARRETT, 2004)

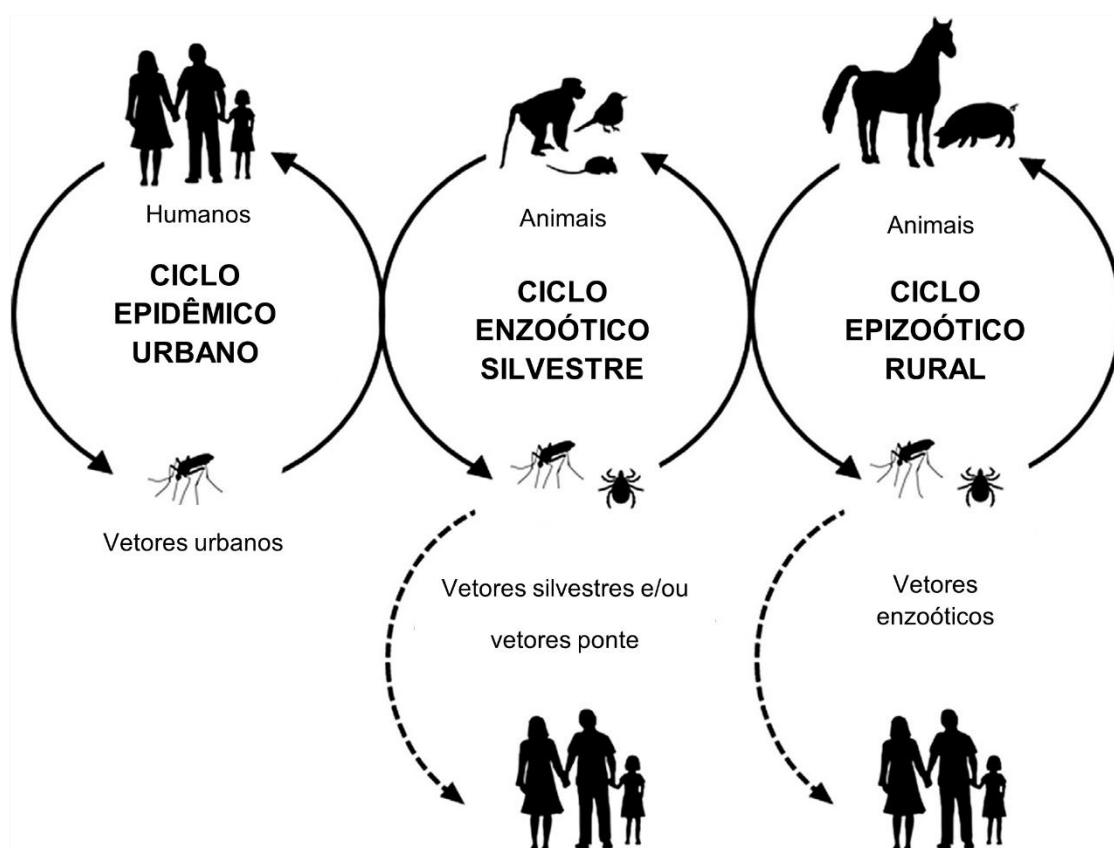


Figura 1. Representação esquemática de possíveis ciclos de transmissão vetorial de arbovírus. Fonte: adaptado de (ANEZ; CHANCEY; GRINEV; RIOS, 2012)

O transbordamento do ciclo enzoótico, chamado de *spillover*, pode se iniciar através da picada acidental em humanos por vetores enzoóticos e/ou vetores ponte, como no caso do Vírus da Febre Amarela (YFV) (WEAVER; BARRETT, 2004). Outras formas de transmissão para o

homem ocorre quando: humanos adentram ambientes silvestres onde o ciclo enzoótico ocorre, como no caso do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) (FIGUEIREDO, 2000); quando há participação de vetores silvestres e/ou periurbanos como pontes de transmissão, como no caso do vírus do Nilo Ocidental (WNV) e do vírus da Encefalite Equina do Leste (EEV) (ARMSTRONG; ANDREADIS, 2010; MEDLOCK; SNOW; LEACH, 2005); quando certos arbovírus têm a capacidade de amplificar a transmissão ao explorar animais peridomésticos, como suínos e equinos, aumentando o *spillover* e causando surtos ou epidemias em ambientes rurais (CHEN; TESH; RICO-HESSE, 1990), ou até mesmo a divergência evolutiva de vírus permitindo que este passe de um ciclo silvestre para explorar uma nova gama de hospedeiros em ciclos urbanos, como no caso dos DENV (WANG; NI; XU; BARRETT *et al.*, 2000; WEAVER; CHARLIER; VASILAKIS; LECUIT, 2018).

Para que ocorra a transmissão biológica de um arbovírus, o artrópode vetor precisa ingerir partículas virais durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado em período virêmico. Após um período de incubação variável, chamado de período de incubação extrínseco, o vetor se torna capaz de transmitir o arbovírus para um hospedeiro suscetível (CLEMENTS, 2012). Durante o período de incubação extrínseco, as partículas virais ingeridas precisam chegar ao intestino médio do vetor e invadir as células do epitélio, para iniciar a replicação viral. As novas partículas virais, então, são liberadas na hemocele do artrópode vetor e são carregadas pela hemolinfa, para aderirem a diversos tecidos, órgãos e sistemas do inseto (CLEMENTS, 2012). Diz-se que a eficiência de disseminação de um arbovírus ocorre quando este consegue ser detectado em partes ou sessões do corpo do vetor (como pernas, asas, cabeça). A competência vetorial é avaliada quando o vírus ativo é encontrado na saliva do vetor (FERNANDES, 2017; VEGA-RÚA; ZOUACHE; GIROD; FAILLOUX *et al.*, 2014).

Outras formas de transmissão, ainda que de menor importância, também são responsáveis pela manutenção dos arbovírus na natureza: transmissão vertical (por via transovariana) e horizontal (via sêmen infectado do macho, ou de fêmea para macho) (CLEMENTS, 2012). Na transmissão vertical, o arbovírus multiplica-se e invade diversos tecidos do inseto fêmea, podendo atingir seus ovários e, conseqüentemente, infectar os ovos. Uma das modalidades deste tipo de transmissão é a transovariana, a qual ocorre quando os oócitos dentro do ovário da fêmea são infectados por partículas virais, a partir da qual parte da prole já nascerá infectada (CLEMENTS, 2012; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994).

1.2 FLAVIVÍRUS

1.2.1 Taxonomia

O termo *Flaviviridae* é denominado do latim “*flavus*” (amarelo) devido a icterícia característica causada pela infecção do YFV (CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 1990), sendo o vírus protótipo desta família. A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (SIMMONDS; BECHER; BUKH; GOULD et al., 2017).

O gênero de maior abundância, é o *Flavivirus*, que possui atualmente 53 espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV). Dentre estas, 27 são flavivírus transmitidos por mosquitos, 12 são transmitidos por carrapatos e 14 são agentes zoonóticos com vetor desconhecido. Além destes, existem os vírus não classificados, tais como os flavivírus específicos de insetos (SIMMONDS; BECHER; BUKH; GOULD et al., 2017).

Até o momento foram detectados os seguintes flavivírus patogênicos no Brasil: Vírus da Febre Amarela, Vírus Dengue 1, 2, 3 e 4, ZIKV, SLEV, Vírus Rocio (ROCV), WNV, Vírus Ilhéus, Vírus Bussuquara (BSQV), Vírus Iguape (IGUV), Vírus Cacipacoré (CPCV), Vírus Naranjal (NJLV) (CASSEB; CASSEB; SILVA; VASCONCELOS, 2013; CUNHA, 2018; DE SOUZA LOPES; DE ABREU SACCHETTA; FRANCY; JAKOB et al., 1981; FIGUEIREDO, 2000) e os flavivírus de insetos: Vírus *Culex* flavivírus, Vírus Nhumirim e o Vírus Guapiaçú (DE OLIVEIRA RIBEIRO; DA COSTA; GILL; RIBEIRO et al., 2021; MACHADO; MONDINI; DOS SANTOS SANTANA; YONAMINE et al., 2012; MACHADO; MONDINI A FAU - DOS SANTOS SANTANA; DOS SANTOS SANTANA V FAU - YONAMINE; YONAMINE PT FAU - CHIARAVALLOTI NETO et al., 2012; PAUVOLID-CORRÊA; SOLBERG; COUTO-LIMA; KENNEY et al., 2015).

Os flavivírus podem ser divididos em quatro grupos com base em nichos ecológicos e análises filogenéticas: transmitidos por mosquitos, transmitidos por carrapatos, específicos de insetos e de vetores não conhecidos (COOK; BENNETT; HOLMES; DE CHESSE et al., 2006; GOULD; DE LAMBALLERIE; ZANOTTO; HOLMES, 2003). Os vírus transmitidos por artrópodes, veiculados por mosquitos e por carrapatos, são capazes de se replicar em células de vertebrados e invertebrados (COOK; BENNETT; HOLMES; DE CHESSE et al., 2006). Os flavivírus específicos de insetos são capazes de se replicar apenas em células de invertebrados

e foram isolados de linhagens de células de insetos e de numerosas espécies de mosquitos coletados em campo (LOBO; MOTA; PENA; AZEVEDO *et al.*, 2009).

Os flavivírus de vetores não conhecidos são um grupo parafilético, contendo vírus que só foram encontrados infectando hospedeiros vertebrados (GAUNT; SALL; LAMBALLERIE; FALCONAR *et al.*, 2001).

Os diferentes modos de transmissão de flavivírus estão fortemente correlacionados com a filogenia (COOK; BENNETT; HOLMES; DE CHESSE *et al.*, 2006), fornecendo informações valiosas sobre as relações patógeno-vetor. O grupo dos flavivírus transmitidos por mosquitos pode ser dividido em duas categorias distintas. A primeira categoria contém os vírus neurotrópicos, associados à doença encefálica em humanos. Estes vírus são mantidos em ciclos de transmissão mais associados às espécies de mosquitos do gênero *Culex* e pássaros reservatórios/amplificadores (GAUNT; SALL; LAMBALLERIE; FALCONAR *et al.*, 2001).

A segunda categoria contém os vírus não neurotrópicos, que são mantidos em ciclos de transmissão envolvendo frequentemente espécies de mosquitos do gênero *Aedes* e primatas. Os não neurotrópicos estão mais associados a manifestações clínicas hemorrágicas em humanos. Essas correlações fornecem evidências da importância das espécies vetoras, de hospedeiros e de amplificadores na evolução dos flavivírus (GAUNT; SALL; LAMBALLERIE; FALCONAR *et al.*, 2001).

Como os flavivírus são vírus com genoma RNA (ácido ribonucleico), demonstram taxas de mutação mais altas e menos conservadas geneticamente em comparação aos vírus com genoma DNA (ácido desoxiribonucleico), por causa de sua DNA polimerase propensa a erros e à falta de capacidade de reparo (HOLLAND; DOMINGO, 1998). Isso fornece aos vírus de RNA um mecanismo para se adaptar às restrições seletivas impostas por diferentes ambientes, e por distintas espécies de vetores e de hospedeiros vertebrados. Os componentes dos ciclos de transmissão de arbovírus também contribuem para a sua variação genética (GOULD; DE LAMBALLERIE; ZANOTTO; HOLMES, 2003).

1.2.2 Características moleculares dos flavivírus

Esses vírus são caracterizados por um genoma RNA de fita simples, sentido positivo, com tamanho de 11 kb aproximadamente e constituído por um único quadro de leitura aberto (*open reading frame* - ORF), flanqueado por uma região não traduzida (UTR) nos terminais 5' e 3' (LANCIOTTI; KERST; NASCI; GODSEY *et al.*, 2000). A partícula viral mede de 40 a 60

nm de diâmetro, possui um capsídeo proteico (C) com simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico onde estão inseridas as proteínas de membrana (M) e a glicoproteína de superfície (E) (Figura 2 e 3).

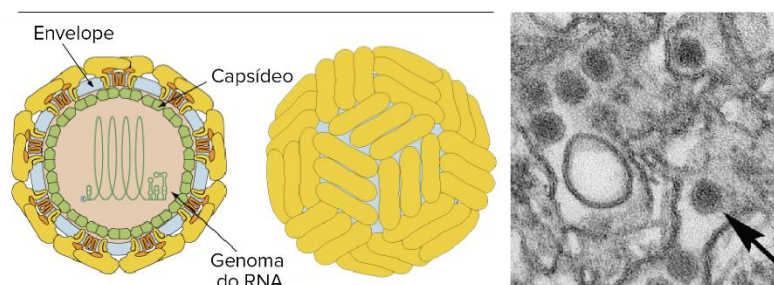


Figura 2. Exemplo da estrutura viral dos flavivírus a partir do vírus Zika.
Fonte: (A biologia do vírus Zika, 2016)

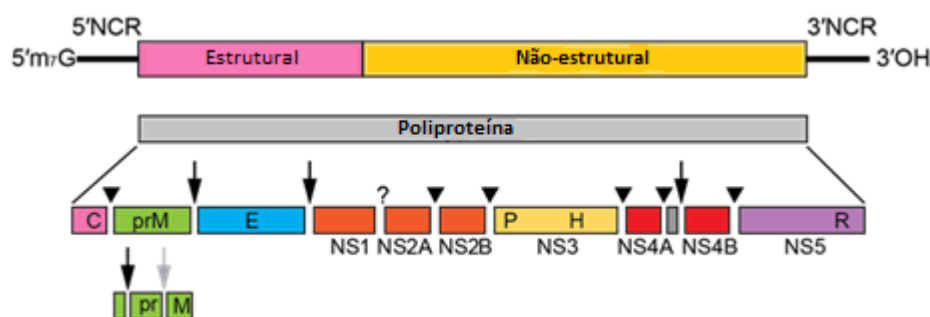


Figura 3. Representação esquemática do genoma dos flavivírus, com setas indicando os sítios de clivagem. Legenda: UTR – região não-codificadora de proteínas (*untranslated region*); C – região codificadora da proteína do capsídeo; prM – região codificadora da proteína precursora de membrana; E - região codificadora da proteína do envelope; NS1 - região codificadora da proteína não-estrutural 1; NS2A - região codificadora da proteína não-estrutural 2A; 2B - região codificadora da proteína não-estrutural 2B; NS3 - região codificadora da proteína não-estrutural 3; 4A - região codificadora da proteína não-estrutural 4A; NS4B - região codificadora da proteína não-estrutural 4B; NS5 - região codificadora da proteína não-estrutural 5; MTase – região codificadora da enzima metiltransferase; RpRd – região codificadora da RNA polimerase RNA-dependente (RpRd). Fonte: Adaptado de ICTV (2020)

O genoma é codificado em três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína pré-M e a proteína E do envelope. Além destas, o genoma codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que desempenham funções reguladoras e de expressão do vírus, como a replicação, virulência e patogenicidade (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

1.2.3 Estrutura e Ciclo de vida do flavivírus:

O ciclo viral dos flavivírus se inicia a partir da ligação dos vírions à superfície de uma célula hospedeira. Posteriormente entram na célula por endocitose mediada por receptor. A acidificação da vesícula endossômica desencadeia mudanças conformacionais no vírion, tais como a fusão das membranas viral e celular e a desmontagem das partículas virais. Após a

liberação do genoma no citoplasma, o RNA é traduzido em uma única poliproteína, que é processada por proteases virais e do hospedeiro (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; PIERSON; KIELIAN, 2013).

A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares e a montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado brotam no lúmen do RE. As partículas virais e subvirais imaturas são transportadas através do complexo de Golgi, onde são processadas por proteases celulares e pela serina protease, originando as proteínas estruturais e não estruturais maduras. As partículas subvirais também são clivadas pela furina protease. Víriões maduros e partículas subvirais são subsequentemente liberados por exocitose. Esquema representado na Figura 4 (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; PIERSON; KIELIAN, 2013).

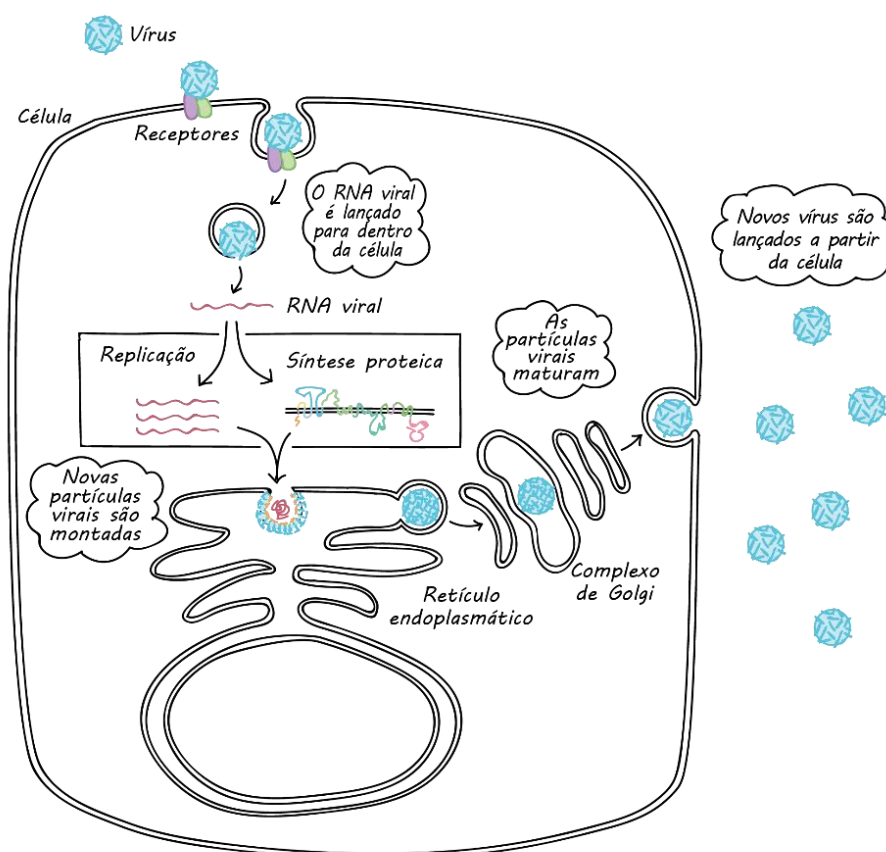


Figura 4. Figura esquemática do ciclo de vida dos flavivírus. Fonte: (A biologia do vírus Zika, 2016)

1.2.4 Distribuição dos flavivírus

Os flavivírus têm uma ampla distribuição geográfica mundial, estando presentes em praticamente qualquer ecossistema onde seja possível a presença de artrópodes vetores. Entretanto algumas espécies são restritas a áreas endêmicas ou epidêmicas específicas. Como exemplo podemos citar o YFV que é mais presente em regiões tropicais e subtropicais; o DENV, circulante em áreas mais tropicais da Ásia, Oceania, África, Austrália, Europa e Américas (BELLONE; FAILLOUX, 2020; PIERSON; DIAMOND, 2020). Mais precisamente, nos últimos 30 anos, os vírus transmitidos por vetores expandiram dramaticamente sua faixa de distribuição, causando epidemias cada vez mais frequentes e maiores, como ZIKV, DENV, YFV e WNV, que foram responsáveis por milhões de casos humanos com significativa morbidade e mortalidade na última década, conforme demonstrado na Figura 5 (BELLONE; FAILLOUX, 2020).

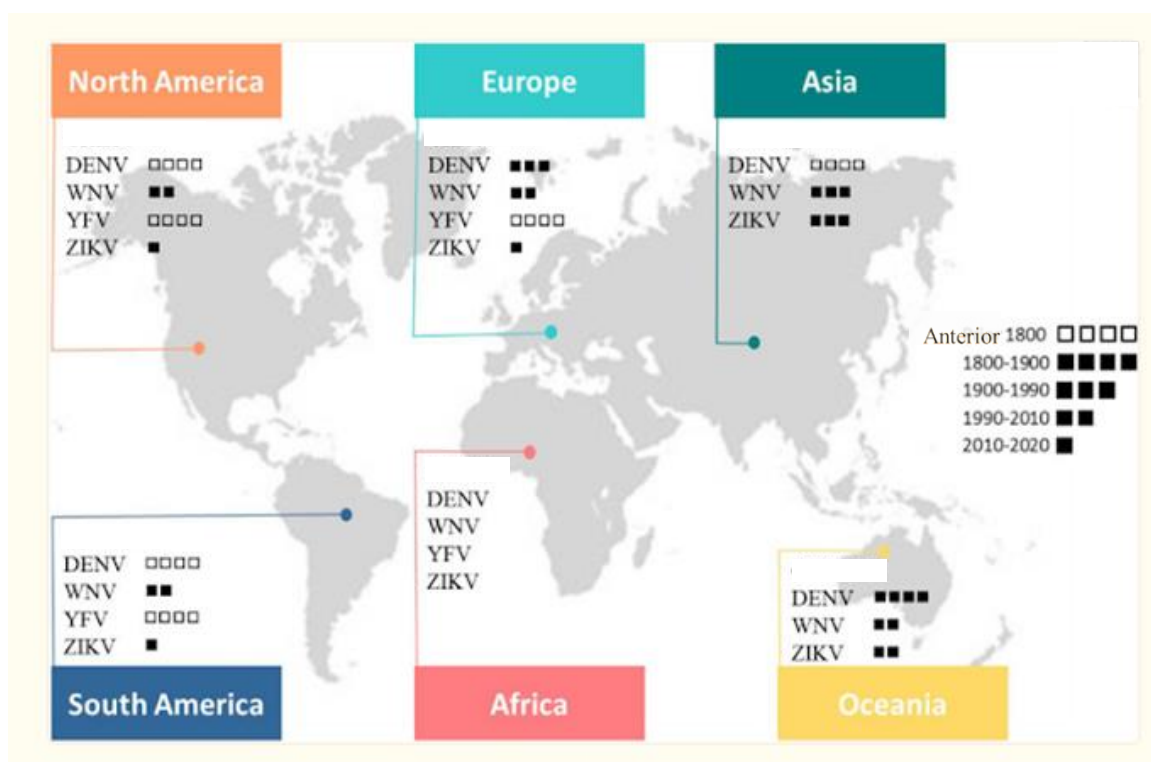


Figura 5. Mapa mostra a distribuição global de quatro flavivírus (transmissão local atual ou passada). Pequenos quadrados referem-se ao período da primeira detecção documentada em humanos (introdução do vírus). Adaptado de (BELLONE; FAILLOUX, 2020)

Embora as florestas mais densas e com maior pluviosidade sejam os ecossistemas mais ricos em arbovírus, eles podem ser encontrados também no cerrado. No Brasil, a Mata Atlântica e a floresta Amazônica são os maiores reservatórios de arboviroses.

