

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

TÂMISA MORAIS RÊGO

**AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A
DETECCÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Recife
2017

TÂMISA MORAIS RÊGO

**AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A
DETECÇÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de mestre em
Ciências.

Orientador: Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr.

Coorientador: Dr. Rafael Dhalia.

RECIFE

2017

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- R343a Rêgo, Tâmisia Morais.
Avaliação e desenvolvimento da RT-PCR em tempo real para a detecção do vírus Chikungunya / Tâmisia Morais Rêgo. - Recife: [s.n.], 2017.
100 p. : il.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.
Orientador: Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr.;
coorientador: Rafael Dhália.
1. Vírus Chikungunya – isolamento & purificação. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - métodos. 3. Diagnóstico. 4. PCR Multiplex. I. Marques Júnior, Ernesto Torres de Azevedo. II. Dhália, Rafael. III. Título.

TÂMISA MORAIS RÊGO

**AVALIAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA RT-PCR EM TEMPO REAL PARA A
DETECÇÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, para a obtenção do grau de mestre em
Ciências.

Aprovado em: 28/ 07/ 2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Jr

Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Departamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco

À minha família, em especial à minha avó Tânia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acompanhar nessa caminhada longa e recheada de desafios, pela força e coragem nos momentos mais difíceis. Agradeço à minha família. À minha mãe Gisele por todos os esforços e por ser um exemplo de força, determinação e doação em minha vida. Ao meu pai Yury pelo carinho e leveza nos momentos cruciais, pelos ensinamentos de amor e compaixão ao próximo. Ao meu irmão Victor pelo apoio e por me inspirar, como grande profissional que é. Agradeço a Carmem, minha irmã de alma, por todo amor e suporte. E à minha querida avó Tânia, por toda proteção, luz e paz de espírito, a qual dedico em especial este trabalho.

Agradeço ao Dr. Abraham Rocha pela minha inserção no mundo científico, pelos ensinamentos e orientações quando ainda não fazia ideia de como chegaria até aqui. Obrigada aos meus orientadores Dr. Ernesto Marques Jr., pela grande oportunidade de desenvolver meu primeiro projeto científico. E ao Dr. Rafael Dhália, pela incrível oportunidade de cursar o tão desejado Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, obrigada por todo o auxílio e orientações nos momentos importantes.

Agradeço a equipe do departamento de Virologia por todo o suporte científico. Tenho orgulho de fazer parte de uma equipe tão profissional e tão humana. Agradeço em especial aos doutores, Dr. Rafael França pela colaboração e orientação em todo o projeto. Ao Dr. Otávio de Carvalho pelos valiosos ensinamentos na área da biologia molecular e à Dra. Milena Paiva, pelo auxílio na PCR em tempo Real. Gostaria de agradecer também ao Lacen PE pela parceria estabelecida para o desenvolvimento desse projeto, em especial a Valdete pelo apoio.

Agradeço em especial aos meus amigos queridos, à Klarissa Miranda por todo o auxílio no desenvolvimento desse projeto, orientação e principalmente amizade, certamente, uma das grandes e lindas surpresas que o mestrado me proporcionou. À Morganna Costa pela colaboração nas análises de carga viral e pelo apoio em todos os momentos importantes, sua amizade é um presente. Aos amigos, Déborah e Fernando pela amizade e força. E à Sérgio Leite Jr., por todo amor, dedicação e parceria de vida. Por fim, agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães pela disponibilidade e estrutura para a elaboração desse projeto.

Obrigada!

"Getting lost is a part of the journey of being found. How can you ever be found, if you never get lost? The adventure of life is venturing into the unknown, from our comfort zone and trusting that although we might get lost somewhere along the way, we will learn a lot in the process and eventually always find our way. "

(Mimi Ikonn)

RÊGO, Tâmisia Morais. **Avaliação e Desenvolvimento da RT-PCR em Tempo Real para a Detecção do Vírus Chikungunya**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) atualmente é um dos arbovírus de grande relevância médica, associado a casos de morbidade e/ou mortalidade, principalmente no Brasil. Assim, este projeto objetivou a otimização (às condições locais) e implementação do sistema de transcrição reversa de parte do genoma viral, seguido de amplificação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), com base no protocolo desenvolvido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC). A RT-qPCR foi avaliada através de uma curva padrão utilizando um transcrito e o limite de detecção (LOD) foi de 39 cópias/ μ l. O RNA das amostras de soro do estudo foi extraído e a RT-qPCR foi realizada. Das 151 amostras testadas, 46,4% foram negativas e 53,6% foram positivas, com uma maior capacidade de detecção pela RT-qPCR entre 0-4 dias pós infecção, em comparação ao teste de captura da imunoglobulina M (IgM) (MAC-ELISA). Análises da carga viral foram conduzidas: variação entre 10^1 a 10^8 cópias/ μ l e viremia $\geq 10^3$ cópias/ μ l foram observadas na maioria das amostras positivas (64,2%). Cargas virais $\geq 10^7$ cópias/ μ l foram evidenciadas nas faixas criança e idoso. De 0-2 dias pós infecção, foram também detectadas altas cargas virais ($\geq 10^7$ cópias/ μ l) nas amostras positivas. O ensaio da RNase P humana (RNP), controle endógeno, foi otimizado apresentando ampliações em todas as amostras do estudo. A RNP apresentou níveis praticamente constantes entre os dias pós infecção e também ao correlacionar com a carga viral dos indivíduos positivos. Um ensaio multiplex com detecção simultânea dos alvos CHIKV e RNP foi estabelecido e avaliado preliminarmente apresentando um LOD de 390 cópias/ μ l. Uma concordância percentual de 88,88% em comparação aos resultados da RT-qPCR simples foi observada, sem diferença estatística entre os testes ($p=1$). Pode-se concluir que ambos os testes (formato simples e multiplex) foram sensíveis, permitindo a detecção e quantificação do CHIKV, com potencial uso na rotina laboratorial.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya. PCR em tempo Real. Diagnóstico. PCR Multiplex. Controle de Qualidade.

RÊGO, Tâmisia Morais. **Avaliação e Desenvolvimento da RT-PCR em Tempo Real para a Detecção do Vírus Chikungunya**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

ABSTRACT

Currently, one of the most relevant arbovirus is the Chikungunya virus (CHIKV) associated with morbidity and/or mortality cases, especially in Brazil. Thus, this project aimed to optimize (under local conditions) and introduce the RT-PCR in real time assay (RT-qPCR), based on the protocol developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). RT-qPCR was evaluated by transcript dilutions on a standard curve and the limit of detection (LOD) was 39 copies/ μ l. The RNA from the serum clinical samples was extracted and the RT-qPCR was performed. Out of 151 samples tested, 46.4% were negative and 53.6% were positive. A higher detection sensitivity by RT-qPCR was observed between 0-4 days post infection, compared to the immunoglobulin M (IgM) capture assay (MAC-ELISA). Analysis with viral load were performed: variation from 10^1 to 10^8 copies/ μ l and viremia of $\geq 10^3$ copies/ μ l were observed in most of positive samples (64.2%). Viral loads of $\geq 10^7$ copies/ μ l were described on children and elderly people. From 0-2 days post infection, high viral loads ($\geq 10^7$ copies/ μ l) were detected among positive samples. The human RNase P assay (RNP), endogenous control, was optimized. All samples were detected by the RNP assay, showing similar levels between the days post infection and in comparison, to viral load of positive individuals. A multiplex assay with simultaneous detection of CHIKV and RNP targets was optimized and preliminarily evaluated with a LOD of 390 copies/ μ l. A percentage of agreement of 88.88% compared to singleplex RT-qPCR results was observed, with no statistical difference between the tests ($p=1$). It is possible to infer that both tests (singleplex and multiplex) demonstrated sensibility, allowing detection and quantification of CHIKV, with potential use on laboratory routine.