Alguns membros do gênero *Flavivirus* são usualmente encontrados de forma esporádica com pequenos surtos ou em casos isolados como ROCV, ILHEV, SLEV e WNV (Quadro 1) (ABREU; DELATORRE; DOS SANTOS; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2019; FIGUEIREDO, 2000; 2007; SILVA; ANGERAMI, 2008; VIEIRA; ANDRADE; KUBISZESKI; SILVA *et al.*, 2019).

Quadro 1. Vetores e ocorrência dos flavivírus (DENV, ZIKV, YFV, ILHEV, ROCV, SLEV, WNV) que circulam no Brasil

Vírus	Vetor	Ocorrência
DENV	<i>Aedes</i>	todas as regiões do Brasil ¹
ZIKV	<i>Aedes</i>	todas as regiões do Brasil ¹
YFV	<i>Haemagogus</i>	endêmica da região amazônica e às vezes se expande para regiões centro-oeste, sudeste e sul. ²
ILHEV	<i>Sabethes</i>	evidências sorológicas na região Amazônica e Sudeste, Sul e Pantanal ^{3,4,6}
ROCV	<i>Psorophora e Aedes</i>	casos em São Paulo / evidências sorológicas em Goiás, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba e Pará ^{3,5}
SLEV	<i>Culex</i>	isolado em São Paulo e um caso no sudeste, Rio Grande do Sul, Paraná e Nordeste ^{3,6}
WNV	<i>Culex</i>	Casos no Piauí / Evidências no Espírito Santo, Ceará, Minas Gerais e São Paulo ⁷

Fonte: 1 (SVS, 2022b) 2 (ABREU; DELATORRE; DOS SANTOS; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2019); 3 (FIGUEIREDO, 2000); 4 (VIEIRA; ANDRADE; KUBISZESKI; SILVA *et al.*, 2019) 5 (DE SOUZA LOPES; DE ABREU SACCHETTA; FRANCY; JAKOB *et al.*, 1981; SAIVISH; GOMES DA COSTA; DE LIMA MENEZES; ALVES DA SILVA *et al.*, 2021); 6 (ALMEIDA; SANTOS; CARDOSO; NOLL *et al.*, 2019); 7 (COSTA; GIOVANETTI; CATENACCI; FONSECA *et al.*, 2021; LÖWEN LEVY CHALHOUB; MAIA DE QUEIROZ-JÚNIOR; HOLANDA DUARTE; EIELSON PINHEIRO DE SÁ *et al.*, 2021; MARTINS; SILVA; CASSEB; SILVA *et al.*, 2019; SILVA; MATOS; DA CUNHA; REHFELD *et al.*, 2019)

1.2.5 Os flavivírus de importância para a saúde pública no Brasil

No Brasil, os flavivírus de maior importância para a saúde pública são: DENV, ZIKV, YFV e WNV responsáveis, respectivamente, pelas arboviroses dengue, doença aguda pelo vírus Zika, febre amarela e febre do Nilo ocidental. Tais doenças são consideradas de notificação compulsória, fazendo parte da “Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública” (SVS, 2022c).

1.2.5.1 Dengue

O vírus Dengue (DENV) possui propriedades antigênicas distintas. Devido a estas propriedades, são classificados em quatro sorotipos específicos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (SABIN, 1952). Este vírus é um dos principais problemas de saúde pública em regiões tropicais. Os quatro sorotipos dos DENV circulantes na Ásia, África

e Américas, causam epidemias geralmente focais também na Europa. No Brasil, a dengue está presente em todas as regiões e apresenta um padrão sazonal, com maior incidência de casos no primeiro semestre do ano, período quente e úmido, característico de climas tropicais (BRAGA; VALLE, 2007).

A dengue é uma doença febril aguda, que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresente. As manifestações clínicas da dengue incluem febre, seguida de cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo, exantema e/ou prostração (SVS, 2009). Podem ocorrer manifestações hemorrágicas e/ou evidência de perda de plasma, podendo levar ao choque hipovolêmico. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os casos de dengue utilizando critérios de gravidade, como: dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG) (OPAS, 2016).

Os vetores epidêmicos são os mosquitos do gênero *Aedes*, sendo *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) que devido aos seus hábitos domésticos e antropofílico, é considerado o mais importante vetor na transmissão do DENV ao homem, estando associado a epidemias explosivas de dengue clássico (DC) e febre hemorrágica do dengue (FHD) (HALSTEAD, 1984).

Embora haja relatos clínicos, sorológicos e epidemiológicos da ocorrência de dengue no Brasil há mais de 100 anos, as epidemias por DENV cresceram em frequência e abrangência de modo significativo no país após a reintrodução do vetor *Aedes* e a sua dispersão pelo território brasileiro, em 1986 (BRAGA; VALLE, 2007). A dengue adquiriu importância epidemiológica após a epidemia causada pelo sorotipo 1 (DENV-1) no estado do Rio de Janeiro, no município de Nova Iguaçu no ano de 1986, com cerca de 1 milhão de casos estimados (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986).

DENV-1 era o único sorotipo circulante no país até que vírus DENV-2-foi introduzido no estado do Rio de Janeiro no ano de 1990, (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; LAMPE; SCHATZMAYR, 1990). A situação do dengue no país se agravou a partir da introdução deste novo sorotipo, sendo notificados os primeiros casos de febre hemorrágica do dengue e de síndrome do choque por dengue (FHD/SCD) (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; LAMPE; SOUZA *et al.*, 1993).

A introdução de um novo sorotipo (DENV-3) no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, no final de 2000 (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 2000), resultou na co-circulação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3) no ano seguinte, resultando na maior epidemia registrada no país, em 2002 (DE SIMONE; NOGUEIRA; ARAÚJO; GUIMARÃES *et al.*, 2004).

O DENV-4 ressurgiu no Brasil em 2010, 28 anos após ter sido detectado pela primeira vez no estado de Roraima, norte do Brasil, o mesmo estado em que havia sido detectado pela última vez em 1982 (NUNES; FARIA; VASCONCELOS; MEDEIROS *et al.*, 2012). Embora a maioria dessas reintroduções do DENV-4 resultasse em transmissão de curta duração, em 2012–2013 este sorotipo se espalhou para além da região norte, chegando o Estado Rio de Janeiro causando grandes surtos urbanos nas regiões centro-oeste e sudeste do Brasil (CASTRO; NOGUEIRA; FILIPPIS; FERREIRA *et al.*, 2012; DE BRUYCKER-NOGUEIRA; FARIA; NUNES; NOGUEIRA *et al.*, 2018; VILLABONA-ARENAS; DE OLIVEIRA; DE SOUSA-CAPRA; BALARINI *et al.*, 2016).

No Brasil, os anos de 2015, 2016 e 2019 foram considerados epidêmicos para dengue, sendo registrados mais de um milhão de casos/ano. Os anos de 2017 e 2018 foram marcados por redução importante no número de casos. Em 2019, o número de casos de dengue voltou a apresentar proporção epidêmica, com aumento de 486,4% em relação a 2018. No entanto os casos de dengue diminuíram novamente em 2020 e atualmente, no primeiro semestre de 2022 o país já superou o número de casos de 2021 (SVS, 2022c).

O Brasil já é considerado hiperendêmico para dengue, registrando o maior número de casos no mundo, com aproximadamente 21 milhões de infecções notificadas desde a década de 1980 (OPAS/OMS, 2022).

1.2.5.2 Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente que foi relatado pela primeira vez em 1947, após isolamento de um macaco rhesus sentinela com quadro febril, na floresta de Zika, em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Depois deste relato, pequenos surtos em humanos foram descritos na África e Ásia. O primeiro surto significativo ocorreu em 2007, na ilha de Yap, na Micronésia, onde a maioria da população foi afetada pela febre do Zika. Em 2013 e 2014, uma epidemia maior ocorreu na Polinésia Francesa, no Pacífico Sul (MUSSO; GUBLER, 2016; MUSSO; NHAN; ROBIN; ROCHE *et al.*, 2014; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

Comumente, o ZIKV causa uma doença leve, com período de incubação médio de 2 a 7 dias. Os principais sintomas são febre, erupção cutânea, conjuntivite, artralgia, mialgia, dor de cabeça e mal-estar. Porém, durante a epidemia na Polinésia Francesa, pela primeira vez, foi relatada sua associação com complicações neurológicas graves, como a síndrome de Guillain-Barré (GBS) (OEHLER; WATRIN; LARRE; LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014).

Os primeiros casos autóctones das Américas foram descritos em março de 2015 no estado da Bahia (Brasil) (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Neste mesmo ano o país sofreu um surto explosivo de ZIKV. Em setembro 2015, em Pernambuco, o ZIKV foi associado com a descrição de complicações neurológicas graves como a microcefalia em recém-nascidos (MELO; AGUIAR; AMORIM; ARRUDA *et al.*, 2016). Em outubro do mesmo ano, o vírus foi detectado em 14 estados brasileiros, estimando-se que até 1,3 milhão de casos suspeitos tenham ocorrido neste período (PETERSEN; JAMIESON; POWERS; HONEIN, 2016). Além do grande número de notificações de ZIKV, houve aumento de casos de GBS. À época, Ministério da Saúde do Brasil (MS) ainda descreveu um aumento da ocorrência de microcefalia em recém-natos (SOUZA; ARAÚJO; ALBUQUERQUE; BRAGA *et al.*, 2016).

A transmissão do ZIKV tem sido associada às espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* (FERREIRA-DE-BRITO; RIBEIRO; MIRANDA; FERNANDES *et al.*, 2016), também foram descritos casos de transmissão perinatal (BESNARD; LASTERE; TEISSIER; CAO-LORMEAU *et al.*, 2014) e potencial risco de infecções por ZIKV através de transfusão sanguínea (MUSSO; NHAN; ROBIN; ROCHE *et al.*, 2014). Foi relatada a possível disseminação de ZIKV por contato sexual, devido à sua detecção no sêmen de pessoas vivendo fora da área de ocorrência do mosquito vetor (MUSSO; ROCHE; ROBIN; NHAN *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que o ZIKV pode ser encontrado na urina (GOURINAT; O'CONNOR; CALVEZ; GOARANT *et al.*, 2015), no leite materno (DUPONT-ROUZEYROL; BIRON; O'CONNOR; HUGUON *et al.*, 2016) e na saliva de humanos infectados (BONALDO; RIBEIRO; LIMA; DOS SANTOS *et al.*, 2016).

No Brasil, com relação aos dados de Zika, de janeiro até junho de 2022 ocorreram 5.699 casos prováveis. Em relação a 2019, houve um aumento de 14,4% no número de casos e quando comparado com o ano de 2021, obteve-se um aumento de 118,9% no número de casos (SVS, 2022a). De 2016 a 2019, foram confirmados 21 óbitos e apesar da ocorrência de casos autóctones, nenhum confirmado no ano de 2015 e de 2020 a junho 2022 (SVS, 2020).

1.2.5.3 Febre do Nilo Ocidental

O Vírus do Nilo Ocidental (WNV) é o agente causador da Febre do Nilo Ocidental (FNO), que atualmente é um motivo de preocupação para a saúde pública e veterinária em todo o mundo, sendo o vírus causador de surtos de encefalite humana e epizootias aviárias e equinas em países temperados e tropicais (RONCA; RUFF; MURRAY, 2021). O WNV é mantido principalmente na natureza por um ciclo de transmissão enzoótica envolvendo passeriformes como hospedeiros amplificadores e espécies do gênero *Culex*, em particular *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, que são considerados os principais vetores. Os humanos e animais domésticos são hospedeiros sem saída (CAMPBELL; MARFIN; LANCIOTTI; GUBLER, 2002; TAYLOR; HURLBUT; DRESSLER; SPANGLER *et al.*, 1953).

O WNV foi identificado pela primeira vez em um paciente com quadro febril em Uganda, na África Ocidental, em 1937. Posteriormente, o vírus foi relatado nos continentes Europeu, Asiático e na Oceania (SMITHBURN; HUGHES; BURKE; PAUL, 1940). Em 1999, o vírus chegou às Américas sendo primeiramente identificado nos Estados Unidos, e posteriormente se disseminou pelo Canadá, México e países das Américas Central e do Sul nos anos subsequentes (KOMAR; CLARK, 2006). Então, em 2003, por recomendações da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e da OMS foi criado o Sistema Nacional de Vigilância da Febre do Nilo Ocidental no Brasil (SVS, 2015). O primeiro caso humano no Brasil foi de um paciente que apresentou quadro de encefalite, diagnosticado clínica e sorologicamente. O caso foi relatado em 2014 no Piauí (VIEIRA; ROMANO; BORBA; SILVA *et al.*, 2015).

Em humanos, 80% dos casos são assintomáticos e cerca de 20% desenvolvem a febre do Nilo Ocidental com potencial agravamento e surgimento de manifestações neurológicas como encefalite, meningite e paralisia aguda flácida (HAYES; SEJVAR; ZAKI; LANCIOTTI *et al.*, 2005). Os sintomas mais comuns são parecidos com os da gripe: mal-estar, fraqueza, dor de cabeça, mialgia e artralgia. Também pode se observar anorexia, náuseas, vômitos, linfadenopatia, dor de garganta e conjuntivite em alguns pacientes (DREBOT; ARTSOB, 2005).

Em abril de 2018, foram registradas epizootias em equídeos com manifestações neurológicas no estado do Espírito Santo, que possibilitou o primeiro isolamento do WNV no Brasil. As amostras de sangue e soro desses equídeos também foram analisadas através do sequenciamento genômico (MARTINS; SILVA; CASSEB; SILVA *et al.*, 2019).

Em junho de 2019, após a notificação de um caso fatal por distúrbio neurológico provocado por WNV em um cavalo na cidade de Boa Viagem, Ceará, o MS liderou uma força-tarefa envolvendo diversas instituições públicas. Esta investigação do WNV em Boa Viagem revelou que não apenas equinos, mas também humanos e diferentes espécies de animais domésticos e aves silvestres foram expostos localmente ao WNV (LÖWEN LEVY CHALHOUB; MAIA DE QUEIROZ-JÚNIOR; HOLANDA DUARTE; EIELSON PINHEIRO DE SÁ *et al.*, 2021). Um novo estudo de vigilância genômica demonstrou, pela primeira vez, a presença do patógeno em equinos de Minas Gerais, e confirmou a circulação viral no Piauí e em São Paulo de amostras coletadas entre os anos de 2018 e 2020 (COSTA; GIOVANETTI; CATENACCI; FONSECA *et al.*, 2021).

1.2.5.4 Febre Amarela

O vírus da Febre Amarela (YFV) é originário da África e se espalhou para as Américas e Caribe, provavelmente durante os séculos XVII e XIX, através do tráfico de pessoas escravizadas (TOMORI, 1999). A febre amarela foi responsável por enormes surtos, com grande número de óbitos, e prejudicou as rotas comerciais nas Américas no século XIX (CHIPPAUX; CHIPPAUX, 2018). Apesar da existência de vacinas seguras e eficazes desde o final dos anos 1930, este agravo continua a induzir uma pesada carga à saúde pública, causando anualmente milhares de novos casos e mortes na África e na América do Sul (VASCONCELOS; MONATH, 2016).

O YFV tem pico de viremia durante 3 a 6 dias e os sintomas mais comuns incluem febre, dores de cabeça, icterícia, dores musculares, náuseas, vômitos e fadigas. Cerca de 15-30% dos casos podem evoluir para o óbito, após o desenvolvimento da forma mais grave da doença, caracterizada pelos sintomas: febre alta, icterícia, hemorragia, choque e falência dos órgãos (OMS, 2018). No Brasil, de 2016 a 2019, tivemos o maior surto de Febre Amarela das últimas décadas, com cerca de 14 mil casos humanos suspeitos e 773 óbitos registrados (SVS, 2018).

Há dois ciclos de transmissão: o urbano, cujo vetor principal é o *Aedes aegypti*; e o silvestre, no qual os vetores responsáveis nas Américas são do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*. No Brasil não há registros do ciclo urbano da febre amarela desde 1942. Os três últimos casos foram registrados na cidade de Sena Madureira, no estado do Acre (CAVALCANTE; TAUIL, 2017). Porém, esta doença marcou a história da saúde pública brasileira, devido ao impacto das epidemias urbanas que correram no país em meados do século XIX até o verão de 1928 (SILVA; ANGERAMI, 2008).

Entre 2016 a 2019, o Brasil vivenciou um dos maiores surtos de FA silvestre de sua história na região extra-amazônica, com ocorrência nos estados da região sudeste, principalmente em Minas Gerais e no Espírito Santo, mas também no Rio de Janeiro e em São Paulo, áreas onde havia baixa cobertura vacinal (ABREU; DELATORRE; DOS SANTOS; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2019; GÓMEZ; ABREU; SANTOS; MELLO *et al.*, 2018). E, assim, surgiu o risco da reurbanização da doença por conta da alta infestação pelos *Aedes aegypti* (ABREU; DELATORRE; DOS SANTOS; FERREIRA-DE-BRITO *et al.*, 2019; CAVALCANTE; TAUIL, 2017; COUTO-LIMA; MADEC; BERSOT; CAMPOS *et al.*, 2017).

A febre amarela é evitada por uma vacina extremamente eficaz, segura e economicamente acessível, produzida desde 1937 por Bio-Manguinhos/Fiocruz. A vacina é pré-qualificada junto à OMS para ser fornecida ao Brasil e a outras nações (PONTE; PIMENTEL, 2017). Uma dose única da vacina é suficiente para conferir imunidade sustentada e proteção para toda a vida contra esta doença, não sendo necessária uma dose de reforço. Apesar de eficiência e segurança da vacina, foi descrito que nos lugares não endêmicos para febre amarela a cobertura vacinal é baixa (OMS, 2018).

1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico dos agravos causados pelos flavivírus necessita ser rápido, sensível e específico, para que se realize um manejo clínico adequado, diferindo de outras doenças com sintomatologia semelhante para dar suporte aos programas de vigilância e controle vetorial (GUZMAN; HALSTEAD; ARTSOB; BUCHY *et al.*, 2010; OMS, 2009).

O diagnóstico baseado nos quadros clínicos deve ser confirmado pelo diagnóstico laboratorial. No caso dos vertebrados, em especial os humanos, os testes sorológicos, geralmente são os mais utilizados para diagnosticar infecções agudas por flavivírus. Estes métodos incluem a detecção por ELISA de anticorpos IgM e IgG e do antígeno NS1. Existem também os testes rápidos, que são ensaios imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgM/IgG (Dengue, Zika e Febre Amarela) e captura de antígeno NS1, disponível para DENV (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, 2022; BOZZA; MOREIRA-SOTO; ROCKSTROH; FISCHER *et al.*, 2019).

O tempo de detecção dos anticorpos varia de acordo com a janela imunológica do paciente e com a evolução da doença. Os laboratórios podem optar por usar ensaios *in house* ou kits de diagnóstico disponíveis comercialmente (VAZQUEZ; HAFNER; RUIZ; CALZADA

et al., 2007). No entanto, o diagnóstico sorológico de flavivírus tem algumas limitações, pois mais de um tipo de flavivírus é endêmico em certas regiões do Brasil e do mundo, resultando em uma grande possibilidade de infecções sequenciais com diferentes membros desta família. Isso torna o diagnóstico diferencial difícil, em razão de os flavivírus compartilharem um grupo comum de epítomos, particularmente na proteína E, acarretando num alto grau de reatividade cruzada (RIGAU-PÉREZ; CLARK; GUBLER; REITER *et al.*, 1998).

O teste de neutralização por redução de placa (*Plaque Reduction Neutralization Test-PRNT*) é o ensaio mais comumente usado para detecção de anticorpos neutralizantes. Acredita-se que a presença desses anticorpos seja o meio mais relevante para determinar a imunidade protetor. Porém é um teste trabalhoso, requer equipamentos e insumos específicos e leva vários dias para sua finalização, tornando difícil sua utilização em larga escala (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008; SIMÕES, 2011).

Com o aumento da incidência de infecções por flavivírus e a ausência de vacinas para prevenção, a primeira confirmação é muito relevante para a vigilância epidemiológica. Métodos adicionais de diagnóstico incluem o isolamento viral, detecção de antígeno e identificação do vírus através das sequências genômicas específicas por amplificação do ácido nucleico (OMS, 2006).

O isolamento viral, o padrão ouro para o diagnóstico diferencial, geralmente é realizado usando-se cultura de células. Tal metodologia também pode ser realizada através de inoculação intratorácica em mosquitos ou inoculação intracerebral em camundongos. Os laboratórios de pesquisa devem apresentar ambientes com biossegurança 2 ou 3 para executar as técnicas de isolamento viral. Apesar de ser o padrão ouro, o método é demorado, totalmente dependente da sobrevivência do vírus na amostra durante transporte e manuseio e é limitante no número de amostras que podem ser testadas de cada vez (DIGOUTTE; CALVO-WILSON; MONDO; TRAORE-LAMIZANA *et al.*, 1992).

As técnicas moleculares são de suma importância dentro do cenário de diagnóstico das arboviroses. Pois essas metodologias têm a capacidade de identificar o material genético do vírus na fase aguda da doença de forma rápida e segura. Além disso, apresentam alta especificidade e alta sensibilidade. Os ensaios moleculares podem ser qualitativos ou quantitativos; neste último caso são capazes de determinar a carga viral (DEUBEL; LAILLE; HUGNOT; CHUNGUE *et al.*, 1990; OMS, 2009).

O uso potencial de técnicas moleculares pode variar, dependendo do flavivírus infectante. Os DENVs por exemplo, produzem títulos elevados e viremias de longo prazo, enquanto outras têm baixa ou nenhuma viremia em humanos infectados (MOUREAU; TEMMAM; GONZALEZ; CHARREL *et al.*, 2007). Muitos ensaios de amplificação foram desenvolvidos ao longo do tempo para a detecção dos membros do gênero *Flavivirus* (LANCIOTTI, 2003; MOUREAU; TEMMAM; GONZALEZ; CHARREL *et al.*, 2007; VINA-RODRIGUEZ; SACHSE; ZIEGLER; CHAINTOUTIS *et al.*, 2017).

A metodologia de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (*RT-PCR*) é de grande importância para a detecção de vírus de genoma RNA, como os flavivírus. Quando comparados com métodos de diagnóstico sorológico convencionais e com o isolamento viral, os métodos moleculares apresentam como vantagem a rápida identificação do agente nas amostras clínicas durante a fase aguda. Além de gerarem resultados mais precisos, reprodutíveis e específicos. Isso, por sua vez, permite ao médico iniciar manejos mais precocemente e aplicar a terapia que melhor contribua para redução significativa da morbidade e mortalidade (MOUREAU; COOK; LEMEY; NOUGAIREDE *et al.*, 2015).

A PCR convencional foi o primeiro teste a ser desenvolvido para vírus de RNA. O ensaio apresenta as seguintes etapas: transcrição reversa para converter o RNA genômico em DNA complementar (cDNA); amplificação utilizando a enzima *Taq DNA Polimerase* e detecção do produto da amplificação por eletroforese em gel de agarose. Oligonucleotídeos iniciadores são usados para amplificação de regiões específicas do genoma viral e isso permite que o ensaio seja altamente específico para detecção do alvo molecular (LANCIOTTI, 2003).

Com o advento da PCR em tempo real, outros protocolos foram desenvolvidos, tanto pelo método *SYBR Green* quanto por sonda tipo *TaqMan*, os quais permitem que um aparelho consiga detectar os corantes fluorescentes adicionados ao sistema em tempo real. Ensaios RT-PCR convencionais e em tempo real para a detecção do genoma viral têm sido amplamente utilizados em laboratórios em todo o mundo. Essas metodologias têm a vantagem de serem mais rápidas e mais sensíveis do que o diagnóstico molecular convencional (JOHNSON; WAKELEY; MANSFIELD; MCCRACKEN *et al.*, 2010; MOUREAU; TEMMAM; GONZALEZ; CHARREL *et al.*, 2007; PATEL; LANDT; KAISER; FAYE *et al.*, 2013).

As tecnologias moleculares trouxeram ganhos para o diagnóstico, especialmente em virologia clínica, permitindo a detecção e a quantificação de vírus outrora laboriosa. Os ensaios

desenvolvidos e as várias plataformas utilizadas proporcionaram uma redução no tempo gasto e diminuição dos custos ao longo do tempo (VERNET, 2004).

Muitos laboratórios desenvolveram formatos de diagnóstico *in house*, pois o custo é inferior aos ensaios comerciais. Para garantir uma boa validação e qualidade destas metodologias, é necessário que os laboratórios realizem protocolos de validação de método e façam controle de qualidade semestrais ou anuais (Lemmer et al. 2004). Contudo, espera-se que os laboratórios de referência ainda mantenham métodos tradicionais padrão para garantir a detecção de novos organismos e a sua descoberta e caracterização para fins de pesquisa (BOZZA; MOREIRA-SOTO; ROCKSTROH; FISCHER *et al.*, 2019).

1.3.1 Parâmetros analíticos

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Para tanto, é necessário a avaliação de alguns parâmetros adequados à análise, como: sensibilidade, especificidade, repetibilidade, precisão, exatidão e limite de detecção.

A sensibilidade e a especificidade, são duas variáveis importantes para mensurar e identificar a precisão diagnóstica de um teste. A sensibilidade corresponde a capacidade que o teste tem de detectar as amostras verdadeiramente positivas. A especificidade é a capacidade que o mesmo teste tem de detectar amostras verdadeiramente negativas e também a capacidade que possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

A repetibilidade é concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação e a precisão representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. Já a exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais

estabelecidas, ou seja, é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ANVISA, 2003).

1.4 JUSTIFICATIVA

Com a co-circulação de múltiplas espécies de *Flavivirus* no Brasil, casos são subnotificados ou não detectados, por serem confundidas com as espécies de maior circulação ou devido a possível reação cruzada entre os membros deste gênero (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Diante da necessidade de uma melhor vigilância epidemiológica e implementação de medidas de controle mais eficientes, é necessário melhorar o diagnóstico virológico em humanos, em hospedeiros vertebrados não-humanos e em artrópodes vetores. É muito importante a manutenção e integração de uma vigilância virológica e entomológica contínua, com o intuito de direcionar os métodos de controle e prevenção das arboviroses em regiões acometidas em tempo hábil. Além disso, muitos destes vírus não são monitorados em bancos de sangue, nem em órgãos transplantados, aumentando a possibilidade de transmissão não vetorial (LIMA-CAMARA, 2016).

O controle de vetores continua sendo o único método eficaz para prevenir a transmissão de arboviroses, as quais, ainda não há vacinas eficazes. A vigilância entomológica é um fator chave para alertar as autoridades sobre possíveis surtos e a infecção natural nas populações de mosquitos, mas infelizmente tem sido raramente usada como um sistema de alerta precoce para monitorar a prevalência flutuante de mosquitos infectados (RAMÍREZ; VAN DEN HURK; MEYER; RITCHIE, 2018). Embora alguns flavivírus de mosquitos ainda não pareçam ser patogênicos para humanos ou animais, este grande número de arbovírus amplamente diferentes e altamente adaptáveis propicia recursos para o surgimento de novos patógenos no futuro (FARFAN-ALE; LOROÑO-PINO; GARCIA-REJON; HOVAV *et al.*, 2009; JUNGLEN; KOPP; KURTH; PAULI *et al.*, 2009; LIANG; GAO; GOULD, 2015; PAUVOLID-CORRÊA; SOLBERG; COUTO-LIMA; KENNEY *et al.*, 2015).

Com isso, torna-se importante a implementação de um método de diagnóstico molecular capaz de detectar os flavivírus circulantes no nosso país com protocolos usando oligonucleotídeos iniciadores genéricos para o gênero *Flavivirus*, como um ensaio PAN de flavivírus (BRONZONI; BALEOTTI; RIBEIRO NOGUEIRA; NUNES *et al.*, 2005; KUNO, 1998). No entanto, se tem uma estratégia inicial com *RT-qPCR* em tempo real padronizada e adaptada aos vírus circulantes no Brasil.

Uma metodologia molecular com o uso de oligonucleotídeos iniciadores e sondas gênero-específico (PAN-FLAVIVIRUS) permitiria uma triagem com a detecção de vários membros do gênero de uma só vez, incluindo vírus para os quais o diagnóstico ainda não é estabelecido como rotina nos laboratórios de vigilância entomo-viológica, além da possibilidade de detecção de novos vírus (CUNHA, 2018). Faz-se necessária a utilização de métodos menos trabalhosos, reduzindo o tempo de detecção. Outro fato preponderante é a viabilização do custo de testes para identificação de cada vírus individualmente, já que um mesmo mosquito pode ser vetor de várias arboviroses concomitantemente (CUNHA, 2018; PATEL; LANDT; KAISER; FAYE *et al.*, 2013).

Outras aplicações para o teste PAN-FLAVIVIRUS seria o monitoramento de primatas não humanos e outros animais reservatórios, os quais podem ser amplificadores de arbovírus ou para pesquisa de flavivírus em bolsas de sangue e em órgãos para transplantes, pois conseguiria detectar a presença de múltiplos vírus em uma só reação. Essa metodologia seria de grande valia para a vigilância epidemiológica dos flavivírus no Brasil, fornecendo informações importantes para otimizar a vigilância e controlar essas arboviroses (DOS REIS; GIBSON; AYLLÓN; DE MEDEIROS TAVARES *et al.*, 2019).

2 Objetivo

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver uma metodologia simples, eficaz, sensível, específica, reprodutível e de detecção simultânea dos membros do gênero *Flavivirus* com importância para saúde pública do Brasil através de *RT-qPCR* a ser utilizada na vigilância epidemiológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Buscar sequências de genoma completo de Zika, Dengue, Febre Amarela e Febre do Nilo Ocidental, circulantes no Brasil em bancos de dados para o alinhamento e desenho de iniciadores gênero-específicos direcionados para regiões conservadas de flavivírus.
- Estabelecer os conjuntos dos sistemas e síntese de iniciadores e sondas para o gênero *Flavivírus*.
- Desenvolver e padronizar o ensaio PAN FLAVI por *RT-qPCR*; utilizando vírus de cultura de Zika, Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental, em diferentes concentrações a fim de avaliar especificidade, repetibilidade e sensibilidade da metodologia.
- Avaliar o desenvolvimento do ensaio com amostras verdadeiras positivas com vírus do gênero *Flavivirus*.

3 Materiais e Métodos

Os procedimentos adotados no desenvolvimento dessa dissertação encontram-se resumidos no fluxograma da Figura 6 e descrito de forma mais detalhada a seguir.

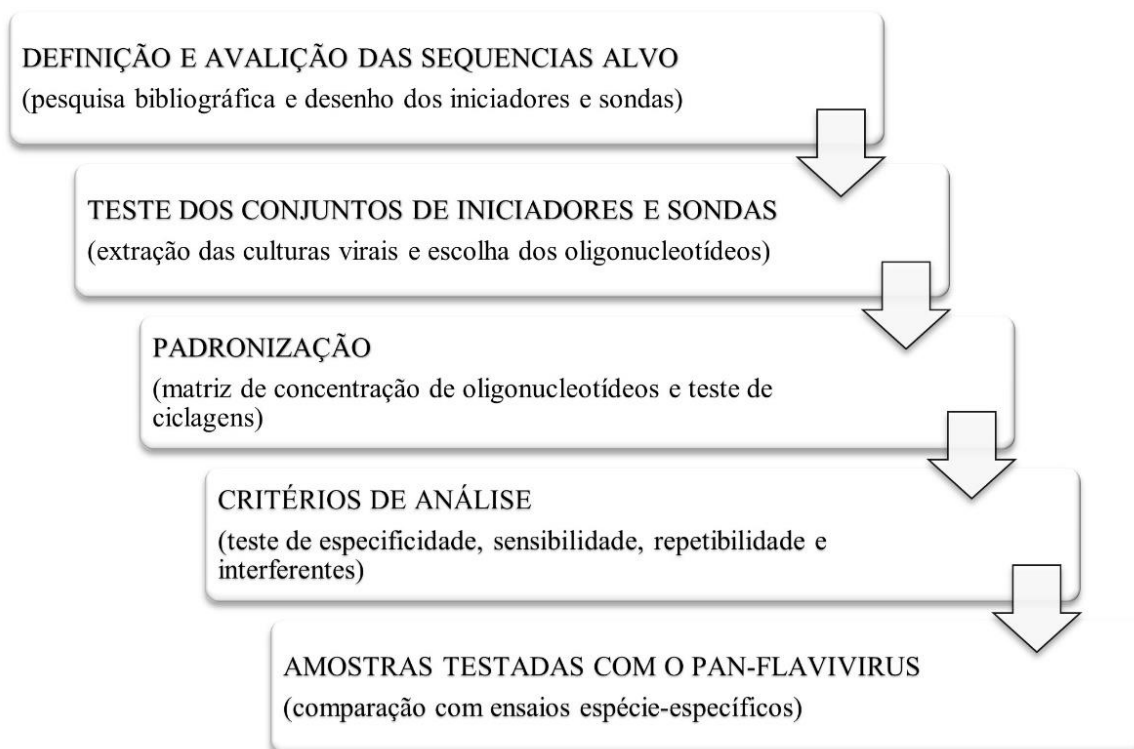


Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada na dissertação.

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO E DIRETRIZES

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O LATED apresenta condições necessárias e estrutura laboratorial que atendem os requisitos para o desenvolvimento dos ensaios moleculares, seguindo as Boas Práticas de Laboratório (BPL). Durante todas as etapas do desenvolvimento e padronização, foram utilizados equipamentos de proteção coletiva (EPCs), como a cabine de segurança biológica II, assim como, os equipamentos de proteção individual (EPIs).

Visando obter uma proposta de ensaio diagnóstico, foram seguidas as diretrizes da resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 27, de 17 de maio de 2012 (MS, 2012), que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos.

3.2 AMOSTRAS

3.2.1 Amostras de plasma humano negativo

As amostras de plasma humano negativo, foram fornecidas pela Seção de Processamento de Plasma (SEPLA) / Bio-Manguinhos. O *pool* de bolsas de plasma humano negativo foi obtido de acordo com o processamento descrito no documento operacional interno de produção de Biomanguinhos. Seguindo as orientações do documento interno, antes do preparo do *pool*, cada bolsa foi testada individualmente para verificação da detecção ou não dos alvos moleculares Zika, Dengue e Chikungunya. Para tal, cada bolsa foi descongelada a temperatura ambiente (20°C a 24°C).

De cada bolsa foi retirada uma alíquota de 500 µL para extração com o kit NAT Plus Bio-Manguinhos. Após a extração, foi feita a amplificação com o Kit Molecular ZDC/Bio-Manguinhos®. Somente as bolsas com resultado não detectável para Zika, Dengue e Chikungunya foram utilizadas para o preparo do *pool*. Todo o volume de todas as bolsas de plasma negativo foi homogeneizado por 30 minutos e centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,2µm e armazenado em garrafas de um litro a 4°C.

3.2.2 Vírus de cultura e amostras positivas

As culturas virais de YFV, ZIKV, DENV-1, DENV -2, DENV-3 e DENV-4 utilizadas para otimização do ensaio molecular foram fornecidas pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV/Bio-Manguinhos).

As amostras de RNA de WNV, ILHV e SLEV foram cedidas pelo Laboratório de Flavivírus (LABFLA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), no qual apenas o RNA de WNV foi utilizado na padronização. As diversas amostras de flavivírus utilizadas no ensaio para o teste de sensibilidade de amostras positivas e comparação com os ensaios espécie-específicos foram cedidas pelo Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários (LATHEMA/IOC/FIOCRUZ).

Todos os vírus de cultura e RNA de amostras positivas foram armazenados em *freezer* -70°C, até o momento de utilização no LATED. Para realização dos testes, as amostras de vírus de cultura foram diluídas no *pool* de plasma humano negativo para alcançar a concentração

desejada. O Quadro 2 demonstra a identificação de cada vírus de cultura utilizado nos ensaios moleculares.

Quadro 2. Culturas virais utilizadas nos ensaios de desenvolvimento e validação do sistema PAN-FLAVI

Vírus/Cepa	Origem	Linhagem/Genótipo	Genbank
Zika - PB81	Paraíba, Brasil 2015	Linhagem asiática	KU365780
Febre Amarela - 17DD P4 2018	Vacina contra febre amarela	-	U17066.1
Dengue 1 - 60305 P6	Pinheiral, RJ 1998	Genótipo I (Américas/ África)	-
Dengue 2 - 516803	Cepa de referência da OMS	-	-
Dengue 3 - 16562 P4	Filipinas 1964	Genótipo II (Sudeste Asiático / Pacífico Sul)	-
Dengue 4 - TVP360 P3	Tailândia 2007	Genotipo III	KM519588

3.3 DESENHO DE INICIADORES E SONDAS *TaqMan*®:

A escolha da região genômica alvo e o desenho das sequências dos iniciadores e sondas para o sistema PAN-FLAVI foi realizado através de pesquisa bibliográfica. O objetivo foi adquirir informações sobre as regiões conservadas no genoma viral que abrangessem os principais flavivírus de importância médica para o Brasil.

A partir das referências bibliográficas encontradas com protocolos de PCR para detecção de *Flavivirus*, também foram selecionados conjuntos de oligonucleotídeos para testarmos para nosso protocolo PAN-FLAVI (Quadro 3).

Quadro 3. Listagem de referências bibliográficas consultadas para a escolha de sequências conservadas dos flavivírus

Título do artigo	Técnica	Região
Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences (FULOP; BARRETT; PHILLPOTTS; MARTIN <i>et al.</i> , 1993)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Identification of mosquito borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. (PIERRE; DROUET; DEUBEL, 1994)	<i>RT-PCR</i>	NS1, NS3, NS5 e 3'NC
Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. (MEIYU; HUOSHENG; CUIHUA; XIAODONG <i>et al.</i> , 1997)	<i>RT-PCR</i>	NS1
Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviroses. (KUNO, 1998)	<i>RT-PCR</i>	E, NS1, NS2A e NS2B

Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. (SCARAMOZZINO; CRANCE; JOUAN; DEBRIEL <i>et al.</i> , 2001)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses (BRONZONI; BALEOTTI; RIBEIRO NOGUEIRA; NUNES <i>et al.</i> , 2005)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. (SÁNCHEZ-SECO; ROSARIO; DOMINGO; HERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2005)	<i>RT-PCR</i>	C; E
A Real-Time RT-PCR Method for the Universal Detection and Identification of Flaviviruses (MOUREAU; TEMMAM; GONZALEZ; CHARREL <i>et al.</i> , 2007)	<i>RT-qPCR</i> <i>Sybr</i>	NS5
Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes (CHAO; DAVIS; CHANG, 2007)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. (MAHER-STURGESS; FORRESTER; WAYPER; GOULD <i>et al.</i> , 2008)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Assessment of a novel real-time PAN-Flavivirus RT-polymerase chain reaction. (JOHNSON; WAKELEY; MANSFIELD; MCCRACKEN <i>et al.</i> , 2010)	<i>RT-PCR</i>	NS5
Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. (PATEL; LANDT; KAISER; FAYE <i>et al.</i> , 2013)	<i>RT-qPCR</i> <i>Taqman</i>	NS5
Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. (ROMEIRO; SOUZA; TOLARDO; VIEIRA <i>et al.</i> , 2016)	<i>RT-qPCR</i> <i>Sybr</i>	NS5
A Novel PAN-Flavivirus Detection and Identification Assay Based on RT-qPCR and Microarray. (VINA-RODRIGUEZ; SACHSE; ZIEGLER; CHAINTOUTIS <i>et al.</i> , 2017)	<i>RT-qPCR</i> <i>Sybr</i>	NS5

As sequências genômicas de interesse foram obtidas no banco de dados *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI), utilizando os seguintes critérios de seleção: preferência para sequências virais de amostras brasileiras, com genoma completo e que tivessem sido depositadas no banco nos últimos 20 anos.

Após a seleção das sequências, e de acordo com os critérios descritos anteriormente, foi feito um alinhamento utilizando o *software AliView* (LARSSON, 2014). Este alinhamento foi feito com as sequências já descritas na literatura como as mais conservadas entre os flavivírus,

localizadas na região NS5 do genoma (MOUREAU; TEMMAM; GONZALEZ; CHARREL *et al.*, 2007; SCARAMOZZINO; CRANCE; JOUAN; DEBRIEL *et al.*, 2001).

O desenho dos iniciadores e das sondas foi feito pelo software *Geneious Prime 2017* (Biomatters, New Zealand) (KEARSE; MOIR; WILSON; STONES-HAVAS *et al.*, 2012), de acordo com os seguintes critérios: tamanho da sonda e dos iniciadores com aproximadamente 20 bases; temperatura de anelamento (T_m) entre 58°C a 63°C; conteúdo de GC entre 30% e 70%, sendo o conteúdo ideal 50%; localização da sonda próxima a do iniciador avanço ou ao iniciador reverso, mas sem se sobrepor ao sítio de ligação do iniciador na mesma fita e tamanho do fragmento a ser amplificado de 50 a 150 pares de bases (PREDIGER, 2013).

Após o desenho dos primers e sondas, utilizamos o servidor da web *RNAfold da* ©Institute for Theoretical Chemistry e o programa *Autodimer* para prever estruturas secundárias, checando possíveis formações de grampos e de dímeros (HOFACKER, 2003; VALLONE; BUTLER, 2004).

3.4 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A etapa de extração utilizou a tecnologia de *beads* (partículas) magnéticas com hastes magnetizadas para separar os ácidos nucleicos das soluções, fornecendo isolamento de alta qualidade, alto rendimento e diminuição do risco de contaminação das amostras.

O equipamento utilizado na etapa de extração foi o JANUS FLEXNAT da empresa Pertkin Elmer; que é uma plataforma robótica automatizada composta por dois equipamentos acoplados: o pipetador JANUS e Chemagic Prepito. O biorobô tem a capacidade de extrair até 24 amostras simultaneamente. No Janus, ocorreram as seguintes etapas: lise das amostras com tampão de lise e proteinase K, adição do carreador poli (A). No extrator Chemagic Prepito os ácidos nucleicos foram extraídos.

Os ácidos nucleicos foram eluídos em 60ul de tampão de eluição, obtendo-se um RNA livre de albumina sérica, de outras proteínas, nucleases, de sais orgânicos e inorgânicos, além de outros possíveis interferentes. Todas as etapas de extração de ácidos nucleicos foram realizadas de acordo com o Manual de Instruções ZDC FLEX NAT Kit – Bio-Manguinhos®.

3.5 RT-qPCR

Para a etapa de amplificação do ácido nucleico, foi utilizado o produto da etapa de eluição da extração. Como os flavivírus apresentam genoma constituído por RNA, existe a

necessidade de uma etapa de transcrição reversa (RT) antes da etapa de amplificação dos ácidos nucleicos.

A técnica *RT-qPCR* envolve dois ciclos de reação: a transcrição reversa e a amplificação por reação em cadeia da polimerase. Na primeira etapa da *RT-qPCR*, o RNA viral foi transcrito em DNA complementar (cDNA), através da ação da enzima transcriptase reversa. Após a obtenção do cDNA, em uma reação *one step*, ocorreu a amplificação e, concomitantemente, a detecção do material amplificado por PCR em tempo real. Esse tipo de amplificação é específico para cada alvo, pois a reação é composta por um par de iniciadores e uma sonda marcada com fluorescência referente a região alvo, que neste caso é específica para os vírus do gênero *Flavivirus*.

A mistura de PCR utilizada foi a QuantiNova Pathogen Master Mix (QIAGEN) e como fluorescência passiva de reação, o ROX Reference Dye (QIAGEN). O sistema de detecção utilizado foi por sondas *Taqman* (Applied Biosystems), com a molécula fluorescente 6-carboxifluoresceína (FAM).

Nos primeiros testes de padronização do sistema PAN-FLAVI foram avaliadas amostras verdadeiras positivas em reação *RT-qPCR*, contendo iniciadores e sondas específicos para os alvos moleculares do gênero *Flavivirus*.