Keywords: Chikungunya virus. Real-time PCR. Diagnosis. Multiplex PCR. Quality Control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Árvore filogenética baseada em regiões codificantes completas de 74 sequências do CHIKV.....	20
Figura 2 -	Casos de infecções pelo CHIKV reportados no mundo, em 2016.....	21
Figura 3 -	Casos notificados e confirmados de febre Chikungunya no Brasil em 2016.....	23
Figura 4 -	Processo de infecção e transmissão do CHIKV por mosquitos vetores.....	24
Figura 5 -	Ciclo de transmissão do CHIKV.....	25
Figura 6 -	Estrutura do CHIKV.....	26
Figura 7 -	Esquema de organização do genoma do CHIKV.....	27
Figura 8 -	Ciclo de replicação do CHIKV.....	29
Figura 9 -	Disseminação do CHIKV no hospedeiro.....	31
Figura 10 -	Viremia e resposta imune em infecção pelo CHIKV.....	34
Figura 11 -	Etapas de um ensaio de RT-qPCR.....	39
Figura 12 -	Mecanismos de funcionamento do sistema Taq TaqMan®.....	40
Figura 13 -	Gráfico de amplificação da PCR em tempo Real.....	41
Figura 14 -	Representação esquemática da curva padrão em um ensaio de PCR em tempo real.....	43
Figura 15 -	Alvo molecular do CHIKV.....	48
Figura 16 -	Vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega).....	50
Quadro 1 -	Conjunto de primers e sonda para detecção da RNP (CUI et al., 2016).....	54
Quadro 2	Conjunto de primers e sonda para detecção do CHIKV (LANCIOTTI et al., 2007).....	55
Figura 17 -	Eletroforese em gel de agarose a 2.0% dos clones do alvo molecular. Marcador molecular de 100pb.....	60

Figura 18 -	Resultado do sequenciamento do clone 01 com auxílio do programa ApE A plasmid Editor e da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).....	61
Figura 19 -	Limite de detecção do sistema de RT-qPCR para a detecção do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	62
Figura 20 -	Curva padrão do sistema de RT-qPCR para detecção do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	63
Figura 21 -	Avaliação da sensibilidade do sistema de RT-qPCR frente a diluições seriadas de fator 10 do transcrito em amostra de soro negativa. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	64
Figura 22 -	Otimização do ensaio para detecção do controle endógeno da RNP. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	65
Figura 23 -	Gráfico de amplificação da RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV em amostras de soro do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	66
Figura 24 -	Desempenho das técnicas no diagnóstico do CHIKV em amostras de soro do estudo.....	67
Figura 25 -	Distribuição da carga viral (CV) em número de cópias de RNA por faixa etária.....	68
Figura 26 -	Distribuição da CV em número de cópias de RNA por dias de início de sintomas.....	69
Figura 27 -	Distribuição da média do C_t (ensaio RNP) por dias de início de sintomas nas amostras do estudo.....	70
Figura 28 -	Distribuição da média do C_t (ensaio RNP) e carga viral nas amostras positivas do estudo.....	71
Figura 29 -	Otimização do set CHIKV no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de sondas testadas foram: 25 e 50 μ M, com concentração fixa de primer a 100 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	72

Figura 30 -	Otimização do set RNP no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de primer testadas foram entre 2,5 a 20 μ M, com concentração fixa de sonda a 2,5 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	73
Figura 31 -	Otimização do set RNP no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de sonda testadas foram entre 1,25 a 10 μ M, com concentração fixa de primer a 10 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	73
Figura 32 -	Sistema multiplex de RT-qPCR otimizado, frente amostras do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	74
Figura 33 -	Curva padrão no sistema multiplex de RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	75
Figura 34 -	Gráfico de amplificação do sistema multiplex em amostras de soro do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).....	75
Tabela 2 -	Análise de concordância entre o sistema multiplex e o sistema simples de RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV nas amostras de soro do estudo.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>
C_t	<i>Cycle Threshold</i>
CA	<i>Califórnia</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM/FIOCRUZ
CHIKV	Vírus Chikungunya
CV	Carga viral
DENV	Vírus da Dengue
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFN-α/β	Interferon-alfa/beta
Lacen PE	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral
LCE	Líquido cérebro-espinhal
LOD	<i>Limit of Detection</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IgM	Imunoglobulinas M
IgG	Imunoglobulinas G
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RNP	RNase P humana
r²	Coefficiente de Correlação
RT-qPCR	Transcrição reversa de parte do genoma viral, seguido de amplificação em cadeia da polimerase em tempo real
slope	Inclinação da curva
USA	Estados Unidos da América

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	18
2.1 HISTÓRICO.....	18
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.3 TRANSMISSÃO E VETOR.....	23
2.4 AGENTE ETIOLÓGICO.....	25
2.5 ESTRUTURA E GENOMA VIRAL.....	26
2.6 REPLICAÇÃO VIRAL.....	27
2.7 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	29
2.8 DISSEMINAÇÃO VIRAL E IMUNOPATOGENESE.....	30
2.9 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE.....	32
2.10 DIAGNÓSTICO.....	34
2.10.1 Sorológico.....	35
2.10.2 Viroológico.....	37
2.10.2.1 ISOLAMENTO VIRAL.....	37
2.10.2.2 DETECÇÃO MOLECULAR.....	38
2.10.2.2.1 RT-qPCR.....	39
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL.....	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	47
5.2 CÁLCULO AMOSTRAL.....	47
5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	47
5.4 ALVO MOLECULAR.....	48
5.5 CLONAGEM GÊNICA DO ALVO MOLECULAR.....	48
5.6 TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
5.7 CURVA PADRÃO.....	52
5.8 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	53
5.9 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DA RNP.....	53
5.10 CONDIÇÕES DA RT-qPCR.....	54
5.10.1 Critérios de positividade das amostras biológicas na técnica RT-qPCR.....	55

5.11 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIPLEX DE RT-qPCR.....	56
5.12 ANÁLISE DOS DADOS.....	56
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	58
7 RESULTADOS.....	59
7.1 ANÁLISE DEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ALVO.....	59
7.2 CLONAGEM GÊNICA DO ALVO MOLECULAR.....	60
7.3 CURVA PADRÃO.....	61
7.4 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DA RNP.....	64
7.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA RT-qPCR EM AMOSTRAS DE SORO....	65
7.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIPLEX DE RT-qPCR.....	71
8 DISCUSSÃO.....	77
9 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A - Termo de Anuência (Lacen PE).....	98
ANEXO B - Parecer de aprovação do CEP.....	100

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus constituem um sério problema de saúde pública mundial, em virtude de uma grande diversidade de patógenos que causam relevantes taxas de morbidade e/ou mortalidade, além de estarem associados a grandes epidemias (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; VASCONCELOS et al., 2013). No Brasil, aproximadamente 34 arbovírus estão associados a doenças em humanos, destacando-se pela endemicidade, sobretudo na região da Amazônia, e pelo potencial de surtos causados principalmente pelos seguintes vírus: Vírus Dengue (VDEN); Vírus da Febre Amarela (VFA); Vírus Oropouche (VORO); Vírus Mayaro (VMAY); Vírus da Encefalite de Saint Louis (VESL); Vírus Rocio (VROC); Vírus da Encefalite Equina do Leste e do Oeste (VEEL - VEEO); Vírus Chikungunya (CHIKV) e ZIKA Vírus (ZIKV) (FIGUEIREDO, 2007, 2015). Apesar do potencial risco à saúde pública, ainda existe uma enorme deficiência na disponibilidade e na qualidade, tanto dos testes de diagnósticos, como em relação às ferramentas para vigilância soropidemiológica destas viroses (LOPES et al., 2014).

Atualmente um dos arbovírus de grande relevância médica é o CHIKV, pertencente ao gênero *Alphavirus* (*Togaviridae*), um vírus de aproximadamente 70 nm, com capsídeo icosaédrico e RNA de polaridade positiva, cadeia simples de 11.8 quilo bases, organizado em proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, 6K/TF e E1) e não estruturais (nsP1-4) (RUPP et al., 2015). O CHIKV é transmitido aos seres humanos pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. Até recentemente havia sido detectado somente na África, onde estava restrito a um ciclo silvestre (DIALLO et al., 1999; JUPP; KEMP 1996), bem como na Ásia e na Índia onde sua transmissão era principalmente urbana, envolvendo os vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (VAZEILLE, 2009). No Brasil, a febre Chikungunya foi detectada pela primeira vez em agosto de 2010 e o número de casos da doença tem aumentado consideravelmente. De acordo com o último boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde foram notificados em 2016, o total de 151.318 mil casos confirmados de Febre Chikungunya no país, com 196 óbitos confirmados laboratorialmente, onde cinquenta e oito (58) destes foram registrados oficialmente em Pernambuco (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

O risco de emergência de novos arbovírus no Brasil está relacionada à existência de grandes cidades densamente povoadas, altamente infestadas por mosquitos do gênero *Aedes*. Desta maneira, seres humanos ou animais silvestres infectados podem migrar para estas cidades, de configurações eco epidemiológicas favoráveis a proliferação da doença, ocasionando a incidência do CHIKV. Ainda mais preocupante: durante a infecção de vários e

distintos organismos, o vírus pode ser selecionado pelo hospedeiro, que por sua vez pode dar condições de amplificação de cepas mais virulentas e/ou mais adaptadas (FIGUEIREDO, 2007).