Uma matriz de concentração foi feita para otimização de iniciadores e sondas escolhidos para o ensaio PAN-FLAVI. O critério de escolha da melhor concentração, baseou-se no conjunto que gerou a amplificação com o menor valor de *cycle threshold* (*Ct*) e com perfil de curva exponencial de amplificação. O conjunto recebeu o nome de Sistema P1.S1 (Tabela 1)

Tabela 1. Variação da concentração de iniciadores e sondas utilizados no ensaio de RT-qPCR do PAN-FLAVI.

Oligonucleotídeo	Sistema P1.S1	min. (µM)	max. (µM)
Iniciador avanço	Flavi F (10µM)	0,40	0,55
Iniciador avanço	DEN4 F (10µM)	0,40	0,55
Iniciador reverso	Flavi R 2 (10µM)	0,40	0,55
Sonda principal	Flavi all probe 2 (10µM)	0,40	0,60
Sonda auxiliar	Flavi S 2/3 YF (10µM)	0,10	0,15
Sonda auxiliar	Flavi Patel S 3/3 D4 (10µM)	0,10	0,10

Os ensaios foram realizados usando o termociclador de PCR em tempo real *7500 Real Time PCR System* (Thermo Fisher). Diversos ajustes foram realizados na ciclagem, no total

foram testadas 06 ciclagens, com variações no número de ciclos de PCR, nas temperaturas de desnaturação e anelamento/extensão (Tabela 2).

Tabela 2. As ciclagens testadas no termociclador nos ensaios para validação do sistema PAN-FLAVI.

	Ciclagem Artigo*	Ciclagem ZDC modificada	Ciclagem CL 01	Ciclagem CL 02	Ciclagem CL 03	Ciclagem CL 04
Transcrição reversa	50°C 15min	50°C 15min	50°C 15min	50°C 15min	50°C 15min	50°C 15min
	95°C 2min	95°C 2min	95°C 2min	95°C 2min	95°C 2min	95°C 2min
	45 ciclos	50 ciclos	45 ciclos	45 ciclos	45 ciclos	45 ciclos
	Nº de ciclos					
Desnaturação	95°C 10s	95°C 10s	95°C 10s	95°C 10s	95°C 10s	95°C 10s
	Anelamento /extensão	60°C 30s	52°C 20s 58°C 30s	52°C 20s 56°C 30s	55°C 30s	55°C 40s

* (PATEL; LANDT; KAISER; FAYE *et al.*, 2013)

3.6 PARÂMETROS DE ANÁLISE DA RT-qPCR

O software 7500 (versão 2.0.6) do equipamento 7500 Real Time PCR System foi utilizado para avaliação dos resultados obtidos. O *Threshold* e o *Baseline*, critérios de análise do *software*, foram estabelecidos com base na cinética de amplificação, linearidade, especificidade e sensibilidade das amostras verdadeiramente positivas e considerando a especificidade das amostras negativas para os alvos moleculares do sistema PAN-FLAVI. Após a definição dos parâmetros de análise (*Threshold* 0,6 e *Baseline* 3 a 15), todos os demais testes realizados foram avaliados seguindo os critérios estabelecidos nesta etapa.

3.7 CRITÉRIOS DE ANÁLISE DO SISTEMA PAN-FLAVI

Os critérios de análise foram baseados nas diretrizes da RDC Nº 166/2017 (MS, 2017), que dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Para avaliar a especificidade do ensaio PAN-FLAVI foram testadas 94 amostras de plasma verdadeiramente negativas previamente avaliadas em ensaios sorológicos e moleculares para ZIKV, YFV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

O limite de detecção (*limit of detection/ LOD*) foi determinado utilizando-se diluições com no mínimo 08 replicatas, de cada ponto de diluição, das amostras de ZIKV, YFV, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, amplificadas com o conjunto de iniciadores que apresentou melhores resultados. Com os dados obtidos, foi feita a análise estatística de *Probit* para estimar

o LOD dos alvos positivos com intervalo de confiança de 50% e 95%. Essa análise foi realizada usando o software estatístico *IBM SPSS Statistics Subscription*.

A avaliação de interferentes teve como objetivo verificar se, substâncias que poderiam inibir a amplificação do ácido nucleico, inibem a reação do ensaio molecular PAN-FLAVI. O painel comercial kit *Thermo Scientific™ AcroMetrix Inhibition Panel* (REF 956400) foi utilizado para simular condições clínicas como hemólise, icterícia e lipemia, possivelmente encontradas em amostras de soro, plasma e sangue total humanos. Este painel foi utilizado para realizar a análise dos efeitos dos interferentes de PCR na amplificação do ensaio PAN-FLAVI.

Para avaliação de amplificação inespecífica, o sistema foi testado com 94 amostras de plasma verdadeiramente negativas e como controle da reação usamos duas amostras positivas de DENV. Adicionalmente, amostras positivas para outros nove patógenos (CHIKV, MAYV, HIV, HCV, HBV, MALÁRIA, INF-A, INF-B, SARS-COV2) foram testadas no sistema PAN-FLAVI para análise de especificidade.

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15%, e conforme descrito pela RDC N° 27/2012 (MS, 2012). Este critério de análise foi avaliado segundo a fórmula: $CV (\%) = (\text{desvio padrão}/\text{concentração média experimental}) \times 100$.

A exatidão foi expressa pelo Erro Padrão Relativo (EPR%), não se admitindo valores superiores a 15% do valor nominal descritos pela RDC N° 27/2012 (MS, 2012). Este critério de análise foi avaliado segundo a fórmula: $EPR (\%) = [(\text{concentração média experimental} - \text{valor nominal}) / \text{valor nominal}] \times 100$.

Os dados foram coletados em formulário padronizado e foram armazenados em planilha eletrônica (Microsoft Excel®, Redmond, WA, EUA). Também, foram utilizados tabelas e gráficos para a apresentação dos dados.

4 Resultados

4.1 DEFINIÇÃO E AVALIAÇÃO DE SEQUÊNCIAS ALVO

A pesquisa bibliográfica demonstrou a ausência de ensaios PAN-FLAVI por PCR em tempo real descritos, diminuindo as possibilidades de sistemas moleculares que pudessem ser utilizados como base para nossa padronização. Esta questão foi solucionada a partir do uso do software *Geneious* para desenho de iniciadores e sondas específicos para os alvos, aumentando as opções de testagem durante a padronização do sistema PAN-FLAVI.

Todos os iniciadores e sondas utilizados nos testes foram degenerados, permitindo ampliação das possibilidades da detecção de um maior número de cepas de flavivírus. Os iniciadores e sondas foram nomeados de acordo com a região complementar ao genoma viral dos flavivírus para os quais foram desenhados para detectar. (Quadro 4)

Quadro 4. Sequências dos iniciadores e sondas PAN-FLAVI desenhados para RT-PCR em tempo real.

Conjunto	Iniciador/Sonda	Sequência		
Flavi 1	Flavi NS3 S (ZD) M	5'	YGCHGCBCARAGRA	3'
	Flavi NS3 R (ZD)	5'	BKKGRTTYCTDCCWAYKCKY	3'
	Flavi NS3 F (ZD)	5'	GAGMGNGTBTATYYTRGCHGG	3'
Flavi 2	Flavi NS5 S (FW) M	5'	TKSSSBYWYYTGCCAGA	3'
	Flavi NS5 R (FW)	5'	WRCACAABYTGGGGRYKYTTT	3'
	Flavi NS5 F (FW)	5'	ARRGCHMMDGADCCRCCAGM	3'
Flavi 3	Flavi ENVEL S (FD) M	5'	YTGGRRGGDKTBTCA	3'
	Flavi ENVEL R (FD)	5'	GCWSMRCCRAACACWKKRTG	3'
	Flavi ENVEL F (FD)	5'	GRGAYRCSGCTGGGACTTY	3'
Flavi 4	Flavi NS1 S (ZW) M	5'	ARGCYTGGAKGGAC	3'
	Flavi NS1 R (ZW)	5'	KGGSGWKTCAGGRTRRTACT	3'
	Flavi NS1 F (ZW)	5'	RGAGMYGAGATGYGGWASWG	3'
Flavi 5	Flavi NS5 S (ZFW) M	5'	CTGCTCCAACGTA	3'
	Flavi NS5 R (ZFW)	5'	GGVWYYCTGAYHASYSYYCC	3'
	Flavi NS5 F (ZFW)	5'	TSKSYCCMTACAYSMSNRMW	3'
Flavi 6	Flavi ENVEL S (ZFW) M	5'	TTGGMAAAGGRAGYMT	3'
	Flavi ENVEL R (ZFW)	5'	YAAAYTTRGRCATGYSWCM	3'
	Flavi ENVEL F (ZFW)	5'	RGGYTGGGGMAAYGGHTGYG	3'
Flavi LATED	FlavV P LATED	5'	CYARCCACATRTACCANATTG	3'
	Flavivirus F LATED	5'	TAYAACATGATGGGNAARMGW	3'
	Flavivirus R LATED	5'	NCCYTTKGÇYYTNCCR	3'

Os sete conjuntos de iniciadores desenhados foram avaliados quanto a possibilidade de formação de dímeros e grampos. Nenhum apresentou formação de dímeros ou grampos. Destes, só podemos escolher apenas quatro conjuntos, devidos aos custos de síntese e testes.

Todos os conjuntos deste projeto foram avaliados frente as amostras de cultura Zika - PB81 ZIKA, Febre Amarela - 17DD P4 2018, Dengue 1 - 60305 P6, Dengue 2 - 516803, Dengue 3 - 16562 P4 e Dengue 4 - TVP360 P3, o RNA de WNV MSI-7 CT10 e amostras negativas utilizando as ciclagens descrita no artigo de Patel P. e colaboradores (PATEL; LANDT; KAISER; FAYE *et al.*, 2013) e no manual de instruções do ZDC (Kit molecular ZDC Bio-Manguinhos).

Os conjuntos formados por oligonucleotídeos desenhados, cada um contendo pelo menos um par de iniciadores (reverso e avanço) e uma sonda fluorescente, foram nomeados

Flavi 1 a 4 (Quadro 5). Todos foram avaliados em ensaios multiplex para detecção de diferentes espécies do gênero *Flavivirus*.

Quadro 5. Conjuntos de iniciadores e sondas desenhados para formação do sistema de RT-qPCR PAN-FLAVI.

Conjuntos de I+S	Iniciadores Reverso	Iniciadores Avanço	Sonda
Flavi 1	FLAVI NS3 R (ZD)	FLAVI NS3 F (ZD)	FLAVI NS3 S (ZD) M
Flavi 3	FLAVI ENVEL R (FD)	FLAVI ENVEL F (FD)	FLAVI ENVEL S (FD) M
Flavi 4	FLAVI NS1 R (ZW)	FLAVI NS1 F (ZW)	FLAVI NS1 S (ZW) M
Flavi 5	FLAVI NS5 R (ZFW)	FLAVI NS5 F (ZFW)	FLAVI NS5 S (ZFW) M
Flavi LATED	Flavivirus R LATED	Flavivirus F LATED	FlavV P LATED

Legenda: ZD= ZIKV+DENGUE1-4; ZW= ZIKV+WNV; FD=YFV+DENGUE1-4; ZFW=ZIKV+YFV+WNV

Os conjuntos do quadro 5 foram testados e obtiveram desempenho insatisfatório, pois apresentaram ausência de amplificação e baixa sensibilidade. O Flavi 1 que foi desenhado para detectar ZIKV e DENV não conseguiu detectar nenhum dos vírus testados. O Flavi 3, desenhado para detectar ZIKV e WNV conseguiu detectar o ZIKV, porém não conseguiu detectar WNV e detectou DENV com baixa sensibilidade. Flavi 4, foi desenhado para detectar YFV e DENV conseguiu detectar YFV e detectou DENV com baixa sensibilidade. O Flavi 5, desenhado para detectar ZIKV, YFV e WNV conseguiu detectar ZIKV e YFV, porém detectou DENV e WNV com baixa sensibilidade. O Quadro 6 abaixo mostra o resultado dos ensaios realizados.

Quadro 6. Resultados dos testes realizados com os conjuntos de iniciadores e sondas para formação do sistema PAN-FLAVI

	Zika	FA	Dengue 1-4	WNV
Flavi 1	Não Detectável	**NT	Não Detectável	**NT
Flavi 3	**NT	Detectável	*DBS	**NT
Flavi 4	Detectável	**NT	*DBS	Não Detectável
Flavi 5	Detectável	Detectável	*DBS	*DBS
Flavi LATED	Não Detectável	Não Detectável	Não Detectável	Não Detectável

*DBS= Detectável com baixa sensibilidade; **NT= Vírus não testado

Como estes conjuntos desenhados não obtiveram bom desempenho, testamos os conjuntos do artigo de Patel P. e colaboradores (PATEL; LANDT; KAISER; FAYE *et al.*, 2013), listado no Quadro 7. A partir das informações baseadas da bibliografia, selecionamos algumas sequências e estratégias para o ensaio PAN.

Os conjuntos de iniciadores e sondas, selecionados, compuseram 2 sistemas principais para padronização do PAN FLAVI. A diferença entre eles são algumas modificações

nucleotídicas. O Quadro 7 demonstra a sequência de cada iniciador e sonda utilizados na composição dos conjuntos.

Quadro 7. Sequências de iniciadores e sondas utilizados para formação dos conjuntos testados no ensaio PAN-FLAVI (P1.S1-S2 e P2.S1-S2).

Iniciadores e sondas	Sequências	Conjuntos
Flavi patel F	TACAACATGATGGGGAARAGAGARAA	Flavi P1
DEN4 F	TACAACATGATGGGAAACGTGAGAA	
Flavi patel R 2	GTGTCCCAGCCNGCKGTRTCRTC	
Flavi all probe 2	TGGTWTYATGTGGYTNGGRGC BHQ	Flavi S1
Flavi Patel S 2/3	FAM-CCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGC-BHQ	
Flavi Patel S 3/3	FAM-TTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTT- BHQ	
Flavi patel F	TACAACATGATGGGGAARAGAGARAA	Flavi P2
Flavi patel F1	TACAACATGATGGGMAAACGYGARAA	
Flavi patel R 2	GTGTCCCAGCCNGCKGTRTCRTC	
Flavi all probe 2.1	5' TGGTWTYATGTGGYT 3' MGB	Flavi S2
Flavi Patel S 2/3	FAM-CCGTGCCATATGGTATATGTGGCTGGGAGC-BHQ	
Flavi Patel S 3/3	FAM-TTTCTGGAATTTGAAGCCCTGGGTTT- BHQ	

O Quadro 8 demonstra como os dois principais sistemas foram formados a partir de cada conjunto de iniciadores e sondas (P1.S1; P1.S2; P2.S1 e P2.S2).

Quadro 8. Composição dos conjuntos de iniciadores testados no ensaio PAN-FLAVI (P1.S1-S2 e P2.S1-S2).

Conjuntos de I+S	Iniciadores	Sonda
Flavi P P1.S1	FLAVI P1	MIX FLAVI S1
Flavi P P2.S1	FLAVI P2	
Flavi P P1.S2	FLAVI P1	MIX FLAVI S2
Flavi P P2.S2	FLAVI P2	

Comparamos os conjuntos do Quadro 8 com o sistema de detecção já padronizado no LATED, como o ZDC Bio-Manguinhos e com o método *in house* de C. Domingo e colaboradores (DOMINGO; PATEL; YILLAH; WEIDMANN *et al.*, 2012). Os testes com todos os conjuntos tiveram desempenho satisfatório e equivalentes, apresentando curvas de amplificação específicas para cada um dos vírus testados, sem perfil de inespecificidade, porém com muita necessidade de melhoria na cinética das reações para alguns flavivírus. Sendo assim, os sistemas de detecção foram otimizados, com alterações nas concentrações dos oligonucleotídeos e alterações nas ciclagens, a fim de definir o melhor sistema e os critérios de análises que foram utilizados em todos os testes.

Os primeiros testes realizados foram feitos com duas ciclagens: ciclagem do artigo e ciclagem ZDC modificada (Tabela 2). Podemos observar nas figuras 7 e 8 como as curvas ficaram tremidas e com diferentes níveis de platô, demonstrando a diferença do resultado das curvas diante das duas ciclagens utilizadas e a necessidade de padronização.

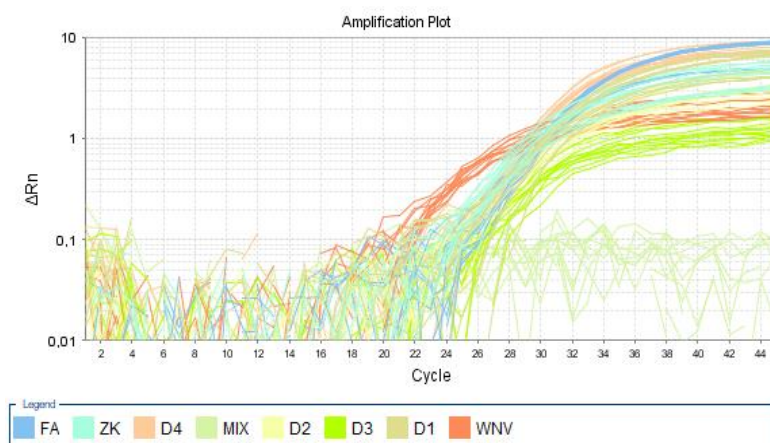


Figura 8. Gráfico do ensaio PAN-FLAVI com a ciclagem do artigo (tabela 2)

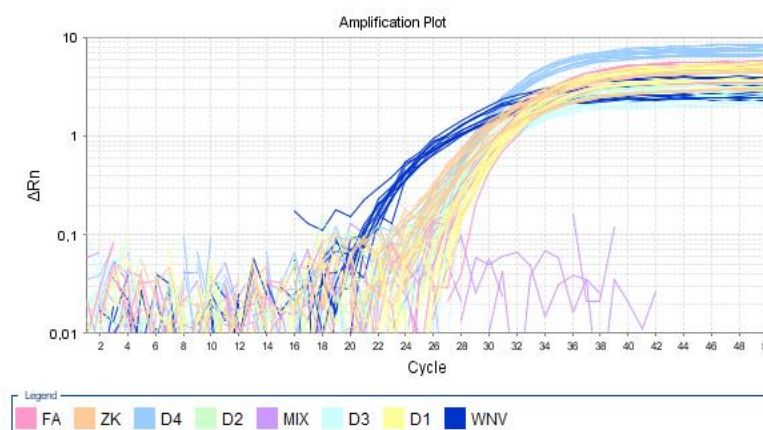


Figura 8. Gráfico do ensaio PAN-FLAVI com a ciclagem ZDC modificada (tabela 2)

A partir da ciclagem de ZDC modificada, a otimização dos sistemas foi avaliada levando-se em consideração a cinética de reação dos ensaios, analisando cada perfil de curva. Os conjuntos de iniciadores e sondas dentre todas as combinações testadas que apresentou melhor desempenho foram os que compõe o sistema FLAVI P P1.S1. Esta constatação se baseou na melhor cinética de amplificação para cada um dos flavivírus testados, e no melhor sinal de fluorescência detectado pelo software do equipamento 7500 Real Time PCR. Nas Figuras 9 e 10 podemos observar as curvas de amplificação de dois sistemas para cada flavivírus testado.

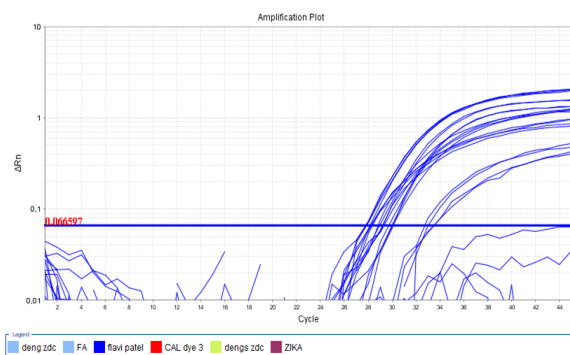


Figura 10. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio com o sistema Flavi P P1.S1

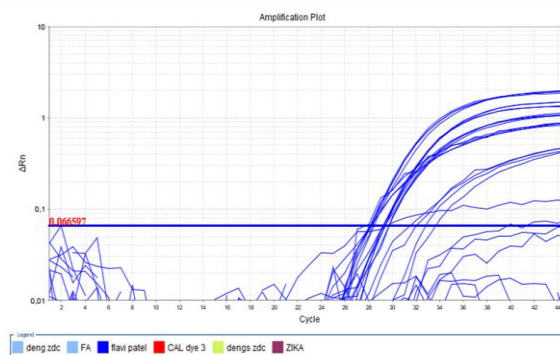


Figura 10. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio com o sistema Flavi P P2.S1

O conjunto Flavi P P1.S1 apresentou melhor desempenho se mostrando promissor para otimização do sistema PAN-FLAVI, pois foi o que gerou melhor equilíbrio estequiométrico da reação.

4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PAN FLAVI

O conjunto de detecção Fl P P1.S1, selecionado por apresentar melhores resultados nos testes preliminares, foi otimizado com amostras negativas e positivas para flavivírus, visando avaliar a especificidade e sensibilidade. O objetivo era definir os critérios de análise do ensaio PAN-FLAVI, utilizando o equipamento 7500 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Após as otimizações do conjunto escolhido, foi definida a melhor ciclagem: 50°C por 15min, 95°C por 2min e 45 ciclos de 95°C por 10s e 53°C por 30s. Também foi definido a mistura de PCR ideal, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes da mistura de PCR para o sistema PAN-FLAVI.

Mistura de PCR - Sistema PAN-FLAVI	
Reagentes	Volume
Mistura de PCR: Pathogen (4X)	3,25µl
Referência Passiva: Rox	0,025µl
Iniciador avanço: Flavi patel F (10 µM)	0,60µl
Iniciador avanço: DENV 4 F (10 µM)	0,60µl
Iniciador reverso: Flavi patel R 2 (10 µM)	0,83µl
Sonda principal: Flavi all probe 2 (10 µM)	0,83µl
Sonda secundária: Flavi Patel S 2/3 YF (10 µM)	0,23µl
Sonda secundária: Flavi Patel S 3/3 D4 (10 µM)	0,15µl
Água	2,99µl
Volume final	10µl

Nas Figuras 11 a 18, observa-se o perfil da curva de cada vírus testado e utilizado no desenvolvimento do PAN-FLAVI após as otimizações.



Figura 11. Perfil da curva de plasma negativo (PN) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

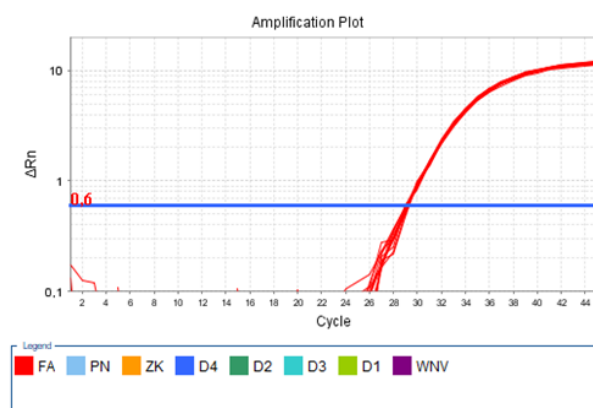


Figura 12. Perfil da curva de YFV (FA) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR

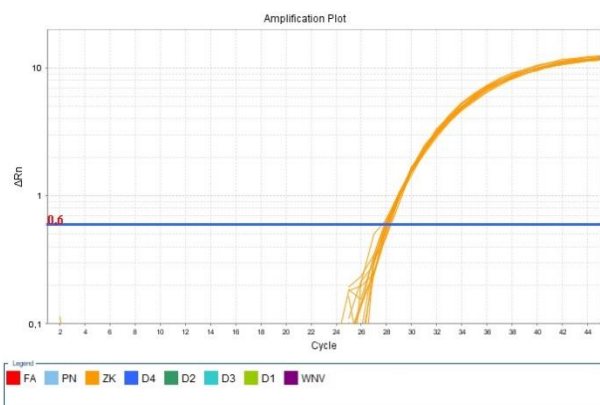


Figura 15. Perfil da curva de ZIKV (ZK) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

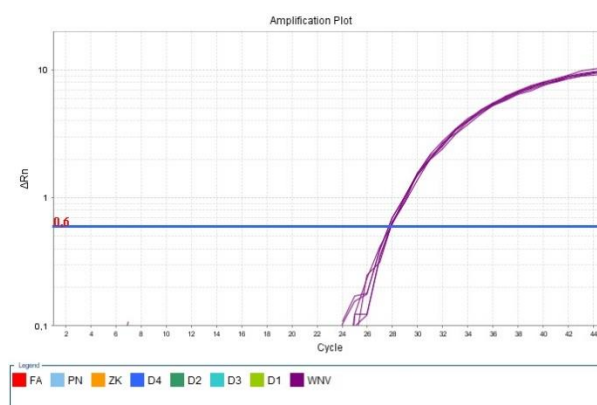


Figura 14. Perfil da curva de WNV após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

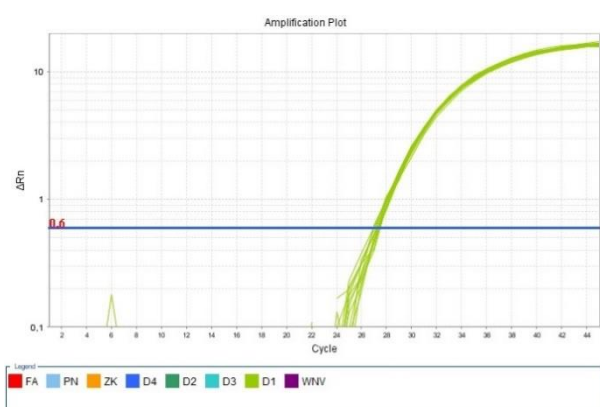


Figura 13. Perfil da curva de DENV-1 (D1) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

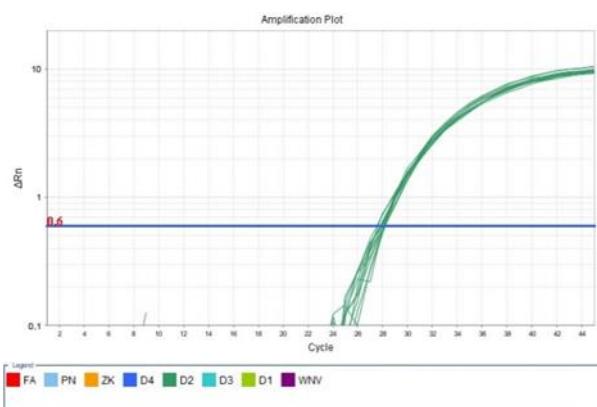


Figura 16. Perfil da curva de DENV-2 (D2) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR

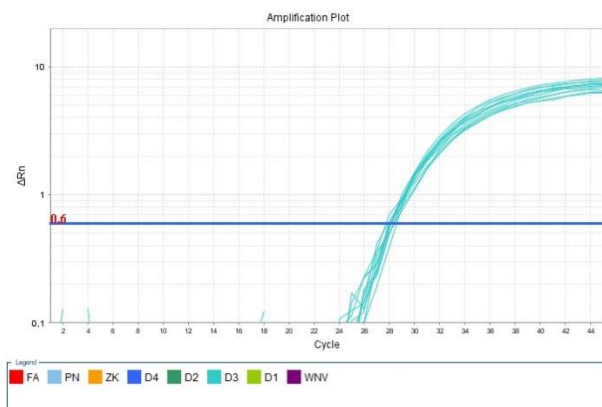


Figura 17. Perfil da curva de DENV-3 (D3) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

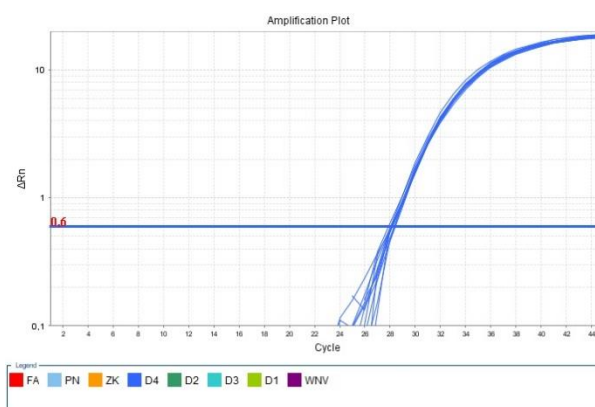


Figura 18. Perfil da curva de DENV-4 (D4) após a otimização do ensaio PAN-FLAVI de RT-qPCR.

Com as otimizações foi possível melhorar o perfil das curvas de amplificação, os sinais de fluorescência e diminuir os ruídos de fundo (*background*)

4.3 CRITÉRIOS DE ANÁLISE

4.3.1 Especificidade

A especificidade do sistema PAN-FLAVI foi avaliada a partir da testagem de 94 amostras verdadeiramente negativas. O Quadro 9 mostra a distribuição das amostras amplificadas em placa óptica de 96 poços.

Quadro 9. Mapa de aplicação de amostras do teste de especificidade para o sistema PAN-FLAVI.

Mapa de aplicação de amostras para teste de especificidade												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FLAVI (D4)	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
B	CN H2O	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
C	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
D	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
E	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
F	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
G	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN
H	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN	PN

* FLAVI (D4) = controle positivo de flavivírus; CN H2O=controle negativo de MIX; PN = Plasma negativo

A Figura 19 apresenta os dados gerados no teste de especificidade do sistema PAN-FLAVI. Obtivemos os seguintes resultados: controle positivo (DENV 4) com valor de C_t de 26,99 (curva azul), controle negativo de reação (CN) com ausência de amplificação inespecífica e, conforme esperado, não houve *background* nem resultado falso positivo em nenhuma das amostras testadas. Todas as amostras verdadeiramente negativas testadas, mostraram resultados não detectáveis no sistema PAN FLAVI.

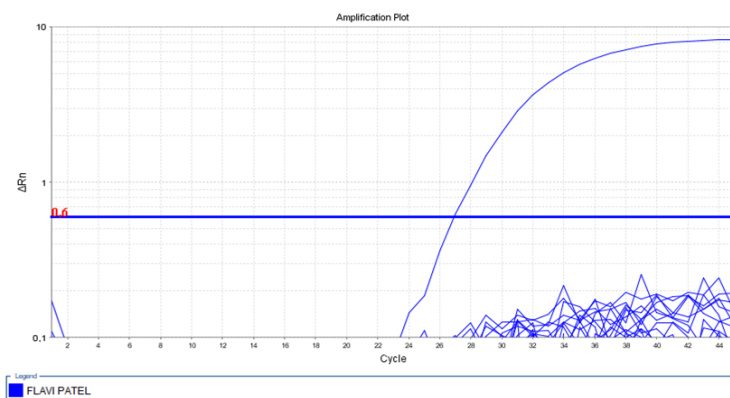


Figura 19. Gráfico da curva de PCR em tempo Real do ensaio de especificidade do sistema de PAN-FLAVI: A: curva do controle positivo (DENV 4) em azul.

Em outra avaliação de especificidade ou reação cruzada para o sistema PAN-FLAVI, testamos amostras positivas para outros patógenos, como: Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Vírus da imunodeficiência humana (HIV), Hepatite C (HCV), Hepatite B (HBV), Malária, Influenza A e B (Inf A e Inf B) e o coronavírus (SARS-COV-2). O Quadro 10 mostra o mapa de aplicação das amostras e Figura 20 mostra a curva de amplificação do alvo molecular DENV-4 (C_t 26,84), utilizado como controle positivo da reação.

Quadro 10. Mapa de aplicação do ensaio de especificidade ou reação cruzada do sistema PAN-FLAVI para outros patógenos.

Mapa amostras	1	2	3	4	5	6
A	CHIKV	HIV	HBV	INF A	SARS-COV2	FLAV (D4)
B	CHIKV	HIV	HBV	INF A	SARS-COV2	FLAV (D4)
C	CHIKV	HIV	HBV	INF A	SARS-COV2	-
D	CHIKV	HIV	HBV	INF A	SARS-COV2	-
E	MAYV	HCV	MALÁRIA	INF B	PN	-
F	MAYV	HCV	MALÁRIA	INF B	PN	-
G	MAYV	HCV	MALÁRIA	INF B	PN	-
H	MAYV	HCV	MALÁRIA	INF B	PN	-

PN= controle negativo; FLAV (D4) Controle positivo de DENV-4

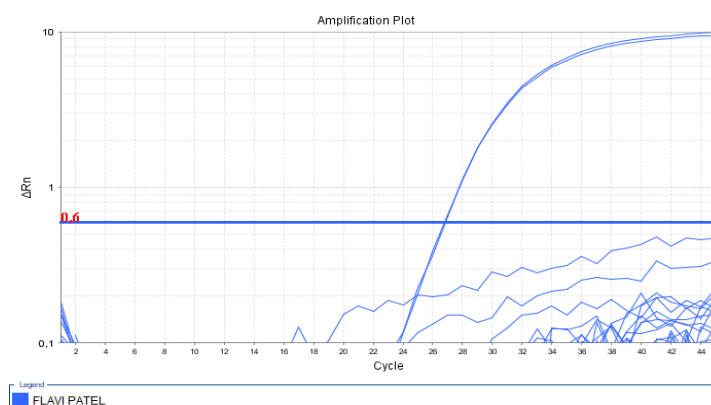


Figura 20. Gráfico da curva de PCR em tempo Real do ensaio de especificidade a outros patógenos, como: CHIKV, MAYV, HIV, HCV, HBV, Inf A e Inf B e SARC-COV-2. Controle positivo: DENV 4.

Conforme esperado, não foram observadas amplificações inespecíficas nas amostras positivas para os outros patógenos sem gerar resultados falso positivos.

4.3.2 Sensibilidade do Sistema PAN-FLAVI

O limite de detecção (LOD – “*Lower limit of detection*”) para o alvo flavivírus, foi avaliado utilizando-se os vírus de cultura ZIKV, YFV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Com base na estimativa em PFU/mL de cada uma das culturas, foram realizadas diluições seriadas para cada um dos vírus, com no mínimo 8 replicatas de cada concentração.

Para verificação da sensibilidade de ZIKV, uma curva de diluição seriada de 10 pontos, com oito a 16 replicatas de cada concentração, foi avaliada: 8,58E+03; 1,72E+03; 3,43E+02; 1,72E+02; 8,58E+01; 4,29E+01; 2,14E+01; 1,07E+01; 5,36E+00; 2,68E+00 PFU/mL. O sistema PAN-FLAVI foi capaz de detectar todas as replicatas, até a concentração 2,14E+01 PFU/mL, com uma variação não significativa de *Ct* entre as replicatas, indicando linearidade satisfatória da amostra. Os resultados do ensaio de LOD para ZIKV encontram-se detalhados na tabela 4.

Tabela 4. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/detecção de ZIKV com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição

LOD ZIKV							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	<i>Ct</i> mín.	<i>Ct</i> máx.	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil. 1	10	8,58E+03	27,67	28,74	28,34	0,28	16X16
Dil. 2	5	1,72E+03	30,44	31,10	30,78	0,23	16X16
Dil. 3	5	3,43E+02	32,46	33,44	33,00	0,34	16X16
Dil. 4	2	1,72E+02	33,37	34,37	33,83	0,32	16X16
Dil. 5	2	8,58E+01	34,35	36,40	35,39	0,55	16X16

Dil. 6	2	4,29E+01	36,07	37,67	36,54	0,38	16X16
Dil. 7	2	2,14E+01	36,34	38,54	37,22	0,62	16X16
Dil. 8	2	1,07E+01	37,10	39,81	38,38	0,71	15X16
Dil. 9	2	5,36E+00	38,33	40,32	39,12	0,70	8 X 8
Dil. 10	2	2,68E+00	38,25	40,06	39,23	0,81	5 X 8

Na concentração igual ou inferior a 1,07E+01 PFU/mL, observou-se perda de reprodutibilidade entre as replicatas e uma variação significativa de 2,72 *Cts* na diluição 8.

Para verificação da sensibilidade de YFV, uma curva de diluição seriada de 08 pontos, com oito replicatas de cada concentração, foi avaliada: 1,50E+03; 3,00E+02; 6,00E+01; 1,50E+01; 6,00E+00; 7,50E+00; 3,75E+00; 1,88E+00 PFU/mL. Observamos que o sistema foi capaz de detectar todas as replicatas testadas até a concentração 7,50E+00 PFU/mL, porém com uma variação significativa de 2,96 *Cts* entre as replicatas na diluição 5 (conforme Tabela 5).

Tabela 5. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de YFV com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.

LOD YFV							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	Ct min	Ct máx	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil. 1	10	1,50E+03	29,50	30,01	29,67	0,17	8 X 8
Dil. 2	5	3,00E+02	31,35	32,98	32,21	0,45	8 X 8
Dil. 3	5	6,00E+01	33,86	35,05	34,48	0,43	8 X 8
Dil. 4	2	1,50E+01	34,84	36,12	35,46	0,53	8 X 8
Dil. 5	2	6,00E+00	35,49	38,44	36,78	0,88	8 X 8
Dil. 6	2	7,50E+00	35,78	38,02	37,20	0,77	8 X 8
Dil. 7	2	3,75E+00	37,96	40,06	39,02	0,91	6 X 8
Dil. 8	2	1,88E+00	38,02	38,02	38,02	*	1 X 8

*não foi possível calcular, pois só detectou 1 replicata.

Na concentração igual ou inferior a 3,75E+00 PFU/mL observou-se a perda de reprodutibilidade entre as replicatas e não houve variação significativa de *Cts* entre as replicatas desta concentração. Na concentração 1,88E+00 PFU/mL não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas 01 das 08 replicatas foi detectada.

Para verificação da sensibilidade de DENV-1, uma curva de diluição seriada de 09 pontos, com oito a 16 replicatas de cada concentração, foi avaliada: 1,00E+03; 2,00E+02; 1,00E+02; 5,00E+01; 2,50E+01; 1,25E+01; 6,25E+00; 3,13E+00; 1,56E+00 PFU/mL. Observamos que o sistema foi capaz de detectar todas as replicatas testadas até a concentração

6,25E+00 PFU/mL com uma variação significativa de 3,27 *Cts* e 2,88 *Cts* entre as replicatas da diluição 6 e 7, respectivamente. (conforme tabela 6).

Tabela 6. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-1 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.

LOD DENV-1							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	Ct min	Ct máx	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil. 1	10	1,00E+03	30,19	31,14	30,69	0,30	16 X 16
Dil. 2	5	2,00E+02	31,83	33,24	32,72	0,39	16 X 16
Dil. 3	5	1,00E+02	32,65	34,66	33,67	0,51	16 X 16
Dil. 4	2	5,00E+01	34,11	35,42	34,76	0,36	16 X 16
Dil. 5	2	2,50E+01	35,14	37,03	35,99	0,53	16 X 16
Dil. 6	2	1,25E+01	36,40	39,66	37,47	0,83	16 X 16
Dil. 7	2	6,25E+00	37,63	40,52	38,28	0,83	16 X 16
Dil. 8	2	3,13E+00	38,32	40,41	39,18	0,83	7 X 8
Dil. 9	2	1,56E+00	40,21	40,69	40,44	0,18	7 X 8

Na concentração igual ou inferior 3,13E+00 PFU/mL, observou-se perda de reprodutibilidade entre as replicatas, porém não houve variação significativa de *Ct* entre as replicatas.

Para verificação da sensibilidade de DENV-2, uma curva de diluição seriada de 09 pontos, com oito a 16 replicatas de cada concentração, foi avaliada: 1,71E+03; 3,43E+02; 1,71E+02; 8,57E+01; 4,29E+01; 2,14E+01; 1,07E+01; 5,36E+00; 2,68E+00 PFU/mL. Observamos que o sistema foi capaz de detectar todas as replicatas testadas até a concentração 5,36E+00 PFU/mL, com uma variação significativa de 4,68 *Cts* e 3,97 *Cts* entre as replicatas da diluição 7 e 8, respectivamente. (conforme tabela 7).

Tabela 7. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-2 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.

LOD DENV-2							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	Ct min	Ct máx	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil. 1	10	1,71E+03	30,14	31,90	31,22	0,62	16 X 16
Dil. 2	5	3,43E+02	32,01	33,79	32,97	0,70	16 X 16
Dil. 3	5	1,71E+02	33,20	34,91	34,20	0,56	16 X 16
Dil. 4	2	8,57E+01	34,08	36,07	35,28	0,58	16 X 16
Dil. 5	2	4,29E+01	35,65	37,57	36,77	0,52	16 X 16
Dil. 6	2	2,14E+01	36,62	38,65	37,48	0,58	16 X 16

Dil. 7	2	1,07E+01	36,29	40,97	38,21	1,27	16 X 16
Dil. 8	2	5,36E+00	38,82	42,80	40,37	1,41	8 X 8
Dil. 9	2	2,68E+00	40,01	42,13	40,99	0,92	6 X 8

Na concentração 2,68E+00 PFU/mL, observou-se perda de reprodutibilidade entre as replicatas, porém não houve variação significativa de *Ct* entre as replicatas.

Para verificação da sensibilidade de DENV-3, uma curva de diluição seriada de 09 pontos, com 16 replicatas de cada concentração, foi avaliada: 1,50E+03; 3,00E+02; 1,50E+02; 7,50E+01; 3,75E+01; 1,88E+01; 9,38E+00; 4,69E+00; 2,34E+00 PFU/mL. Observamos que o sistema foi capaz de detectar todas as replicatas testadas até a concentração 9,38E+00 PFU/mL com uma pequena variação de *Ct* entre as replicatas (conforme tabela 8).

Tabela 8. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteção de DENV-3 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.

LOD DENV-3							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	Ct min	Ct máx	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil. 1	10	1,50E+03	30,51	31,83	31,26	0,44	16 X 16
Dil. 2	5	3,00E+02	32,96	33,81	33,40	0,25	16 X 16
Dil. 3	5	1,50E+02	33,68	35,08	34,35	0,36	16 X 16
Dil. 4	2	7,50E+01	34,69	36,08	35,39	0,41	16 X 16
Dil. 5	2	3,75E+01	35,69	37,65	36,51	0,55	16 X 16
Dil. 6	2	1,88E+01	36,44	38,82	37,37	0,60	16 X 16
Dil. 7	2	9,38E+00	37,81	39,86	38,55	0,64	16 X 16
Dil. 8	2	4,69E+00	38,14	40,49	39,32	0,93	15 X 16
Dil. 9	2	2,34E+00	38,82	43,15	40,96	1,60	10 X 16

Na concentração igual ou inferior 4,69E+00 PFU/mL, observou-se perda de reprodutibilidade entre as replicatas e observou-se variação significativa de 4,3 *Cts* entre as replicatas da diluição nove.

Para verificação da sensibilidade de DENV-4, uma curva de diluição seriada com 09 pontos, com 08 replicatas de cada concentração, foi avaliada: 5,00E+02; 2,50E+02; 1,25E+02; 6,25E+01; 3,13E+01; 1,56E+01; 7,81E+00; 3,91E+00; 1,95E+00 PFU/mL. Observamos que o sistema foi capaz de detectar todas as replicatas testadas até a concentração 1,56E+01 PFU/mL, porém com uma variação significativa de 3,23 *Cts* e 2,80 *Cts* entre as replicatas da diluição dois e seis, respectivamente (conforme tabela 9).

Tabela 9. Resultado das replicatas de cada concentração da curva de LOD com a amplificação/deteccção de DENV-4 com o sistema PAN-FLAVI. Quantidade de replicatas detectadas em cada diluição.

LOD DENV-4							
Amostra	Fator diluição	PFU/mL	Ct min	Ct máx	Média	Desvio Padrão	Replicatas
Dil 1	10	5,00E+02	28,76	29,10	28,95	0,14	8 X 8
Dil 2	5	2,50E+02	30,30	31,72	31,13	0,53	8 X 8
Dil 3	5	1,25E+02	33,52	34,37	33,85	0,30	8 X 8
Dil 4	2	6,25E+01	34,13	35,84	35,06	0,55	8 X 8
Dil 5	2	3,13E+01	35,20	36,55	35,88	0,48	8 X 8
Dil 6	2	1,56E+01	35,94	38,73	37,46	0,95	8 X 8
Dil 7	2	7,81E+00	36,21	38,50	37,80	0,98	5 X 8
Dil 8	2	3,91E+00	37,11	39,28	37,98	0,92	5 X 8
Dil 9	2	1,95E+00	38,58	38,81	38,71	0,11	4 X 8

Na concentração 7,81E+00 PFU/mL, observou-se perda de reprodutibilidade entre as replicatas, e houve variação significativa de 2,84 Cts entre as replicatas da diluição sete.