De maneira geral, o diagnóstico para o CHIKV pode ser feito pelo isolamento viral, pela sorologia ou pela detecção do genoma viral no soro de indivíduos infectados (SIMMONS et al., 2016). Encontram-se disponíveis diversas técnicas de isolamento viral, porém a mais utilizada é a inoculação de soro de um paciente virêmico em culturas de células C6/36 (originárias da espécie de mosquitos, *Aedes albopictus*), seguida pela identificação do vírus em reações de imunofluorescência indireta (IFI), empregando-se anticorpos específicos, ou pela detecção do genoma viral (BRASIL, 2014). O método de diagnóstico sorológico mais usado em todo o mundo é a detecção de anticorpos IgM pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), seguido pela confirmação via teste de neutralização por redução de placas (PRNT). No entanto, o grande problema da técnica de ELISA é quanto ao número elevado de reações cruzadas com outras infecções virais (BRASIL, 2014; DASH; MOHANTY; PADHI, 2011). Anticorpos IgG aparecem tardiamente em relação ao início da doença, e sua detecção é pouco aplicada ao diagnóstico devido a necessidade de amostras de fase aguda e convalescença, além da baixa sensibilidade em resposta a infecção viral, em comparação aos anticorpos IgM (KASHYAP et al., 2010). O diagnóstico molecular através da transcrição reversa de parte do genoma viral, seguido de amplificação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) pode ser feito através de vários protocolos e apresenta as vantagens do diagnóstico rápido e precoce (identificando a fase aguda da infecção, onde a viremia está significativa) (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; PONGSIRI et al., 2012).

A RT-qPCR pode ser realizada a partir do soro ou sangue (durante a fase aguda da doença), utilizando primers específicos, permitindo a quantificação dos produtos gênicos em todas as fases da Reação em cadeia da polimerase (PCR) (BRASIL, 2014). Atualmente, diversas tecnologias de PCR em tempo real estão disponíveis no mercado, sendo o SYBR Green e o TaqMan® os dois sistemas de detecção mais usados (RODRÍGUEZ et al., 2015). Diversos protocolos para detecção de RNA do CHIKV em tempo real foram publicados (AGARWAL et al., 2013; CECILIA et al., 2015; CHIAM et al., 2013; LU et al., 2012; TELLES et al., 2009). Recebendo destaque o ensaio desenvolvido e já utilizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, Centers for Disease Control and Prevention – CDC) devido à sua ótima sensibilidade e especificidade para a detecção do CHIKV, principalmente durante a fase de infecção aguda (LANCIOTTI et al., 2007; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011). Diante da iminência de novos surtos no Brasil, este projeto objetiva a

otimização (às condições locais) e implementação de um sistema de RT-qPCR, através da inserção de um controle positivo e um controle endógeno, com base no protocolo estabelecido pelo CDC, para detecção e quantificação viral. A realização desta metodologia dentro do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ PE) é de extrema utilidade pública, uma vez que poderá ser acionado para a triagem de indivíduos infectados pelo CHIKV, dando suporte ao Ministério da Saúde, através do auxílio ao Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Milton Bezerra Sobral (Lacen PE), no caso de surtos epidêmicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 HISTÓRICO

A doença febre Chikungunya é uma infecção viral cujo agente etiológico é o vírus Chikungunya (CHIKV), descoberto há mais de 60 anos. A descoberta do vírus ocorreu após um surto ocorrido entre 1952 e 1953 em Makonde Plateau, na Tanzânia, África, e foi descrita pela primeira vez por Marion Robinson e W. H. R Lumsden em 1955, apesar de algumas epidemias, desde 1779, terem sido reportadas erroneamente como surtos pelo vírus da Dengue. A palavra “chikungunya” tem origem no local onde foi descoberto o vírus e significa “curvar-se” ou “tornar-se contorcido”, devido a uma de suas expressões clínicas que promove a formação de uma postura curvada no indivíduo acometido, gerada por fortes dores articulares em infecções graves por CHIKV (CAREY, 1971; LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1955). Após ser descoberto na Tanzânia, diversos surtos por CHIKV foram documentados em vários países localizados nas regiões Central, Ocidental e do Sul da África, entre 1960 e 1990, resultando em seu isolamento. Além do continente africano, também houveram relatos de epidemias ocorridas no sudeste asiático, em países como Tailândia, Índia, Camboja, dentre outros (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONELOS, 2015).

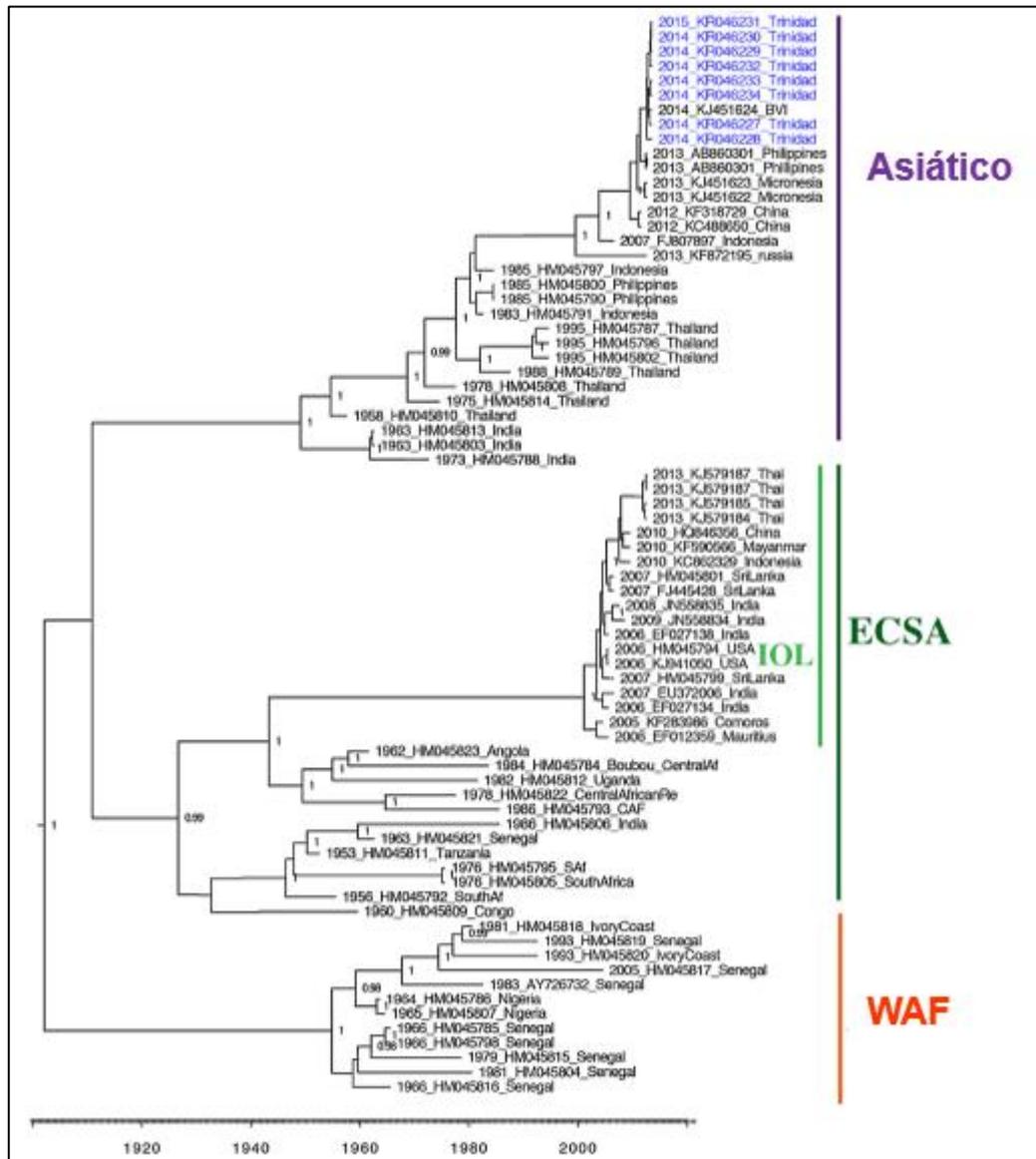
A partir de 2005, os casos de febre Chikungunya disseminaram-se para além dos países africanos e asiáticos, sendo então registrados nas ilhas de Madagascar, La Réunion e demais localidades da região sudoeste do Oceano Índico. Desde então, vários países começaram a identificar casos importados de infecção viral por CHIKV e novos surtos ocorreram, como na Itália em 2007, com presença de casos autóctones (originário do país em que habita), e entre 2009 e 2010, houve uma reincidência do vírus na ilha de La Réunion (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONELOS, 2015). Em 2013, o CHIKV foi introduzido na região do Caribe e no ano seguinte, propagou-se nas Américas, onde transmissões locais foram registradas (ab, 2014). No Brasil, ainda em 2010, houveram os primeiros relatos de casos importados de febre Chikungunya, provenientes de três indivíduos que retornaram dos países da Indonésia e Índia (ALBUQUERQUE et al., 2012; CHAVES et al., 2012).