Os dados obtidos na avaliação de limite de sensibilidade dos alvos moleculares ZIKV, YFV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram utilizados na análise de *Probit*. Os valores calculados para os intervalos de confiança e positividade de 50% e 95% estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10. Resultados do *Probit* com positividade de 50% e 95%, para amostras de ZIKA, FA, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os valores estão expressos em PFU/mL.

Análise de <i>Probit</i> em 95% e 50% de positividade com IC de 95%		
	95%	50%
ZIKV	13,41	4,32
YFV	7,02	2,75
DENV-1	3,22	0,58
DENV-2	5,31	1,59
DENV-3	5,11	1,95
DENV-4	18,95	2,59

A análise de *Probit*, com positividade de 95%, indicou que o sistema PAN-FLAVI é capaz de detectar os alvos moleculares até os seguintes valores de limite de deteccção: 13,41 PFU/ml para ZIKV; 7,02 PFU/ml para YFV; 3,22 PFU/ml para DENV-1; 5,31 PFU/ml pra DENV-2; 5,11 PFU/ml para DENV-3; 18,95 PFU/ml para DENV-4. O sistema padronizado

PAN-FLAVI, apresentou resultados satisfatórios e com boa sensibilidade, demonstrando a eficiência na detecção de cargas virais médias e baixas.

4.3.3 Repetibilidade

O critério repetibilidade foi avaliado com uma concentração de cada um dos seguintes vírus de cultura: ZIKV (8,58E+03 PFU/mL), YFV (1,50E+03 PFU/mL), DENV-1 (2,00E+03 PFU/mL), DENV-2 (3,43E+03), DENV-3 (3,00E+03 PFU/mL), DENV-4 e WNV (sem quantificação). Foram testadas 12 replicatas de cada vírus, exceto o WNV, que teve apenas 6 replicatas avaliadas.

Cada vírus foi amplificado com o sistema de detecção PAN FLAVI em 3 ensaios distintos, sob as mesmas condições e no mesmo equipamento de PCR em tempo real. (Conforme tabela 11). A repetibilidade foi estabelecida, sob as mesmas condições de medição, pelo mesmo observador, sob as mesmas condições de operação e no mesmo local, durante um curto período. O ensaio foi realizado de acordo com as diretrizes RDC N° 27/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde (MS, 2012).

Tabela 11. Teste de Repetibilidade do Ensaio PAN-FLAVI com os vírus ZIKV, YFV, DENV1 a DENV-4 e WNV. Média em Ct dos 3 ensaios, desvio padrão e coeficiente de variação (CV) dos vírus testados.

Teste de repetibilidade							
	ZIKV	YFV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	WNV
PFU/mL	8,58E+03	1,50E+03	2,00E+03	3,43E+03	3,00E+03	5,00E+02	-
Ct - Ensaio 1	28,34	28,89	27,50	28,31	28,63	28,45	28,06
	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(6 de 6)
Ct - Ensaio 2	28,06	28,69	27,21	27,93	28,19	28,25	27,89
	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(6 de 6)
Ct - Ensaio 3	28,50	29,20	27,65	28,29	28,64	28,57	28,42
	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(12 de 12)	(6 de 6)
Média dos ensaios (Ct)	28,30	28,93	27,45	28,18	28,49	28,42	28,12
Desvio Padrão (Ct)	0,22	0,26	0,22	0,21	0,26	0,16	0,27
CV (%)	0,79	0,88	0,81	0,76	0,91	0,56	0,97
EPR (%)	0,86	0,82	0,89	0,88	1,06	0,61	0,84

A precisão e a exatidão do ensaio PAN-FLAVI também foram calculadas de acordo com as diretrizes da RDC n°27 de 2012 onde a precisão é expressa pelo coeficiente de variação

(CV%), e a exatidão expressa pelo erro padrão relativo (ERP%) não se admitindo valores superiores a 15% para as duas análises.

Observa-se que os resultados da precisão e exatidão do ensaio do PAN-FLAVI estão dentro das normas. CV (%) de 0,79 para ZIKV, 0,88 para YFV, 0,81 para DENV-1, 0,76 para DENV-2; 0,91 para DENV-3; 0,56 para DENV-4 e 0,97 para WNV, os quais todos os resultados foram abaixo de 1% de CV. EPR% de 0,86 para ZIKV, 0,82 para YFV, 0,89 para DENV-1, 0,88 para DENV-2, 1,06 para DENV-3, 0,61 para DENV-4 e 0,84 para WNV.

As Figuras 21, 22 e 23 ilustram a cinética das curvas de amplificação dos ensaios 1, 2 e 3 respectivamente.

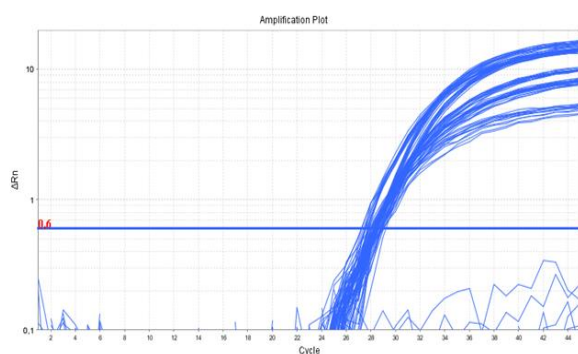


Figura 22. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 1 do teste de repetibilidade.

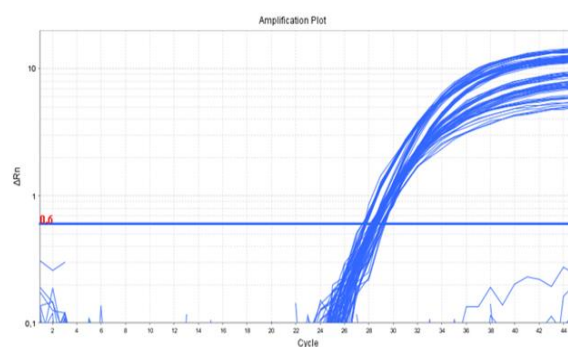


Figura 21. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 2 do teste de repetibilidade.

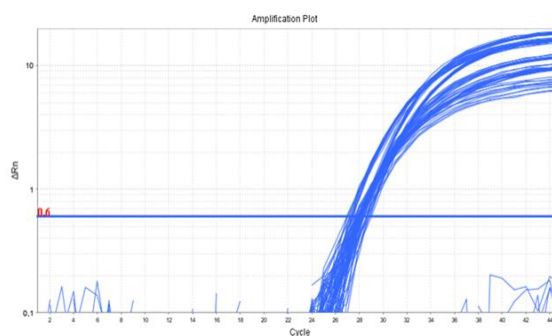


Figura 23. Gráfico da curva de PCR em tempo real do ensaio 3 do teste de repetibilidade.

Observamos que os três testes apresentaram resultados semelhantes em termos de média de valores de C_t das amostras avaliadas. O número total de replicatas dos vírus de cultura avaliados foi detectado nos três ensaios.

4.3.4 Interferentes

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de interferentes na reação de qPCR do sistema de detecção PAN FLAVI, amplificamos amostras negativas e positivas para DENV na presença dos componentes do painel comercial kit *Thermo Scientific™ AcroMetrix Inhibition Panel* (REF 956400). Este painel foi estabelecido para simular condições clínicas como hemólise, icterícia e lipemia, encontradas em amostras de soro, plasma ou sangue total. Assim, foi possível realizar a análise de diversos tipos de interferentes e avaliar a ocorrência ou não de amplificação inespecífica.

Para o teste de interferentes com o sistema PAN FLAVI, utilizamos como amostras negativas plasma humano negativo, e como amostras positivas para flavivírus DENV-1 (*Ct* 26,6) e DENV-4 (*Ct* 26,9). Os resultados obtidos nesta avaliação estão demonstrados na tabela 12.

Tabela 12. Análise de substâncias interferentes na amplificação dos alvos do ensaio PAN-FLAVI: *Ct* dos alvos DENV-1 e DENV-4.

	Resultado DENV-1	Resultado DENV-4
CN	ND	ND
Plasma Negativo + CP	27,26	27,86
Plasma EDTA	ND	ND
Hemólise fraca	ND	ND
Hemólise média	ND	ND
Hemólise forte	ND	ND
Plasma heparinizado	ND	ND
Plasma lipêmico	ND	ND
Plasma icterico	ND	ND
Plasma EDTA + FLAV	27,36	27,88
Hemólise fraca + FLAV	29,22	30,69
Hemólise média + FLAV	30,10	31,58
Hemólise forte + FLAV	30,25	32,39
Plasma heparinizado + FLAV	-	-
Plasma lipêmico + FLAV	34,25	31,96
Plasma icterico + FLAV	27,31	27,91

CN: Controle negativo / CP: Controle positivo

De acordo com os resultados apresentados acima, observamos que as amostras negativas na presença de: plasma coletado em EDTA, coletado em heparina, com hemólise

fraca, com hemólise média, com hemólise forte, lipêmico e icterico não apresentaram resultados inespecíficos ou resultado falso-positivo.

O plasma coletado com EDTA não interferiu na amplificação das amostras positivas DENV-1 e DENV-4. Os valores de *Ct* para estas amostras na presença e na ausência de plasma EDTA são muito próximos, como podemos observar na tabela 12.

Ao analisarmos os resultados obtidos a partir da amplificação das amostras com o interferente baixo grau de hemólise, observou-se uma perda de sensibilidade (diferença de 1,96 *Cts* para o controle DENV-1 e 2,83 *Cts* para o controle DENV-4), quando comparamos os resultados destas amostras positivas sem o interferente hemolítico. Para amostras com o interferente médio grau de hemólise, houve perda de sensibilidade (diferença de 2,84 *Cts* pra DENV-1 e 3,72 *Cts* para DENV-4). As amostras positivas avaliadas na presença do interferente alto grau de hemólise geraram resultados com maior diferença de valor *Ct*, quando comparados os resultados obtidos com as mesmas amostras na ausência deste interferente (2,99 *Cts* pra DENV-1 e 4,53 *Cts* para DENV-4). Estes dados demonstram que, quanto maior o grau de hemólise da amostra, maior foi a inibição da reação de qPCR pelo sistema PAN-FLAVI.

As amostras de DENV-1 e DENV-4, contendo o interferente plasma lipêmico, também apresentaram perda de sensibilidade, quando comparados os resultados obtidos com as mesmas amostras na ausência deste interferente (6,99 e 4,1 *Cts* respectivamente). Já as amostras contendo o interferente plasma icterico, não apresentaram perda na sensibilidade, quando comparados os resultados obtidos com as mesmas amostras na ausência deste interferente.

De acordo com os dados obtidos, observamos que houve inibição na amplificação das amostras DENV-1 e DENV-4 na presença do interferente plasma heparinizado.

4.3.5 Resultado das amostras positivas testadas com o sistema PAN-FLAVI

As amostras foram gentilmente cedidas pelos laboratórios: LATHEMA e LABFLA do IOC; LATED de Bio-Manguinhos e LAVMOAN da UFRJ. Tais amostras foram avaliadas frente ao ensaio PAN-FLAVI, e os resultados obtidos em *Ct* foram comparados com os resultados dos ensaios espécie-específicos. Estes ensaios são os utilizados pelos laboratórios de referência e pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs).

O painel de amostras de YFV foi composto por 07 amostras de genótipos distintos, dentre essas, amostras de cultura viral, de primata e de mosquitos. Para comparação da detecção de YFV foi utilizado o método *in house* de Domingo C. e colaboradores. (Tabela 13)

Tabela 13. Resultado das amostras de YFV comparando o sistema PAN-FLAVI com o método *in house* de Domingo C. e colaboradores. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.

Amostra/ CEPA	Vírus	Genótipo/ Linhagem	Genbank	Outras informações	PAN-FLAVI	FA DOMINGO	Diferença de Ct
					Ct Médio	Ct Médio	
S79-P4 (YFV-S79)	FEBRE AMARELA	Leste africano	-	(cultura viral) coleta 9/12/14 - isolada de um caso humano no Senegal em 1979	16,06	15,81	0,25
IEC-4408 (YFV-4408)	FEBRE AMARELA	Sul Americano I linhagem 1E	KY861728.1	(cultura viral) Isolada do bugio <i>Alouatta sp.</i> , no Rio Grande do Sul, em 2008	15,88	16,96	-1,08
ES04 5p 5dpi 14/05/18	FEBRE AMARELA	Sul Americano I linhagem 1E	KY885000	(cultura viral) <i>Alouatta clamitans</i> 20/02/2017 <i>Areinha, Domingos Martins – ES</i>	13,56	14,67	-1,11
YFV-74018 MG	FEBRE AMARELA	Sul Americano I linhagem 1D	-	(cultura viral) isolados de um caso fatal humano em 2001	15,22	16,73	-1,51
fígado de <i>Alouatta caraya</i>	FEBRE AMARELA	Sul Americano I - linhagem 1E	MK333803	(amostra de primata) bugio-macaco de Nova Crixás, Goiás em abril de 2017	15,98	16,86	-0,88
Hg. janthinomys/ capricornii	FEBRE AMARELA	Sul Americano I - linhagem 1E	-	(amostra do mosquito) <i>pool</i> de 5 coletado no dia 26/01/2018 em Valença, RJ	16,96	17,44	-0,48
fêmeas Hg. <i>leucocelaenus</i>	FEBRE AMARELA	Sul Americano I - linhagem 1E	MF423373	(amostra do mosquito) <i>Hg. leucocelaenus pool</i> de 5 fêmeas - Domingos Martins ES coletado em 23/02/2017	24,20	24,87	-0,67

Na Tabela 13 podemos observar os valores de Ct médio das amostras de YFV. O PAN-FLAVI foi capaz de detectar todas as amostras. Os valores de Ct variaram entre 0,25 a -1,51, mostrando que o sistema genérico foi um pouco mais sensível que o método *in house* de Domingo C., *et al.* 2012.

O painel de amostras de DENV foi composto por 25 amostras, sendo 06 DENV-1, 13 de DENV-2, 03 DENV-3, 03 de DENV-4, com exemplos de genótipos e linhagens diferentes, sendo todas amostras de cultura de células. Para comparação da detecção de DENV-1 a DENV-4 foi utilizado o Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos (Registro Anvisa – 0992976222). (Tabela 14)

Tabela 14. Resultado das amostras de DENV comparando o sistema PAN-FLAVI com o Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.

Amostra/CEPA	VIRUS	Genótipo/ Linhagem	Genbank	Outras informações	PAN- FLAVI	SOROTIPAGEM DENGUE				Diferença de Ct
					Ct Médio	Dengue 1	Dengue 2	Dengue 3	Dengue 4	
DENV-1										
LINHAGEM II 1266/2011 c6/36 #142 29/8/13	DENGUE 1	genótipo V	KF672760	-	15,07	8,84	ND	ND	ND	6,23
Denv 1 mv 17 07/11/2017	DENGUE 1	-	-	-	15,58	8,70	ND	ND	ND	6,89
Denv 1 1435 LII 2004	DENGUE 1	-	-	-	28,25	24,34	ND	ND	ND	3,91
Denv 1 BH 14dpi Ae. aegypti	DENGUE 1	-	-	-	17,75	14,66	ND	ND	ND	3,09
Denv 1 L1 36034 2013	DENGUE 1	-	-	-	11,54	7,13	ND	ND	ND	4,42
D1 MOSQUITO 1986	DENGUE 1	-	-	-	14,26	9,94	ND	ND	ND	4,32
<i>Aedes aegypti</i> formosus infectado de Boulbinet, Guiné	DENGUE 2	-	-	cepa de vírus isolado em 1974 em Bangkok	23,18	ND	18,62	ND	ND	4,57
mosquito infectado com denv 2 - 15/07/13	DENGUE 2	-	-	-	27,05	ND	21,80	ND	ND	5,25

63139 7/08/14	DENGUE 2	-	-	-	17,63	ND	10,87	ND	ND	6,77
denv 2 0594/10 27/05/2014	DENGUE 2	-	-	-	15,29	ND	8,35	ND	ND	6,94
mosquito 935 em C636 2012	DENGUE 2	-	-	0935/2012 16/01/2012 1 1 fêmea de <i>Ae. aegypti</i> (1274) – Isol: DENV-2, PCR: DENV-2, Pcr Cult.: DENV-2	18,19	ND	10,98	ND	ND	7,21
16681 07/05/2012	DENGUE 2	-	-	-	17,49	ND	10,36	ND	ND	7,13
HAI 212 DENGUE 2	DENGUE 2	Americano/Asiático	-	amostra HAI 212, obtida de soro de paciente (Iquitos, Peru)	14,23	ND	8,86	ND	ND	5,36
Denv 2 sorgine	DENGUE 2	-	-	-	14,49	ND	9,76	ND	ND	4,73
Denv 2 - 38574 25/01/10 br-pe /97	DENGUE 2	Sudeste Asiático	EU259580	38574/BR-PE/97 1997/3 Arcoverde	17,23	ND	ND	ND	ND	#
D2 ban S15	DENGUE 2	-	-	-	11,92	ND	7,36	ND	ND	4,56
D2 66985 18/8/15	DENGUE 2	Sudeste Asiático/ Americano linhagem 1	HQ012518	cepa BR/RJ66985/2000 isolada no rio de janeiro em 2000.	14,10	ND	8,51	ND	ND	5,59
D2 0594	DENGUE 2	-	-	-	31,99	ND	26,16	33,64	30,25	5,82
Dengue 2/98 63444	DENGUE 2	Sudeste Asiático/ Americano linhagem 1	GQ368173	1998/BR/63444 Rio de Janeiro	16,59	ND	10,70	ND	ND	5,88
Denv 3 74886 01/5/15	DENGUE 3	Genótipo III (Subcontinente Indiano)	AY679147	BR74886/RJ/2000	21,71	ND	ND	17,18	ND	4,53

BR73356 D3	DENGUE 3	Genótipo III (Subcontinente Indiano)	JN383345	Mosquito BR73356/01 RJ 2001	14,82	ND	ND	9,94	ND	4,88
BR73354/01 dengue 3	DENGUE 3	Genótipo III (Subcontinente Indiano)	FJ177308	Mosquito BR73354/01 RJ 2001	13,87	ND	ND	9,11	ND	4,76
3712	DENGUE 4	-	-	-	22,71	ND	ND	ND	15,74	6,97
628 inoc 21/07/14	DENGUE 4	-	-	-	15,14	ND	ND	ND	8,78	6,36
D4 8112/14	DENGUE 4	-	-	-	25,36	ND	ND	ND	18,60	6,76

Na Tabela 14 podemos observar os valores de C_t médio das amostras de DENV. O PAN-FLAVI foi capaz de detectar todas as amostras. Os valores de C_t variaram entre 7,2 a 3,09, mostrando que o sistema genérico foi menos sensível que o Kit Molecular ZC D-Tipagem Bio-Manguinhos, porém este Kit deixou de detectar 01 amostra de DENV-2.

O painel de amostras de ZIKV foi composto por 07 amostras de genótipos distintos, dentre essas, amostras de cultura viral e de mosquitos. Para comparação da detecção de ZIKV foi utilizado o Kit molecular ZDC Bio-Manguinhos (Registro Anvisa – 80142170032) (Tabela 15).

Tabela 15. Resultado das amostras de ZIKV comparando o sistema PAN-FLAVI com o Kit molecular ZDC Bio-Manguinhos. Resultados em Ct com a diferença em Ct dos sistemas utilizados.

Amostra/CEPA	VIRUS	Genótipo/ Linhagem	Genbank	Outras informações	PAN-FLAVI	ZC	Diferença de Ct
					Ct Médio	Ct Médio	
Aedes aegypti URCA 17S	ZIKA	Asiático	KU926310.2	(amostra de mosquito) Infecção com amostra saliva humana Brasil 2016. Cepa Rio-S1	18,75	15,76	2,99
Inf 362 e 361 / DaK84	ZIKA	Africano	KU955592	(amostra de mosquito) Fêmeas de <i>Ae. albopictus</i> do Rio de Janeiro infectada artificialmente	19,23	21,41	-2,18
Inf 2716 e 2731 / MASS 66 Malásia	ZIKA	Asiático	KX694533.2	(amostra de mosquito) Fêmeas de <i>Ae. aegypti</i> do Rio de Janeiro infectada artificialmente. <i>Aedes sp.</i> Host: Mosquito 1966-	23,37	20,00	3,37
Inf 1987 e 1992 / MRS_OPY_Martinique_PaRi_2015	ZIKA	Asiático	KU647676	(amostra de mosquito) <i>Ae. albopictus</i> de Natal infectado	20,15	17,30	2,85
Cepa ZIKV / <i>H. sapiens</i> / Brazil / PE243 / 2015	ZIKA	Asiático	KX197192.1	(amostra de mosquito) <i>Ae. aegypti</i> PAEA infectado (07/11/12/14/15)	25,43	24,08	1,35
Strain ES 2916/2015/ID 250	ZIKA	Asiático	KX197205	(cultura viral) 01-Dezembro-2015 Brasil <i>Ae. aegypti</i> do RJ infectado. STRAIN ES 2916/2015/ID 250	29,62	29,12	0,5

Strain ES 2916/2015/ID 250	ZIKA	Asiático	KX197205	(cultura viral)	21,92	18,90	3,02
				01-Dezembro-2015 Brasil <i>Ae. aegypti</i> do RJ infectado STRAIN ES 2916/2015/ID 250			

Na Tabela 15 podemos observar os valores de *Ct* médio das amostras de ZIKV. O PAN-FLAVI foi capaz de detectar todas as amostras. Os valores de *Ct* variaram entre 3,37 a -2,18, mostrando que o sistema genérico foi um pouco menos sensível que o Kit Molecular ZDC Bio-Manguinhos.

O painel de amostras de outros flavivírus que o sistema PAN-FLAVI foi testado para detectar. RNAs de vírus de cultura de SLEV, ILHV e WNV. Porém não foi realizado a comparação com outro sistema espécie específico. (Tabela 16)

Tabela 16. Resultado das amostras de SLEV, ILHV e WNV utilizando o sistema PAN-FLAVI de RT-qPCR..