Os principais mosquitos vetores responsáveis pela transmissão do CHIKV, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, são encontrados em diversos estados brasileiros, com exceção dos estados do Amapá, Sergipe, Roraima e Acre para o *Ae. albopictus*, o que facilitou a introdução e a dispersão do vírus no país (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONELOS, 2015). Em 2014, até início de outubro, diversos casos importados foram identificados e, no mesmo ano, o primeiro

caso autóctone brasileiro foi registrado no estado do Amapá, juntamente com uma epidemia no município de Feira de Santana (BA), com 274 casos autóctones identificados na região de um total de 299 distribuídos nos estados do Amapá, Bahia e Minas Gerais (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2014). No ano seguinte, casos autóctones e importados continuaram aumentando no país, principalmente nos estados do Amapá e Bahia (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015).

De acordo com a distribuição geográfica por onde historicamente foram identificados, quatro genótipos distintos do CHIKV foram descritos até o momento: os genótipos da África Central, Sul e Leste (do inglês, East/Central/South African, ECSA), da África Ocidental (do inglês, West African genotype, WAF), Asiático (do inglês, Asian genotype) e do Oceano Índico (do inglês, Indian Ocean lineage, IOL) (Figura 1) (VOLK, 2010; WEAVER, 2014). O genótipo WAF é caracterizado por isolados oriundos dos países da Nigéria e Senegal, enquanto o genótipo IOL, derivado do ECSA, é caracterizado por mutações adaptativas nas proteínas estruturais do vírus denominadas E1 e E2, que permitiram a transmissão também por mosquitos da espécie *Ae. albopictus*, o que resultou no aumento da sua infectividade e capacidade de dispersão na epidemia na La Réunion (TSETSARKIN et al., 2007; WAHID et al., 2017). No mesmo período, o genótipo ECSA foi introduzido na Ásia, e também está associado a epidemias na região do Pacífico Sul desde 2011, juntamente com o genótipo Asiático, este último, encontrado nas epidemias atuais nas Américas, o que reflete no potencial de dispersão de todos os genótipos do vírus CHIKV (SMALLEY et al., 2016). Em relação ao Brasil, os genótipos Asiático e ECSA já foram encontrados circulando nos estados do Amapá e Bahia (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONELOS, 2015).

Figura 1 – Árvore filogenética baseada em regiões codificantes completas de 74 sequências do CHIKV.



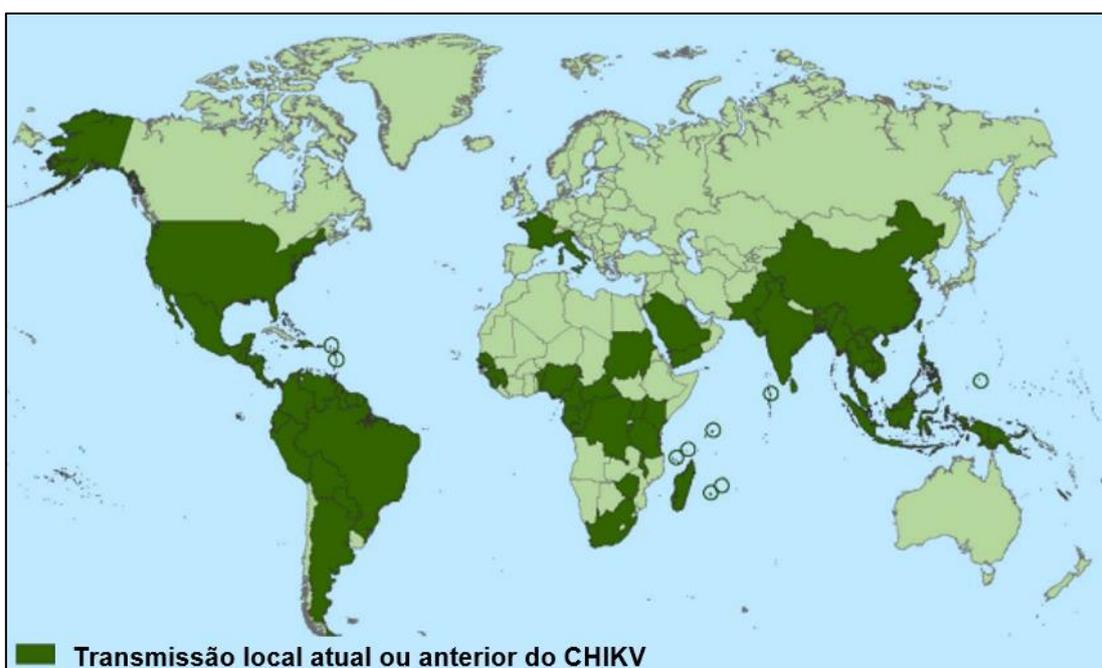
Fonte: Adaptado de Wahid et al. (2017).

Nota: Quatro genótipos do CHIKV foram identificados, de acordo com a região geográfica de origem, com base nas análises filogenéticas. O WAF apresenta isolados dos países Senegal e Nigéria. O ECSA é outro genótipo enzoótico (ocorre em certos animais) na África. O genótipo Asiático consiste de isolados dos países da Ásia. O IOL (derivado do ECSA) é o mais recente genótipo identificado, que se dispersou das ilhas do Comores (África) em 2004 e resultou em epidemias severas no Sudeste da Ásia e Índia durante o período de 2005 a 2008. Ainda, o IOL é caracterizado por mutações adaptativas nas proteínas estruturais E1 e E2 do CHIKV, o que resultou na sua transmissão também por mosquitos da espécie *Ae. albopictus*.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Desde a descoberta do CHIKV na década de 50 na África, diversas epidemias foram registradas ao redor do mundo na forma de casos importados e autóctones, principalmente. O CHIKV passou então a ser referenciado, na última década, como uma das principais causas de doenças transmitidas por vetores no mundo, identificado em mais de 100 países. Atualmente, estima-se que um milhão de casos de infecções pelo CHIKV aconteçam ao ano, mundialmente (Figura 2) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; SMALLEY et al., 2016). Até 2013, o CHIKV havia sido detectado em surtos nos países da Ásia, África, Europa, Oceano Índico e Pacífico. Posteriormente, com a introdução da transmissão local do CHIKV nas Américas em 2013, cerca de 45 países/territórios foram notificados com o vírus na região, e um total de mais de 1.7 milhões de casos suspeitos reportados, até o momento. Até julho de 2016, com relação ao número de óbitos nas Américas, os países da Colômbia e Brasil apresentaram os maiores números de mortes (direta ou indiretamente relacionados ao vírus). Em destaque o Brasil com 196 óbitos registrados em 2016 (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2016).

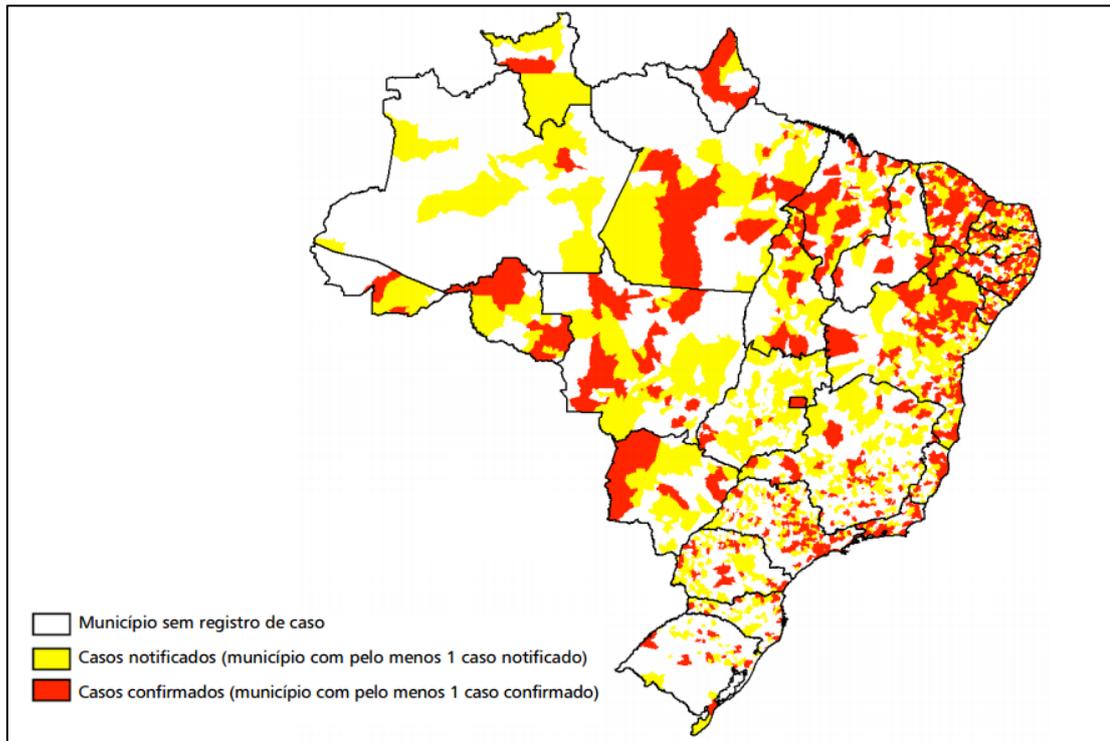
Figura 2 – Casos de infecções pelo CHIKV reportados no mundo, em 2016.



Fonte: Adaptado de Centers For Disease Control And Prevention (2016).

Nota: O CHIKV apresenta uma distribuição ampla, identificado em mais de 100 países no mundo, através de casos autóctones e importados.

O risco de emergência de novos arbovírus no Brasil, como o CHIKV, ZIKV, dentre outros, está relacionada à existência de grandes cidades densamente povoadas, altamente infestadas por mosquitos do gênero *Aedes*. Desta maneira, seres humanos ou animais silvestres (atuam como reservatórios) infectados podem migrar para estas cidades de configurações eco epidemiológicas favoráveis a proliferação das arboviroses, ocasionando altas taxas de incidências (FIGUEIREDO, 2007). Em 2016, dos 271.824 mil casos prováveis de febre Chikungunya notificados pelo Ministério da Saúde (MS), difundidos em 2.829 municípios brasileiros, 151.318 foram confirmados (Figura 3). Em comparação ao ano inteiro de 2015 (38.499 mil casos prováveis distribuídos em 704 municípios), nota-se um aumento considerável no número de casos e distribuição da doença (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015, 2016). A região nordeste, assim como no ano anterior, apresentou em 2016 a maior taxa de incidência (número de casos/100mil habitantes) de 415,7 casos no país, juntamente com um elevado número de óbitos confirmados laboratorialmente pelos seus estados. Em Pernambuco, apesar de muitos casos ainda estarem sob investigação, cinquenta e oito (58) mortes foram oficialmente registradas em 2016, apresentando o maior índice de óbitos em relação aos demais estados brasileiros (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

Figura 3 – Casos notificados e confirmados de febre Chikungunya no Brasil em 2016.

Fonte: Adaptado de Boletim epidemiológico (2016).

Nota: Em 2016, foram registrados: 271.824 mil casos prováveis de febre Chikungunya difundidos em 2.829 municípios brasileiros e um total de 151.318 casos confirmados.

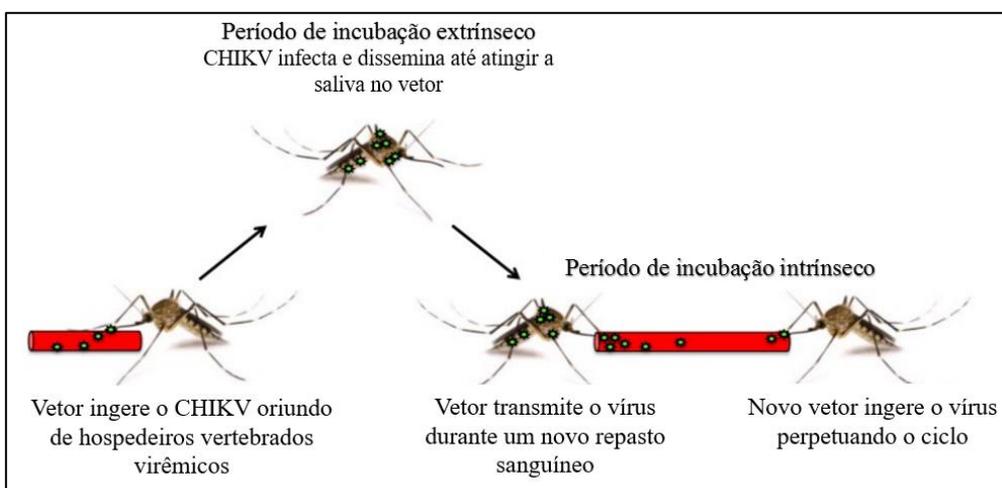
2.3 TRANSMISSÃO E VETOR

O CHIKV, assim como outras espécies de arbovírus, apresenta um ciclo biológico do tipo zoonótico, um ciclo entre artrópodes (vetores) e reservatórios de organismos vertebrados amplificadores da transmissão, como o humano, principal reservatório em períodos epidêmicos (LOPES et al., 2014). Contudo, outros vertebrados podem atuar como reservatórios principais em períodos Inter epidêmicos, a exemplo primatas não humanos como macacos (BRASIL, 2014). A transmissão do CHIKV em humanos pode ocorrer de três formas: pelo repasto sanguíneo de mosquitos vetores infectados, principalmente, de formas mais raras como da mãe para o filho no momento do nascimento (transmissão vertical) que pode acarretar em uma infecção grave no recém-nascido, e por transfusão sanguínea, em teoria, uma vez que nenhum caso foi confirmado até o momento (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014; GÉRARDIN et al., 2008). Apesar disso, em um estudo recente conduzido em amostras de doadores de sangue em Puerto Rico, Estados Unidos da América (USA), durante a epidemia de CHIKV em 2014 foi possível detectar o RNA do vírus em boa

parte das amostras testadas. Entretanto, pesquisas futuras ainda estão sendo realizadas para avaliar o risco da transmissão do CHIKV por transfusão sanguínea e sua repercussão nos respectivos receptores (SIMMONS et al., 2016). Existe também a forma de transmissão sanguínea por acidentes de trabalho em laboratórios clínicos e de pesquisa, tanto no manuseio quanto na obtenção de amostras biológicas de indivíduos infectados pelo CHIKV (BRASIL, 2014).

A transmissão principal em humanos decorre pelo repasto sanguíneo de fêmeas de mosquitos infectados, das espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, principalmente, que são amplamente distribuídas no mundo, nas regiões subtropicais e tropicais, e regiões temperadas (*Ae. albopictus*) (SIMMONS et al., 2016). O ciclo de transmissão inicia-se quando as fêmeas desses mosquitos adquirem o vírus durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados, seguido por um período de incubação (período de incubação extrínseco) de cerca de dez dias, até que os mosquitos se tornam aptos para realizar a transmissão em um novo hospedeiro (período de incubação intrínseco), onde o surgimento da sintomatologia típica só acontece em cerca de três a sete dias depois (Figura 4) (BRASIL, 2014).

Figura 4 – Processo de infecção e transmissão do CHIKV por mosquitos vetores.

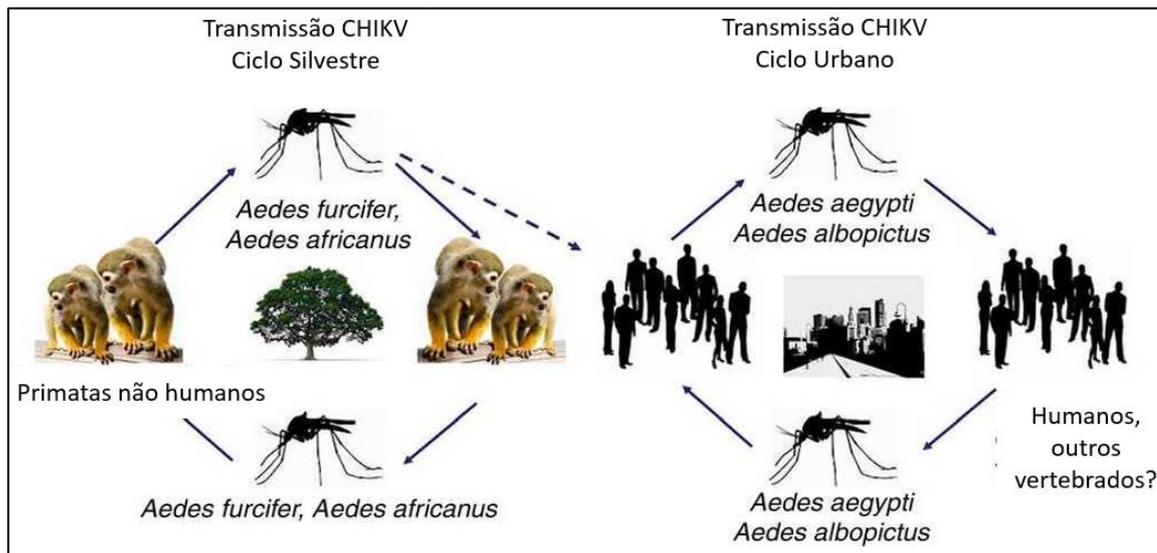


Fonte: Adaptado de Coffey, Failloux e Weaver (2014).