Amostra/CEPA	VIRUS	Genótipo/ Linhagem	Genbank	Outras informações	PAN-FLAVI Ct Médio
Strain BeAr 23379	SLEV	-	EF158048.1	Brasil	14,33
ILHEV 02L	ILHV	-	AY632539.4	Cepa original	16,33
MSI-7 CT10	WNV	-	MH643887.1	Strain BeAn854747, isolado de cérebro de equino. ES, Brasil 26-Abril-2018	17,33

O sistema PAN-FLAVI foi capaz de detectar os 03 flavivírus SLEV, ILHV e WNV de forma sensível.

5 Discussão

Os vírus do gênero *Flavivirus* transmitidos por artrópodes vetores, globalmente distribuídos, vão ocorrendo e causando considerável morbidade e mortalidade, incluindo hepatite, síndrome do choque vascular, encefalite, paralisia flácida aguda, anormalidades congênitas e morte fetal (PIERSON; DIAMOND, 2020). Além de artrópodes e humanos, os flavivírus também são conhecidos por infectar uma ampla gama de espécies animais e podem ser importantes patógenos veterinários que ameaçam animais domesticados economicamente importantes, além de ameaçar espécies nativas, colocando-as em risco de extinção, como por exemplo os primatas não humanos expostos à YFV (MCLEAN; UBICO; BOURNE; KOMAR, 2002; VENTER, 2018).

A emergência e reemergência dos flavivírus apresenta grandes preocupações para saúde pública em todo o mundo e em países onde ocorre circulação de múltiplos agentes virais, é importante que se faça o diagnóstico dos mesmos, auxiliando dessa forma a vigilância e o controle destas doenças. As técnicas usadas para este fim devem ser rápidas e reprodutíveis. Dessa forma, uma vigilância ampla e sensível, visando uma detecção etiológica, pode servir como triagem para um monitoramento viral em determinadas áreas. As técnicas moleculares utilizadas e a vigilância dos flavivírus devem ser capazes de detectar e identificar uma ampla gama de espécies de flavivírus, com alto nível de especificidade e sensibilidade. Para este propósito, foi desenvolvido um ensaio PAN-FLAVI RT-qPCR capaz de detectar os principais flavivírus circulantes no Brasil, além de outros membros relevantes do gênero e ser uma alternativa para substituição das metodologias *in house* por uma padronizada e registrada pela ANVISA.

Uma vantagem da utilização de um ensaio PAN como triagem é que se pode usá-lo em qualquer região global para detectar rapidamente a presença de uma infecção viral desconhecida. Uma vez que o gênero viral tenha sido identificado, reações de detecções específicas ou reações de sequenciamento podem ser usados para determinar o patógeno responsável pela doença. Isso simplifica e reduz os custos de abordagens amplas de triagem em surtos de doenças ou durante a vigilância de patógenos em humanos, vetores e ou reservatórios (GARAE; KALO; PAKOA; BAKER *et al.*, 2020).

A ferramenta de ensaio PAN pode ainda servir como um alerta prévio aos sistemas de saúde, especialmente nos casos de vírus reemergentes ou emergentes para os quais a população é susceptível e não há vacina disponível (CHIU; COFFEY; MURKEY; SYMMES *et al.*, 2017), triagem de bolsas de sangue e hemoderivados, ou até mesmo, na descoberta de novos flavivírus (FIGUEIREDO; BATISTA; KASHIMA; NASSAR, 1998; PAUVOLID-CORRÊA; SOLBERG; COUTO-LIMA; KENNEY *et al.*, 2015).

No entanto, apesar das diversas vantagens advindas do ensaio PAN, diante de epidemias e surtos endêmicos da região, em que humanos apresentam sintomas semelhantes a síndromes febris o ensaio PAN pode não dar a resposta mais adequada, uma vez que se faz necessária identificação e diagnóstico específico da doença, como acontece em diversas regiões do Brasil endêmicas para dengue, Zika e outras arboviroses (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

Outra aplicação do PAN-FLAVI, seria o monitoramento em bancos de sangue. Segundo o CDC, qualquer patógeno transmitido pelo sangue tem o potencial de ser transmitido por transfusão sanguínea. As infecções causadas por YFV, DENV, WNV e ZIKV estão na lista do CDC das infecções transmitidas por transfusão (ITT) (CDC, 2022b). No Brasil, é realizado apenas uma triagem clínica dos candidatos à doação de sangue e componentes de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério da Saúde (MS 2020b). Brouard e colaboradores (2008) ressaltam que pacientes com sintomas de doenças não podem doar sangue, mas como as arboviroses podem causar infecções assintomáticas, os pacientes podem estar assintomáticos e virêmicos, o que poderia levar à transmissão viral pela transfusão de sangue e/ou derivados. Por consequência, alguns autores recomendam a detecção desses vírus como ferramenta útil para triagem em bolsas de sangue (KIELY; GAMBHIR; CHENG; MCQUILTEN *et al.*, 2017; LIRA; LEVI; BUB; ARAVECCHIA *et al.*, 2021; ROMEIRO; SOUZA; TOLARDO; VIEIRA *et al.*, 2016; TCHUANDOM; LISSOM; ATEBA; TCHOUANGUEU *et al.*, 2020).

Além da sua relevância para detecção de flavivírus em amostras humanas, o ensaio PAN pode ser uma importante ferramenta de vigilância em amostras de vetores. O controle de vetores é uma preocupação mundial, e a OPAS/OMS organizou um novo plano de ação sobre entomologia e controle de vetores vigente de 2018-2023 com o objetivo de fortalecer a capacidade regional e nacional de prevenção e controle dos principais artrópodes vetores e reduzir a propagação de Doenças Transmitidas por Vetores (DTV) (OPAS/OMS, 2018). Em 2000, o Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos EUA (CDC) estabeleceu uma rede

com o intuito de fazer vigilância para o vírus do Oeste do Nilo, visando elaborar um guia para profissionais da área da saúde para sua atuação, monitoramento e prevenção, que foi ampliada em 2003 para outras arboviroses, na qual os departamentos de saúde fazem notificações semanais de detecção destes vírus em humanos, animais e mosquitos (CDC, 2013).

Os indicadores gerados a partir da vigilância em vetores podem levar a ações de controle, que podem minimizar a amplificação viral, diminuindo assim chances de um surto em populações animais ou humanas. A vigilância do vírus do Oeste do Nilo nos Estados Unidos a partir da vigilância em mosquitos mostrou ser melhor quando comparada a outros métodos, como uso de animais sentinelas ou investigações a partir do relato de aves mortas (CDC, 2013). Além disso, a detecção em artrópodes pode ser útil para identificar possíveis vetores ainda desconhecidos (PHILIP SAMUEL; TYAGI, 2006). Como evidência da importância do ensaio PAN no Brasil, podemos citar alguns trabalhos que utilizaram o método genérico para detecção do gênero *Flavivirus*, como Cunha e colaboradores (2020) que utilizou para vigilância de vetores em São Paulo, Brasil e Pauvolid-Correa e colaboradores (2019) para vigilância de ZIKV em animais no centro-oeste do Brasil.

Visando o desenvolvimento do ensaio PAN-FLAVI, iniciamos o desafio de fazer um protocolo que fosse capaz de detectar os principais flavivírus circulantes no Brasil. Para esse propósito, várias etapas foram realizadas, dentre elas: pesquisa das regiões genômicas candidatas a alvos moleculares; teste da matriz de conjuntos de iniciadores e sondas, avaliação da cinética de reação com as diferentes espécies de vírus de cultura, testagem com amostras biológicas e com painel de amostras clínicas negativas, além da avaliação dos critérios de especificidade, repetibilidade e sensibilidade. Todos os parâmetros testados atingiram níveis de confiabilidade e qualidade aceitáveis, conforme preconizado pela RDC166/2017 (MS, 2017).

Alguns autores, nos últimos 10 anos, desenvolveram e otimizaram conjuntos de primers direcionados as regiões conservadas, em especial, a região NS5 para uma ampla detecção de flavivírus. A extensa busca para conseguir conjuntos de iniciadores e sondas com desempenho satisfatório, nos fez chegar aos oligonucleotídeos descritos por Patel e colaboradores (2013). Mesmo com as informações do protocolo disponível no artigo, foi desafiador equilibrar a sensibilidade e cinética de reação para cada flavivírus testado. A mesma dificuldade é relatada por Vina-Rodrigues e Colaboradores (2017).

O sistema PAN-FLAVI, apresentou 100% de especificidade, não sendo observadas curvas de amplificação inespecíficas em amostras negativas e em amostras positivas de outros patógenos testados. Esses resultados corroboram com os obtidos por Patel e colaboradores (2013) e Cunha e colaboradores (2020), que utilizaram os mesmos oligonucleotídeos avaliados nesta dissertação. Embora os iniciadores e sondas sejam universais, menos específicos e abrangendo um maior número de espécies, esses trabalhos também obtiveram excelente especificidade.

A RT-PCR com oligoiniciadores descritos por Figueiredo e colaboradores (1998), em reação *one-step*, foi capaz de identificar os flavivírus circulantes no Brasil, sem descrever os limites de detecção (LOD) dos mesmos. A reação duplex RT-PCR seguida de *nested* PCR para identificação de flavivírus descrita por Bronzoni e colaboradores (2005) descreve o LOD apenas para o vírus da Febre Amarela, sendo de $10^{1.3}$ TCID₅₀/ml. Patel e colaboradores (2013) alcançaram o LOD com 100 cópias/reação para YFV, com *Ct* de 36,4 e 10 cópias/reação para DENV sorotipo 1, com *Ct* de 39,7. Porém nestes estudos citados, não foi avaliado o ZIKV e não descrevem o LOD dos outros flavivírus mencionados em seus trabalhos. Outras reações moleculares também não relatam a detecção de grande parte dos vírus de ocorrência no Brasil (SCARAMOZZINO; CRANCE; JOUAN; DEBRIEL *et al.*, 2001; TANAKA, 1993)

Cunha e colaboradores (2020), que utilizaram o protocolo de Patel e colaboradores (2013), descreveram os limites de detecção para YFV (1 PFU/mL) e ZIKV (0,1 PFU/mL), enquanto o presente estudo obteve YFV (7,02 PFU/mL) e ZIKV (13,41 PFU/mL) calculados por *Probit*, com 95% de positividade. Eles também analisaram a sensibilidade de ILHV (0,01 PFU/mL), SLEV (0,1 PFU/mL), BSQV ($1 \times 10^{1.6}$ PFU/mL), CPCV (0,1 PFU/mL) e IGUV (1 PFU/mL), entretanto, o DENV com maior importância epidemiológica não foi avaliado. O teste de sensibilidade de Cunha foi realizado com apenas 4 replicatas e sem o cálculo do *Probit*, enquanto no presente estudo foi realizado com no mínimo 8 replicatas. Adicionalmente, se analisarmos o YFV, obtivemos a sensibilidade de 7,02 PFU/mL baseado no *Probit*, no entanto, as diluições de $3,75 \times 10^0$ e $1,88 \times 10^0$ PFU/mL também obtiveram replicatas detectáveis e para ZIKV obtivemos replicatas detectáveis até a diluição $2,68 \times 10^0$ PFU/mL.

Para os diferentes ensaios ou protocolos de qPCR a faixa de variação esperada da diferença dos valores de *Ct* pode chegar a 1 log (3,3 de valor de *Ct*). Quando a comparação é realizada entre o mesmo método a faixa esperada de variação de valor de *Ct* no método pode chegar a 0,5 log (aproximadamente 2,3 de valor de *Ct*) (ROCHE, 2022). O valor de *Ct* está

inversamente relacionado à carga viral e cerca de cada 3,3 aumento no valor de C_t reflete uma redução de 10 vezes nas moléculas de RNA iniciais (AL BAYAT; MUNDODAN; HASNAIN; SALLAM *et al.*, 2021).

O Ensaio Molecular PAN-FLAVI demonstrou capacidade de detecção dos vírus ZIKV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, YFV e WNV apresentando proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições para o teste de repetibilidade. A precisão foi de até de 1% de CV para todos os vírus testados, valores abaixo dos 15% de acordo com a RDC nº27/2012, que não se admite valores superiores a este percentual para a precisão, que é expressa como coeficiente de variação (CV%) (MS, 2012).

De acordo com a literatura, a heparina é um potente interferente, pois pode inibir a PCR (AL-SOUD; RÅDSTRÖM, 2001; SBPC, 2014). Em nosso teste com os interferentes, o plasma heparinizado interferiu na reação, impossibilitando a detecção do alvo. O mesmo, também é visto em outros kits diagnósticos já registrados, como por exemplo, o Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos, onde é recomendado a utilização de amostras sem o anticoagulante heparina. (BIO-MANGUINHOS, 2022). Os diferentes graus de hemólise e o plasma lipêmico também influenciaram na sensibilidade do ensaio.

Outro fator de extrema importância que pode conter outros interferentes e causar variações no desempenho do ensaio é a extração do material genético, pois a qualidade do RNA é fundamental para garantir uma alta eficiência de reação. Dettogni e Louro (2017) descrevem também que a baixa eficiência na extração e purificação na presença de interferentes podem afetar a eficiência e sensibilidade da reação.

Os resultados obtidos pelo ensaio PAN-FLAVI foram comparados aos obtidos pelos ensaios RT-qPCR específicos para espécies de vírus, e para esta comparação utilizamos variadas amostras de DENV, YFV e ZIKV, com diferentes genótipos, linhagens, hospedeiros e anos. Na comparação das amostras de YFV, os resultados foram semelhantes, porém o ensaio PAN foi um pouco mais sensível que o ensaio espécie-específico com menos de 1,5 C_t s de diferença entre os ensaios. Na comparação das amostras de ZIKV, o ensaio espécie-específico foi mais sensível que o ensaio PAN, com até 3,37 C_t s de diferença para as amostras do genótipo asiático. Já para a amostra do genótipo africano o ensaio PAN foi mais sensível, com 2,18 C_t mais baixo.

Na comparação dos quatro sorotipos do DENV, conforme esperado, o ensaio espécie-específico foi mais sensível que o ensaio PAN, com até 7,2 *Cts* de diferença. Este resultado sugeri que o ensaio PAN-FLAVI é menos sensível, no entanto possui maior capacidade de detecção, uma vez que detectou uma amostra de cultura de DENV-2 isolada do soro de um paciente de Pernambuco em 1997, a qual, o ensaio espécie-específico não foi capaz de detectar. Provavelmente devido ao fato da região alvo do sistema PAN ser genérica e permitir à amplificação de um maior número amostras com variações genéticas.

Tanto Romeiro e colaboradores (2016), quanto Patel e colaboradores (2013) não observaram diferença significativa entre ensaios PAN e espécie-específicos, no entanto Lanciotti e colaboradores (2003) observaram perda de sensibilidade no uso de oligoiniciadores degenerados quando comparados com os específicos sem degenerações, encontrando variação na sensibilidade de 10 a 100 vezes com o WNV. Podemos atribuir também a alta diferença de *Ct* entre os nossos ensaios, ao volume de RNA utilizado no sistema, ao qual, o protocolo espécie-específico de DENV e ZIKV se utiliza o dobro de RNA em relação ao protocolo do PAN-FLAVI.

O ensaio PAN-FLAVI foi testado com mais três flavivírus: WNV, ILHV e SLEV, detectando-os com eficiência, corroborando os trabalhos de Patel 2013 e Cunha 2020 que conseguiram com os mesmos oligonucleotídeos detectar esses vírus e outros flavivírus. Para estes vírus citados, não foi possível realizar a comparação entre ensaio PAN e espécie-específico, pois não havia conjunto de iniciadores e sondas disponível no laboratório para realizar o ensaio espécie-específico.

Este ensaio representa uma ferramenta molecular valiosa para a detecção de flavivírus, desenvolvida para alcançar os parâmetros de repetibilidade, especificidade, sensibilidade e confiabilidade, no intuito de substituir os testes *in house* utilizados nos laboratórios, por um produto que será submetido ao registro pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Inicialmente o PAN-FLAVI foi pensado para suprir a demanda dos laboratórios de referência em vigilância entomo-virológica no Brasil, porém como apresentado tem outras aplicabilidades importantes, servindo para atender demandas na pesquisa e no direcionamento do diagnóstico das arboviroses de interesse da saúde pública.

6 Conclusões

O ensaio molecular PAN-FLAVI:

- Detectou os principais flavivírus circulantes no Brasil com alta especificidade e sensibilidade
- Para todos os parâmetros testados atingiu níveis de confiabilidade e qualidade aceitáveis, conforme preconizado pela RDC166/2017.
- Detectou os vírus da Febre Amarela, Zika, Dengue 1-4, Febre do Nilo Ocidental, Ilhéus e Encefalite de Saint Louis em diferentes amostras.
- Pode ser considerado uma excelente ferramenta para estudos de monitoramento viral e triagem de flavivírus em bolsas de sangue e hemoderivados
- É adequado para utilização na rede de laboratórios de vigilância virológica e entomológica.

7 Referências

A **biologia do vírus Zika**. Khan academy, 2016. Disponível em: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/what-is-zika-virus>. Acesso em: 10/05/2021.

ABREU, F. V. S.; DELATORRE, E.; DOS SANTOS, A. A. C.; FERREIRA-DE-BRITO, A. *et al.* Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 114, p. e190076, 2019.

AL BAYAT, S.; MUNDODAN, J.; HASNAIN, S.; SALLAM, M. *et al.* Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? **J Infect Public Health**, 14, n. 9, p. 1201-1205, Sep 2021.

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **J Clin Microbiol**, 39, n. 2, p. 485-493, Feb 2001.

ALMEIDA, M. A. B.; SANTOS, E. D.; CARDOSO, J. D. C.; NOLL, C. A. *et al.* Detection of antibodies against Icoaraci, Ilhéus, and Saint Louis Encephalitis arboviruses during yellow fever monitoring surveillance in non-human primates (*Alouatta caraya*) in southern Brazil. **J Med Primatol**, 48, n. 4, p. 211-217, 08 2019.

ANEZ, G.; CHANCEY, C.; GRINEV, A.; RIOS, M. Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. **ISBT Science Series**, 7, n. 1, p. 274-282, 2012.

ANVISA. RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003. 2003.

ARMSTRONG, P. M.; ANDREADIS, T. G. Eastern equine encephalitis virus in mosquitoes and their role as bridge vectors. **Emerg Infect Dis**, 16, n. 12, p. 1869-1874, Dec 2010.

BELLONE, R.; FAILLOUX, A. B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. **Front Microbiol**, 11, p. 584846, 2020.

BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, 19, n. 13, Apr 2014.

BIO-MANGUINHOS. TESTE PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO NUCLÉICO DE HIV (VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA), HCV (VÍRUS DA HEPATITE C) E HBV (VÍRUS DA HEPATITE B) BULA Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos 24 p. 2022.

BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ. **Testes rápidos.** 2022. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/produtos/reativos/testes-rapidos-2>. Acesso em: 18 agosto de 2022.

BONALDO, M. C.; RIBEIRO, I. P.; LIMA, N. S.; DOS SANTOS, A. A. *et al.* Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 6, p. e0004816, 06 2016.

BOZZA, F. A.; MOREIRA-SOTO, A.; ROCKSTROH, A.; FISCHER, C. *et al.* Differential Shedding and Antibody Kinetics of Zika and Chikungunya Viruses, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 25, n. 2, p. 311-315, Feb 2019.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. ***Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil***. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 16, p. 113 - 118 , publisher = scielo , crossref = 110.5123/S1679-49742007000200006 , 2007.

BRONZONI, R. V.; BALEOTTI, F. G.; RIBEIRO NOGUEIRA, R. M.; NUNES, M. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol**, 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005.

BROUARD, C.; BERNILLON, P.; QUATRESOUS, I.; PILLONEL, J. *et al.* Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. **Transfusion**, 48, n. 7, p. 1333-1341, Jul 2008.

CAMPBELL, G. L.; MARFIN, A. A.; LANCIOTTI, R. S.; GUBLER, D. J. West Nile virus. **Lancet Infect Dis**, 2, n. 9, p. 519-529, 2002.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015.

CASSEB, A. D. R.; CASSEB, L. M. N.; SILVA, S. P. D.; VASCONCELOS, P. F. D. C. Arbovírus: importante zoonose na amazônia brasileira. **Veterinária e pecuária**. 20: 391 - 403 p. 2013.

CASTRO, M. G.; NOGUEIRA, R. M.; FILIPPIS, A. M.; FERREIRA, A. A. *et al.* Dengue virus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107, n. 7, p. 940-945, Nov 2012.

CAVALCANTE, K. R. L. J.; TAUIL, P. L. Risk of re-emergence of urban yellow fever in Brazil. **Epidemiol Serv Saude**, 26, n. 3, p. 617-620, 2017 Jul-Sep 2017.

CDC. West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. Fort Collins, Colorado 2013.

CDC. International Catalog of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates. 2022a.

CDC. **Monitoring Blood Safety. Diseases and Organisms. Viral Diseases.**, 2022b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/bloodsafety/bbp/diseases-organisms.html>. Acesso em: 20/09/2022.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, 44, p. 649-688, 1990.

CHAO, D. Y.; DAVIS, B. S.; CHANG, G. J. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. **J Clin Microbiol**, 45, n. 2, p. 584-589, Feb 2007.

CHEN, W. R.; TESH, R. B.; RICO-HESSE, R. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. **J Gen Virol**, 71 (Pt 12), p. 2915-2922, Dec 1990.

CHIPPAUX, J. P.; CHIPPAUX, A. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 24, p. 20, 2018.

CHIU, C. Y.; COFFEY, L. L.; MURKEY, J.; SYMMES, K. *et al.* Diagnosis of Fatal Human Case of St. Louis Encephalitis Virus Infection by Metagenomic Sequencing, California, 2016. **Emerg Infect Dis**, 23, n. 10, p. 1964-1968, 10 2017.

CLEMENTS, A. **The biology of mosquitoes. Transmission of viruses and interactions with bacteria.** CABI, 2012.

CONSOLI, R. A.; OLIVEIRA, R. L. D. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil.** Rio de Janeiro, RJ: 1994. 224 p. 85-85676-03-5.

COOK, S.; BENNETT, S. N.; HOLMES, E. C.; DE CHESSE, R. *et al.* Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. **J Gen Virol**, 87, n. Pt 4, p. 735-748, Apr 2006.

COSTA, E. A.; GIOVANETTI, M.; CATENACCI, L. S.; FONSECA, V. *et al.* West Nile virus detection in horses in three Brazilian states. **bioRxiv**, p. 2021.2001.2006.425363, 2021.