A incidência de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* está mais relacionada a ambientes humanos, como no interior e exterior de residências, em caixas d'água, vasos de flores, pneus de carros abandonados, dentre outros. Enquanto que a espécie *Ae. albopictus*, apresenta uma diversidade de habitats, incluindo áreas peri-urbanas (íntegram características de ambos os territórios, urbanos e rurais) (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016;

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). As espécies *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* são também responsáveis pela transmissão de outras arboviroses, como a dengue (PONGSIRI et al., 2012). Na África, além da transmissão humana, há um ciclo silvestre com primatas não humanos (macacos, chimpanzés, dentre outros) e outras espécies de mosquitos, como *Ae. africanus* e *Ae. fuscifer-taylor*, são evidenciadas. Enquanto que na Ásia e demais regiões epidêmicas, o ciclo predominante (homem-vetor) ocorre em áreas urbanas envolvendo as espécies de mosquitos principais de transmissão (*Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*) (Figura 5) (RAO; PAUL; SINGH, 1968; THIBOUTOT et al., 2010;).

Figura 5 – Ciclo de transmissão do CHIKV.



Fonte: Adaptado de Madariaga, Ticona e Resurrecion (2016).

2.4 AGENTE ETIOLÓGICO

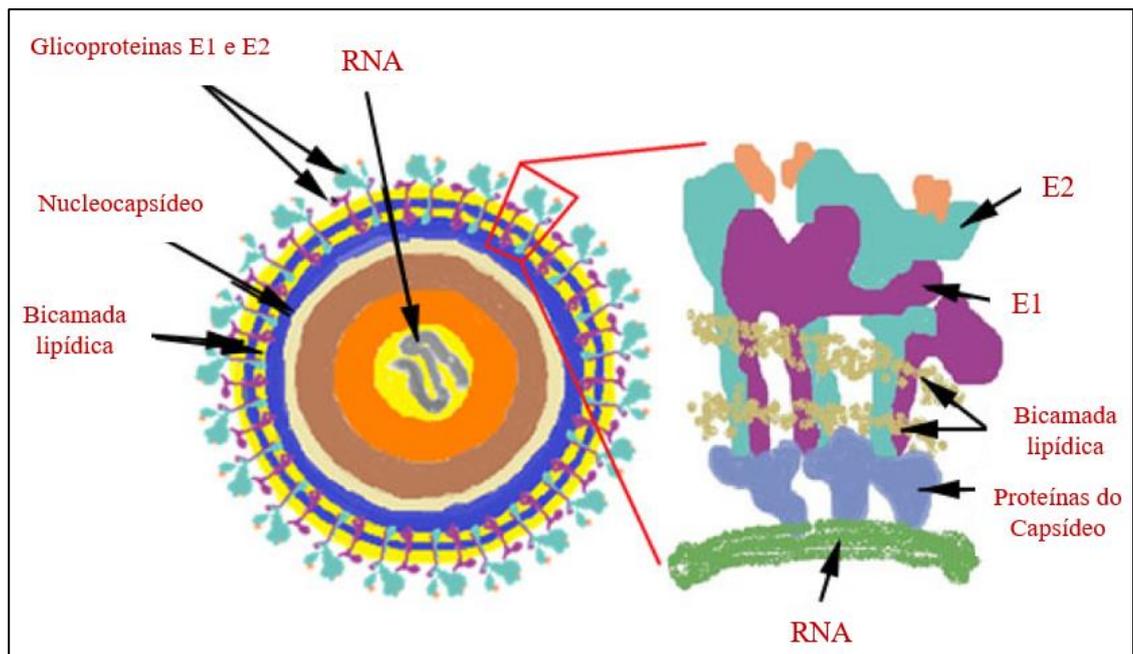
Os vírus são conhecidos como os menores organismos autoexplicativos, constituídos basicamente por um pequeno segmento de ácido nucleico encapsulado por uma estrutura proteica chamada de capsídeo, por onde interagem com o hospedeiro. Os vírus são ditos parasitas intracelulares obrigatórios devido à ausência de um metabolismo próprio, assim, invadem as células do hospedeiro, utilizando seu metabolismo celular para se replicarem (FORTERRE, 2013). De acordo com a classificação proposta pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), as diferentes espécies de vírus são agrupadas em gêneros, famílias e ordens (CONDIT et al., 2013). Recebendo destaque em nosso trabalho a família *Togaviridae*, composta por vírus de RNA de fita simples positiva, envelopados, de estrutura

esférica e que contribuem expressivamente no desenvolvimento de doenças em humanos e animais, sendo dividida em dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus* (BUCHEN-OSMOND, 2006; RUPP et al., 2015). O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* e os demais vírus desse gênero são também reconhecidos como arbovírus (do inglês, Arthropod-borne vírus), por serem transmitidos pelo repasto sanguíneo de artrópodes hematófagos, e por parte do ciclo replicativo acontecer nos insetos (LOPES et al., 2014; SOLIGNAT et al., 2009).

2.5 ESTRUTURA E GENOMA VIRAL

A estrutura icosaédrica de 70 nm de diâmetro do CHIKV é constituída pelo genoma viral circundado pelas proteínas do capsídeo (C), nucleocapsídeo, dentro de um envelope lipídico, derivado da membrana plasmática do hospedeiro, com glicoproteínas virais E1 e E2 formando projeções (do inglês, spikes) (Figura 6) (RUPP et al., 2015).

Figura 6 – Estrutura do CHIKV.



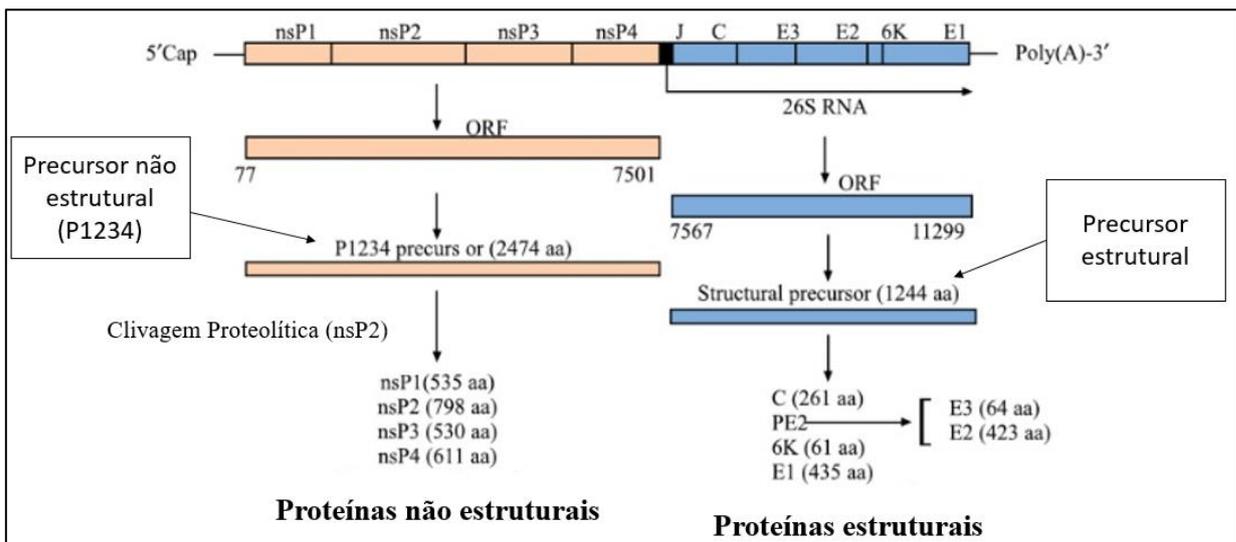
Fonte: Adaptado de Navarro e Fernández (2015).

Nota: Secção transversal do CHIKV, composto pelo genoma viral, RNA, ao centro, circundado pelo nucleocapsídeo, e envolvido pelo envelope lipídico (glicoproteínas E1 e E2 e lipídeos da membrana plasmática do hospedeiro). À direita, a estrutura viral em maior detalhe.