COUTO-LIMA, D.; MADEC, Y.; BERSOT, M. I.; CAMPOS, S. S. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 4848, 2017/07/07 2017.

CUNHA, M. S. **Validação e uso de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-qPCR) para a vigilância e diagnóstico de flavivírus transmitidos por mosquitos circulantes no Brasil.** Orientador: MAIORCA, P. C. 2018. (DUTORADO) -, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP.

DE BRUYCKER-NOGUEIRA, F.; FARIA, N. R. D. C.; NUNES, P. C. G.; NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* First detection and molecular characterization of a DENV-1/DENV-4 co-infection during an epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Clin Case Rep**, 6, n. 11, p. 2075-2080, Nov 2018.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, G.; DA COSTA, A. C.; GILL, D. E.; RIBEIRO, E. S. D. *et al.* Guapiaçu virus, a new insect-specific flavivirus isolated from two species of Aedes mosquitoes from Brazil. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 4674, 02 25 2021.

DE SIMONE, T. S.; NOGUEIRA, R. M.; ARAÚJO, E. S.; GUIMARÃES, F. R. *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**, 98, n. 9, p. 553-562, Sep 2004.

DE SOUZA LOPES, O.; DE ABREU SACCHETTA, L.; FRANCY, D. B.; JAKOB, W. L. *et al.* Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. III. Isolation of Rocio virus from Psorophora Ferox (Humboldt, 1819). **Am J Epidemiol**, 113, n. 2, p. 122-125, 1981.

DETTOGNI, R. S.; LOURO, I. D. Desafios da coleta do RNA do vírus da dengue (ligação e tratamento ao DNA: métodos, aplicações e administrados). *Biotechnology Aplicada à Agro&Indústria*. São Paul, Blucher. 4 937 - 966 p. 2017.

DEUBEL, V.; LAILLE, M.; HUGNOT, J. P.; CHUNGUE, E. *et al.* Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. **J Virol Methods**, 30, n. 1, p. 41-54, Oct 1990.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 46, n. 5, p. 509-520, Sep 1952.

DIGOUTTE, J. P.; CALVO-WILSON, M. A.; MONDO, M.; TRAORE-LAMIZANA, M. *et al.* Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Res Virol**, 143, n. 6, p. 417-422, 1992 Nov-Dec 1992.

DOMINGO, C.; PATEL, P.; YILLAH, J.; WEIDMANN, M. *et al.* Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. **J Clin Microbiol**, 50, n. 12, p. 4054-4060, Dec 2012.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saude Publica**, 51, p. 30, Apr 2017.

DOS REIS, I. C.; GIBSON, G.; AYLLÓN, T.; DE MEDEIROS TAVARES, A. *et al.* Entomovirological surveillance strategy for dengue, Zika and chikungunya arboviruses in field-caught *Aedes* mosquitoes in an endemic urban area of the Northeast of Brazil. **Acta Trop**, 197, p. 105061, Sep 2019.

DREBOT, M. A.; ARTSOB, H. West Nile virus. Update for family physicians. **Canadian Family Physician**, 51, n. 8, p. 1094, 2005.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; BIRON, A.; O'CONNOR, O.; HUGUON, E. *et al.* Infectious Zika viral particles in breastmilk. **Lancet**, 387, n. 10023, p. 1051, Mar 2016.

FARFAN-ALE, J. A.; LOROÑO-PINO, M. A.; GARCIA-REJON, J. E.; HOVAV, E. *et al.* Detection of RNA from a novel West Nile-like virus and high prevalence of an insect-specific flavivirus in mosquitoes in the Yucatan Peninsula of Mexico. **Am J Trop Med Hyg**, 80, n. 1, p. 85-95, Jan 2009.

FERNANDES, R. S. **COMPETÊNCIA VETORIAL DE POPULAÇÕES BRASILEIRAS DE CULEX QUINQUEFASCIATUS E AEADES AEGYPTI FRENTE A DIFERENTES CEPAS DO VÍRUS ZIKA ISOLADAS NO BRASIL**. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, p.97f. 2017.

FERREIRA-DE-BRITO, A.; RIBEIRO, I. P.; MIRANDA, R. M.; FERNANDES, R. S. *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 111, n. 10, p. 655-658, Oct 2016.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**, 2, n. 13, p. 1643-1649, Nov 2000.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 40, n. 2, p. 224-229, 2007 Mar-Apr 2007.

FIGUEIREDO, L. T.; BATISTA, W. C.; KASHIMA, S.; NASSAR, E. S. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. **Am J Trop Med Hyg**, 59, n. 3, p. 357-362, Sep 1998.

FULOP, L.; BARRETT, A. D.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, 44, n. 2-3, p. 179-188, Oct 1993.

GARAE, C.; KALO, K.; PAKOA, G. J.; BAKER, R. *et al.* Validation of the easyscreen flavivirus dengue alphavirus detection kit based on 3base amplification technology and its application to the 2016/17 Vanuatu dengue outbreak. **PLoS One**, 15, n. 1, p. e0227550, 2020.

GAUNT, M. W.; SALL, A. A.; LAMBALLERIE, X.; FALCONAR, A. K. I. *et al.* Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **J Gen Virol**, 82, n. Pt 8, p. 1867-1876, Aug 2001.

GIRARD, M.; NELSON, C. B.; PICOT, V.; GUBLER, D. J. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, 38, n. 24, p. 3989-3994, 2020.

GOULD, E.; PETTERSSON, J.; HIGGS, S.; CHARREL, R. *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One health (Amsterdam, Netherlands)**, 4, p. 1-13, 2017.

GOULD, E. A.; DE LAMBALLERIE, X.; ZANOTTO, P. M.; HOLMES, E. C. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. **Adv Virus Res**, 59, p. 277-314, 2003.

GOURINAT, A. C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis**, 21, n. 1, p. 84-86, Jan 2015.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res**, 33, n. 4, p. 330-342, 2002 Jul-Aug 2002.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, 8, n. 12, p. S7-S16, 2010/12/01 2010.

GUZMÁN, C.; CALDERÓN, A.; MATTAR, S.; TADEU-FIGUEREIDO, L. *et al.* Ecoepidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses. **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**, p. 101-125, 2020.

GÓMEZ, M. M.; ABREU, F. V. S.; SANTOS, A. A. C. D.; MELLO, I. S. *et al.* Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. **J Gen Virol**, 99, n. 4, p. 536-548, Apr 2018.

HALSTEAD, S. B. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XI. Dengue. **Rev Infect Dis**, 6, n. 2, p. 251-264, 1984 Mar-Apr 1984.

HAYES, E. B.; SEJVAR, J. J.; ZAKI, S. R.; LANCIOTTI, R. S. *et al.* Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. **Emerg Infect Dis**, 11, n. 8, p. 1174-1179, Aug 2005.

HOFACKER, I. L. Vienna RNA secondary structure server. **Nucleic acids research**, 31, n. 13, p. 3429-3431, 2003.

HOLLAND, J.; DOMINGO, E. Origin and evolution of viruses. **Virus Genes**, 16, n. 1, p. 13-21, 1998.

JOHNSON, N.; WAKELEY, P. R.; MANSFIELD, K. L.; MCCRACKEN, F. *et al.* Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 10, n. 7, p. 665-671, Oct 2010.

JUNGLEN, S.; KOPP, A.; KURTH, A.; PAULI, G. *et al.* A new flavivirus and a new vector: characterization of a novel flavivirus isolated from uranotaenia mosquitoes from a tropical rain forest. **J Virol**, 83, n. 9, p. 4462-4468, May 2009.

KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates. KARABATSOS, N. San Antonio, Texas : 2001 update: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses 1985.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28, n. 12, 2012.

KIELY, P.; GAMBHIR, M.; CHENG, A. C.; MCQUILTEN, Z. K. *et al.* Emerging Infectious Diseases and Blood Safety: Modeling the Transfusion-Transmission Risk. **Transfus Med Rev**, 31, n. 3, p. 154-164, 07 2017.

KOMAR, N.; CLARK, G. G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Rev Panam Salud Publica**, 19, n. 2, p. 112-117, Feb 2006.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **J Virol Methods**, 72, n. 1, p. 27-41, May 1998.

LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. **Adv Virus Res**, 61, p. 67-99, 2003.

LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J.; NASCI, R. S.; GODSEY, M. S. *et al.* Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **J Clin Microbiol**, 38, n. 11, p. 4066-4071, Nov 2000.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. **Bioinformatics**, 30, n. 22, 2014.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerg Microbes Infect**, 4, n. 3, p. e18, Mar 2015.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Rev Saude Publica**, 50, Jun 2016.

LIRA, S. M. D. C.; LEVI, J. E.; BUB, C. B.; ARAVECCHIA, M. G. *et al.* Zika virus RNA detection in blood donors in São Paulo, Brazil. **Hematol Transfus Cell Ther**, May 26 2021.

LOBO, F. P.; MOTA, B. E.; PENA, S. D.; AZEVEDO, V. *et al.* Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. **PLoS One**, 4, n. 7, p. e6282, Jul 2009.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil. **Rev Pan-Amaz Saude**, 3, 5, 2014.

LÖWEN LEVY CHALHOU, F.; MAIA DE QUEIROZ-JÚNIOR, E.; HOLANDA DUARTE, B.; EIELSON PINHEIRO DE SÁ, M. *et al.* West Nile Virus in the State of Ceará, Northeast Brazil. **Microorganisms**, 9, n. 8, p. 1699, 2021.

MACHADO, D. C.; MONDINI, A.; DOS SANTOS SANTANA, V.; YONAMINE, P. T. *et al.* First identification of Culex flavivirus (Flaviviridae) in Brazil. **Intervirology**, 55, n. 6, p. 475-483, 2012.

MACHADO, D. C.; MONDINI A FAU - DOS SANTOS SANTANA, V.; DOS SANTOS SANTANA V FAU - YONAMINE, P. T. K.; YONAMINE PT FAU - CHIARAVALLI NETO, F. *et al.* First identification of Culex flavivirus (Flaviviridae) in Brazil. **Intervirology**. 2012;55(6):475-83. doi: 10.1159/000337166. Epub 2012 Aug 1. 2012.

MAHER-STURGESS, S. L.; FORRESTER, N. L.; WAYPER, P. J.; GOULD, E. A. *et al.* Universal primers that amplify RNA from all three flavivirus subgroups. **Virology**, 5, p. 16, Jan 2008.

MARTINS, L. C.; SILVA, E. V. P. D.; CASSEB, L. M. N.; SILVA, S. P. D. *et al.* First isolation of West Nile virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 114, p. e180332, Jan 2019.

MCLEAN, R. G.; UBICO, S. R.; BOURNE, D.; KOMAR, N. West Nile virus in livestock and wildlife. **Curr Top Microbiol Immunol**, 267, p. 271-308, 2002.

MEDLOCK, J. M.; SNOW, K. R.; LEACH, S. Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. **Med Vet Entomol**, 19, n. 1, p. 2-21, Mar 2005.

MEIYU, F.; HUOSHENG, C.; CUIHUA, C.; XIAODONG, T. *et al.* Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. **Microbiol Immunol**, 41, n. 3, p. 209-213, 1997.

MELO, A. S.; AGUIAR, R. S.; AMORIM, M. M.; ARRUDA, M. B. *et al.* Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. **JAMA Neurol**, 73, n. 12, p. 1407-1416, 2016.

MOUREAU, G.; COOK, S.; LEMEY, P.; NOUGAIREDE, A. *et al.* New Insights into Flavivirus Evolution, Taxonomy and Biogeographic History, Extended by Analysis of Canonical and Alternative Coding Sequences. **PLOS ONE**, 10, n. 2, p. e0117849, 2015.

MOUREAU, G.; TEMMAM, S.; GONZALEZ, J. P.; CHARREL, R. N. *et al.* A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 7, n. 4, p. 467-477, 2007.

MS. RESOLUÇÃO - RDC Nº 27, DE 17 DE MAIO DE 2012. SANITÁRIA, A. N. D. V. 2012.

MS. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017 2017.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, 3, n. 1, p. 13-22, Jan 2005.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev**, 29, n. 3, p. 487-524, Jul 2016.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill**, 19, n. 14, Apr 2014.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, 20, n. 10, p. O595-596, Oct 2014.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T. *et al.* Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**, 21, n. 2, p. 359-361, Feb 2015.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SCHATZMAYR, H. G. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 85, n. 2, p. 253, 1990 Apr-Jun 1990.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; LAMPE, E.; SOUZA, R. W. *et al.* Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. **Epidemiol Infect**, 111, n. 1, p. 163-170, Aug 1993.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cad Saude Publica**, 16, n. 1, p. 205-211, 2000 Jan-Mar 2000.

NUNES, M. R.; FARIA, N. R.; VASCONCELOS, H. B.; MEDEIROS, D. B. *et al.* Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010-2011. **Emerg Infect Dis**, 18, n. 11, p. 1858-1864, Nov 2012.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveill**, 19, n. 9, Mar 2014.

OMS. **WHO Scientific Group on Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases & World Health Organization . (1985). Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases** Geneva, 1985. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/39922>.

OMS. Report of the scientific working group report on dengue. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (2007). 4 74 -84 p. 2006.

OMS. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition. Geneva: World Health Organization 2009.

OMS. **Yellow Fever. World Health Organization (WHO)**. Geneva, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/pt/>. Acesso em: 18/03/2019.

OPAS. Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas. . Washington, D.C 2016.

OPAS/OMS. PLANO DE AÇÃO SOBRE ENTOMOLOGIA E CONTROLE DE VETORES 2018-2023 *In:* 70a SESSÃO DO COMITÊ REGIONAL DA OMS PARA AS AMÉRICAS 2018, Washington, DC, EUA p. 25.

OPAS/OMS. Casos notificados de dengue nas Américas. 2022.

PATEL, P.; LANDT, O.; KAISER, M.; FAYE, O. *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virol J**, 10, p. 58, Feb 2013.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; SOLBERG, O.; COUTO-LIMA, D.; KENNEY, J. *et al.* Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. **Arch Virol**, 160, n. 1, p. 21-27, Jan 2015.

PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, 374, n. 16, p. 1552-1563, 2016.

PHILIP SAMUEL, P.; TYAGI, B. K. Diagnostic methods for detection & isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. **Indian J Med Res**, 123, n. 5, p. 615-628, May 2006.

PIERRE, V.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. **Res Virol**, 145, n. 2, p. 93-104, 1994 Mar-Apr 1994.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, 5, n. 6, p. 796-812, 2020/06/01 2020.

PIERSON, T. C.; KIELIAN, M. Flaviviruses: braking the entering. **Curr Opin Virol**, 3, n. 1, p. 3-12, Feb 2013.

PONTE, G.; PIMENTEL, I. **História e qualidade: produção da vacina contra febre amarela na Fiocruz.**, 17/01/2017 2017. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/historia-e-qualidade-producao-da-vacina-contr-febre-amarela-na-fiocruz>. Acesso em: 05/11/2022.

PREDIGER, E. **Designing PCR primers and probes.** 2013. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>.

RAMÍREZ, A. L.; VAN DEN HURK, A. F.; MEYER, D. B.; RITCHIE, S. A. Searching for the proverbial needle in a haystack: advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. **Parasites & vectors**, 11, n. 1, p. 320-320, 2018.

RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P. *et al.* Dengue and dengue haemorrhagic fever. **Lancet**, 352, n. 9132, p. 971-977, Sep 1998.

ROCHE. Teste COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1, versão 2.0. 2022.

ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. **Viral Immunol**, 21, n. 2, p. 123-132, Jun 2008.

ROMEIRO, M. F.; SOUZA, W. M.; TOLARDO, A. L.; VIEIRA, L. C. *et al.* Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool

for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 49, n. 3, p. 279-285, 2016 May-Jun 2016.

RONCA, S. E.; RUFF, J. C.; MURRAY, K. O. A 20-year historical review of West Nile virus since its initial emergence in North America: Has West Nile virus become a neglected tropical disease? **PLoS Negl Trop Dis**, 15, n. 5, p. e0009190, 2021.

SABIN, A. Research on dengue during World War II. **Am J Trop Med Hyg**, 1, n. 1, p. 30-50, Jan 1952.

SAIVISH, M. V.; GOMES DA COSTA, V.; DE LIMA MENEZES, G.; ALVES DA SILVA, R. *et al.* Rocio Virus: An Updated View on an Elusive Flavivirus. **Viruses**, 13, n. 11, 11 16 2021.

SBPC. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): coleta e preparo da amostra biológica**. Barueri, SP: Editora Manole Ltda, 2014. 978-85-786-8139-5 468 p. Disponível em: http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/livro_coleta_biologica2013.pdf.

SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J. M.; JOUAN, A.; DEBRIEL, D. A. *et al.* Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. **J Clin Microbiol**, 39, n. 5, p. 1922-1927, May 2001.

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**, 81, n. 2, p. 245-246, 1986 Apr-Jun 1986.

SILVA, A. S. G.; MATOS, A. C. D.; DA CUNHA, M. A. C. R.; REHFELD, I. S. *et al.* West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2018. **Transbound Emerg Dis**, 66, n. 1, p. 445-453, Jan 2019.

SILVA, L.; ANGERAMI, R. Arboviroses no Brasil contemporâneo. In: *Viroses emergentes no Brasil* [online]. In: FIOCRUZ, E. (Ed.). Rio de Janeiro, 2008. p. 37-56.

SILVA, S. J. R. D.; MAGALHÃES, J. J. F.; PENA, L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. **One Health**, 12, p. 100205, Jun 2021.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E. A. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **J Gen Virol**, 98, n. 1, p. 2-3, 01 2017.

SIMÕES, M. **AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA E CONFIABILIDADE DO TESTE SOROLÓGICO DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS DE LISE (MICRO PRNT) NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA FEBRE AMARELA.** Orientador: FREIRE, M. D. S. e CAMACHO, L. A. B. 2011. 99f f. (Mestrado) - Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SMITHBURN, K.; HUGHES, T.; BURKE, A.; PAUL, J. A neutrotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. 20, n. 471-2, 1940.

SOUZA, W. V.; ARAÚJO, T. V.; ALBUQUERQUE, M. E. F.; BRAGA, M. C. *et al.* Microcephaly in Pernambuco State, Brazil: epidemiological characteristics and evaluation of the diagnostic accuracy of cutoff points for reporting suspected cases. **Cad Saude Publica**, 32, n. 4, p. e00017216, 2016.

SVS. Guia de Vigilância Epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância

Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde 2009.

SVS. **Brasil. Ministério da Saúde. Vigilância Febre do Nilo Ocidental.** . 2015. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/o-ministro/942-saude-de-a-a-z/febre-do-nilo-ocidental/21160-vigilancia-nilo>. Acesso em: 15/03/2019.

SVS. Ministério da Saúde. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela. Brasil – 2017/2018. Relatório nº 27 | 2017/2018 2018.

SVS. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022. SAÚDE, S. D. V. E. S. M. D. 53 2022a.

SVS. **Boletim Epidemiológico Vol.53 N°36.** Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 37 de 2022; Acidentes ofídicos no Brasil em 2021., 23/09/2022 2022b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no36/view>.

SVS. Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. 23/06/2022 2022c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/svs/notificacao-compulsoria/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria-de-doencas-agravos-e-eventos-de-saude-publica>. Acesso em: 07/09/2022.

SVS, M. Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 51 2020.

SÁNCHEZ-SECO, M. P.; ROSARIO, D.; DOMINGO, C.; HERNÁNDEZ, L. *et al.* Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. **J Virol Methods**, 126, n. 1-2, p. 101-109, Jun 2005.

TANAKA, M. Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction. **J Virol Methods**, 41, n. 3, p. 311-322, Mar 1993.

TAYLOR, R. M.; HURLBUT, H. S.; DRESSLER, H. R.; SPANGLER, E. W. *et al.* Isolation of West Nile virus from Culex mosquitoes. **J Egypt Med Assoc**, 36, n. 3, p. 199-208, 1953.

TCHUANDOM, S. B.; LISSOM, A.; ATEBA, G. H. M.; TCHOUANGUEU, T. F. *et al.* Dengue virus serological markers among potential blood donors: an evidence of asymptomatic dengue virus transmission in Cameroon. **Pan Afr Med J**, 36, p. 185, 2020.

TOMORI, O. Impact of yellow fever on the developing world. **Adv Virus Res**, 53, p. 5-34, 1999.

VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, 37, n. 2, p. 226-231, Aug 2004.

VASCONCELOS, P. F.; MONATH, T. P. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 16, n. 8, p. 566-567, 08 2016.

VAZQUEZ, S.; HAFNER, G.; RUIZ, D.; CALZADA, N. *et al.* Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. **J Clin Virol**, 39, n. 3, p. 194-198, Jul 2007.

VEGA-RÚA, A.; ZOUACHE, K.; GIROD, R.; FAILLOUX, A. B. *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**, 88, n. 11, p. 6294-6306, Jun 2014.

VENTER, M. Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin. **Curr Opin Virol**, 28, p. 74-84, 02 2018.

VERNET, G. Molecular diagnostics in virology. **J Clin Virol**, 31, n. 4, p. 239-247, Dec 2004.

VIEIRA, C. J. D. S.; ANDRADE, C. D.; KUBISZESKI, J. R.; SILVA, D. J. F. D. *et al.* Detection of Ilheus virus in mosquitoes from southeast Amazon, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 113, n. 7, p. 424-427, 07 01 2019.

VIEIRA, M. A.; ROMANO, A. P.; BORBA, A. S.; SILVA, E. V. *et al.* West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, 93, n. 2, p. 377-379, Aug 2015.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; DE OLIVEIRA, J. L.; DE SOUSA-CAPRA, C.; BALARINI, K. *et al.* Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. **PeerJ**, 4, p. e1892, 2016.

VINA-RODRIGUEZ, A.; SACHSE, K.; ZIEGLER, U.; CHAINTOUTIS, S. C. *et al.* A Novel Pan-Flavivirus Detection and Identification Assay Based on RT-qPCR and Microarray. **Biomed Res Int**, 2017, p. 4248756, 2017.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D. *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **J Virol**, 74, n. 7, p. 3227-3234, Apr 2000.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nat Rev Microbiol**, 2, n. 10, p. 789-801, Oct 2004.

WEAVER, S. C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**, 69, p. 395-408, 01 29 2018.