O genoma do CHIKV possui tamanho de 11.8 quilo bases, constituído por um RNA de polaridade positiva, linear, de fita simples (ssRNA), e organizado em proteínas estruturais e não estruturais (TALWAR; HASNAIN; SARIN, 2015). O seu genoma funciona como RNA

mensageiro (mRNA), guia para síntese proteica, com extremidades 5' cap e 3' poli A, que garantem a estabilidade e intensificam a síntese de proteínas (ALBERTS et al., 2010; COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012). Ainda, é composto por duas fases de leitura aberta, ORFs, (do inglês, open reading frame) traduzidas em poli proteínas que são clivadas para formar novas partículas virais. A primeira ORF associada a tradução das proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) necessárias à síntese de RNA, e a segunda ORF, relacionada a produção de um mRNA subgenômico (26S RNA), atuando como estratégia para expressão dos genes localizados próximos à região 3' do RNA (Figura 7) (PRESTI et al., 2016). Essa segunda ORF é direcionada à tradução das proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K/TF e E1) envolvidas na aderência do vírus às células do hospedeiro e na formação das partículas virais (KOEV; MILLER, 2000; STRAUSS; RICE; STRAUSS, 1984).

Figura 7 – Esquema de organização do genoma do CHIKV.



Fonte: Adaptado de Talwar, Hasnain e Sarin (2015).

Nota: O genoma viral é composto por um ssRNA de polaridade positiva, organizado em proteínas não estruturais (primeira ORF), através de um precursor não estrutural (proteína P1234): nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4; e estruturais (segunda ORF), através de um precursor estrutural: C, E3, E2, 6K/TF e E1.

2.6 REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação do CHIKV (duração em torno de 4 horas) apresenta como etapa inicial a internalização, e decorre da aderência do envelope viral via interação das glicoproteínas E1/E2 aos receptores da célula hospedeira, seguido pela endocitose (ingestão para dentro da célula hospedeira) da partícula viral aderida (LEUNG; NG; CHU, 2011; STRAUSS; STRAUSS, 1994). Em seguida, o PH ácido endossomal permite a formação do poro de fusão

(proteína de fusão E2) e liberação do genoma viral para o citoplasma, onde a replicação é iniciada (SOLIGNAT et al., 2009). O RNA genômico é traduzido, parcialmente, nas poliproteínas P123 e P1234 que serão processadas para formação das proteínas não estruturais (nsP1-4). Enquanto que o RNA subgenômico 26S, também é traduzido, porém, em proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, 6K/TF e E1), por um precursor estrutural (ALBERT; SCHWARTZ, 2010). As proteínas não estruturais virais estão envolvidas na replicação do genoma viral e as proteínas estruturais, na formação da partícula viral em si (LEUNG; NG; CHU, 2011).

Por fim, ocorre a união dessas estruturas proteicas para formação de um novo vírus e o envelope é adquirido ao mesmo tempo que o vírus, na sua forma madura, é liberado para fora da célula hospedeira por brotamento. No egresso, o vírus também adquire lipídeos da membrana plasmática da célula do hospedeiro que passam a fazer parte do seu envelope (Figura 8) (TALWAR; HASNAIN; SARIN, 2015).

extremidades (articulações menores do pulso, tornozelo e pé) e também as maiores articulações (LAM et al., 2001; HOCHEDÉZ et al., 2006). A artralgia, de caráter incapacitante, recebe destaque dentre os sintomas citados, pela promoção de fortes dores nos locais afetados. Principalmente quando o indivíduo está em movimento, apresentando a possibilidade de persistência por anos, caracterizando uma artralgia crônica. A pele pode ser afetada em alguns casos de infecção pelo CHIKV, expressando um rash maculopapular pruriginoso que pode ser compreendido por um tipo de erupção cutânea avermelhada, geralmente localizada no tórax. Quanto as manifestações oculares, inflamações na retina e íris são as mais frequentes, porém não conferem risco, sendo posteriormente completamente resolvidas (CAGLIOT et al., 2013; MAHENDRADAS et al., 2008).

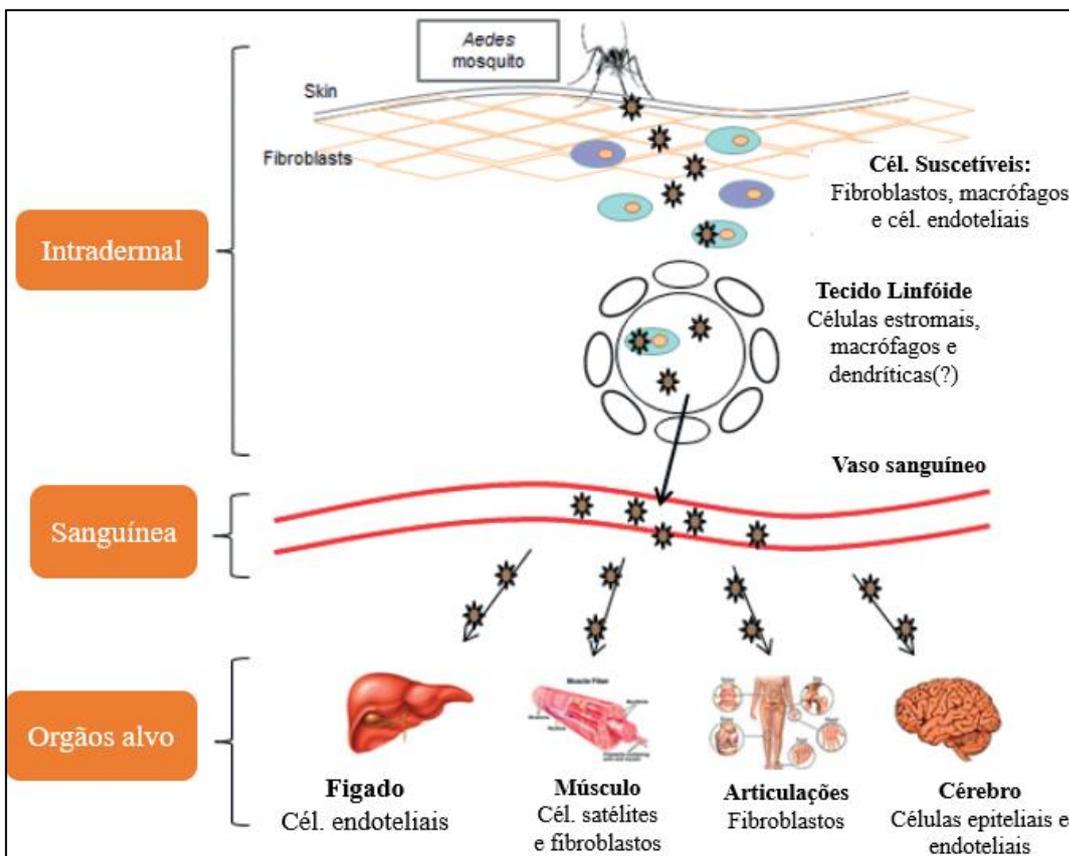
Apesar de incapacitante em algumas situações, a febre Chikungunya não é considerada de alto risco. Entretanto, casos de mortalidade atribuídos de forma direta e indireta à infecção pelo vírus estão sendo relatados nos últimos anos, assim como em epidemias históricas ocorridas nas regiões de La Réunion e Mauritius (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016; MAVALANKAR et al., 2008). Mais recentemente no Brasil, em 2016, foram registrados oficialmente 196 óbitos por infecções pelo CHIKV, destes, 58 registrados em Pernambuco. Muitos fatores podem estar associados a mortalidade, como condições pré-existentes dos indivíduos infectados, outras doenças associadas, maior gravidade da doença, problemas no manejo clínico, dentre outros (BEESOON et al., 2008; BRASIL, 2014; JOSSERAN et al., 2006).

2.8 DISSEMINAÇÃO VIRAL E IMUNOPATOGENESE

A disseminação do CHIKV ocorre em três etapas no hospedeiro: intradermal, sanguínea e órgãos alvo (CAGLIOT et al., 2013). Inicialmente, na etapa intradermal, a partir da inoculação dos mosquitos vetores na pele do hospedeiro, o vírus adentra os capilares subcutâneos, por onde a replicação viral e local acontece e, assim, o vírus infecta as células endoteliais, macrófagos e fibroblastos. Em sequência, a produção local de novos vírus é direcionada para os linfonodos (gânglios linfáticos), próximo ao local de inoculação, por onde os vírus são liberados no sistema linfático atingindo a próxima etapa, sanguínea, através do ducto torácico. Por fim, uma vez na circulação sanguínea, os vírus conseguem atingir demais localidades do organismo do hospedeiro, etapa órgãos alvo, disseminando-se por tanto, para as articulações, tecido muscular, fígado e cérebro. Nesse momento, a infecção está concentrada em macrófagos e outras células mononucleares que amplificam a infecção viral para outras regiões (Figura 9) (ALBERT;

SCHWARTZ, 2010; CAGLIOT et al., 2013). As manifestações clínicas da doença Febre Chikungunya estão associadas às infecções virais localizadas nos órgãos alvo. Nos músculos e nas articulações, por exemplo, a presença desse infiltrado de células mononucleares, somada à replicação viral, leva ao surgimento de dores fortes nessas áreas e em alguns casos artrites (inflamações nas articulações) no hospedeiro humano (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

Figura 9 – Disseminação do CHIKV no hospedeiro.



Fonte: Adaptado de Cagliot et al. (2013).

Legenda: **Intradermal**: etapa inicial da disseminação viral no hospedeiro pela inoculação dos mosquitos vetores na pele, seguida pela replicação viral local e infecção das células suscetíveis. **Sanguínea**: replicação viral direcionada ao tecido linfóide e em seguida atingem a corrente sanguínea disseminando-se pelo organismo do hospedeiro. **Órgãos alvo**: caracteriza-se pela disseminação viral para o fígado, músculo, articulações e cérebro com infecção em macrófagos e outras células mononucleares amplificadoras da infecção viral para outras regiões.

O sistema de defesa do hospedeiro em resposta à infecção promovida pelo CHIKV é iniciado pela resposta imune inata atuando como primeira barreira contra o vírus, inibindo a replicação viral por mecanismos de citólise (lise celular) e não citólise. A indução dos interferons do tipo alfa e beta (IFN- α/β) na resposta imune inata também reflete em um mecanismo crucial de resposta antiviral, já demonstrado em estudos *in vitro* com Alphavirus, atuando no combate à replicação e disseminação viral (SOURISSEAU et al., 2007; STETSON;

MEDZHITOV, 2006). Um outro ponto importante na imunidade inata, é a produção elevada de fatores pró inflamatórios, como interleucina 6 (IL-6) e IFN- α . Em uma pesquisa realizada com pacientes com poliartrite (dores em diversas articulações) induzida pela infecção por CHIKV, esses fatores pró inflamatórios foram encontrados em níveis elevados e foram apontados como uma potencial causa para o surgimento de dores crônicas nos músculos e articulações no curso da doença (WAUQUIER et al., 2011). Assim, é na resposta imune inata que o vírus interage com as células sanguíneas e monócitos/macrófagos do hospedeiro, o que desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas, e indução de processos inflamatórios. Estes, parecem justificar a presença de artralgia inicial e dores fortes nas articulações, que podem persistir por anos, mesmo após o período virêmico nos indivíduos doentes (CAGLIOT et al., 2013; HER et al., 2010). Ainda, acredita-se que o prolongamento da artralgia está relacionado com a persistência do vírus no local, fruto de uma resposta inflamatória não totalmente resolvida (CHOW et al., 2011).

A resposta imune adaptativa está associada na fase aguda (sintomatologia aparente), à presença de imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG), anticorpos anti-CHIKV, já detectadas em soros de pacientes infectados pelo vírus (PANNING et al., 2008). Também tem sido proposto que a infecção por CHIKV levaria ao desenvolvimento de uma imunidade adaptativa protetora, por esses anticorpos, posteriormente à infecção primária, sugerindo-se a promoção de uma proteção completa à reinfeção viral (GASQUE et al., 2015). Outras células do sistema imune do hospedeiro também participam da resposta imune adaptativa e apresentam a capacidade de eliminar células infectadas pelo vírus, como as células T, CD8+ e CD4+, desempenhando um papel importante na resposta efetora antiviral. As células NK (do inglês, Natural Killer Cell) também são fortemente ativadas e potencializam a resposta efetora via células T (HOARAU et al., 2013; WAUQUIER et al., 2011).

2.9 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

Até o momento não há um tratamento antiviral específico para infecções por CHIKV, utilizando-se fármacos de acordo com a sintomatologia expressa pelo indivíduo acometido. Apesar de várias drogas, ainda sob teste, já apresentarem potenciais efeitos contra o vírus, como a siRNA (pequeno RNA de interferência) contendo sequências homólogas aos genes do CHIKV e ação na inibição da replicação viral (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016; PARASHAR et al., 2013). Assim, durante a fase aguda da doença Febre Chikungunya onde os sintomas clínicos surgem, anti-inflamatórios não esteroides e medicamentos para alívio da febre

e dores como Paracetamol e Ibuprofeno, são drogas de escolha para o tratamento, além de repouso e alta ingestão de líquidos para repor a perda do mesmo, por vômitos e sudorese. Na fase subaguda e crônica, caracterizada por dores fortes articulares que podem persistir por um longo período de tempo, a terapia extensa com anti-inflamatórios não esteroides, ou corticosteroides de curto prazo para as dores severas, somada a fisioterapia moderada para os casos crônicos de rigidez muscular e artralgia prolongada, atuam como o tratamento mais indicado (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2016; BRASIL, 2014; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

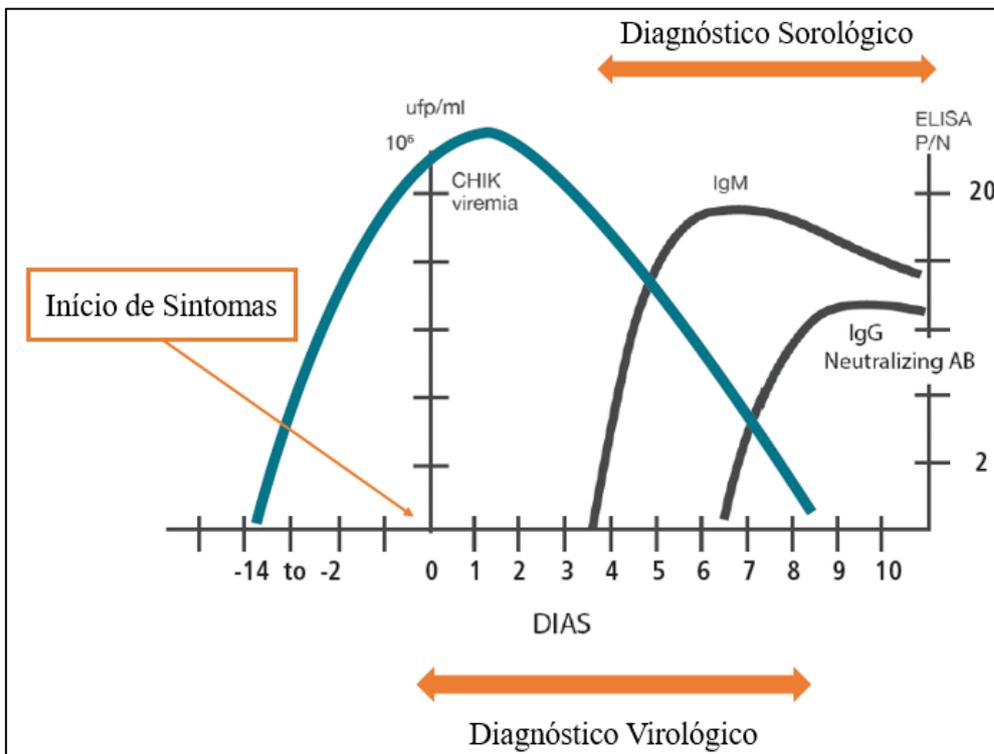
Apesar da ausência de vacinas comerciais disponíveis para prevenção ao CHIKV, até a presente data, diversos estudos estão sendo conduzidos na área de desenvolvimento de vacinas, e várias estratégias foram testadas em modelos animais, como as vacinas de DNA e de proteínas recombinantes ou partículas virais, além das estratégias envolvendo preparações de vírus inativados ou de vírus atenuado, pioneiras na área de desenvolvimento de vacinas (EDELMAN et al., 2000; HARRISON et al., 1971; WHITE; BERMAN; LOWENTHAL, 1972). A carência na produção de uma vacina está relacionada aos desafios envolvendo a sua própria validação, quanto ao desenvolvimento de uma vacina efetiva, porém ao mesmo tempo segura, de custo razoável e de ampla distribuição na população (WEAVER et al., 2012). Com isso, o controle vetorial e a proteção contra o repasto sanguíneo de mosquitos vetores pelo uso de repelentes, representam as principais medidas preventivas aplicadas ao combate a disseminação do CHIKV. Durante os surtos epidêmicos, o controle vetorial é caracterizado pela utilização de inseticidas com objetivo de reduzir os habitats dos mosquitos (CAGLIOT et al., 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

O controle da doença Febre Chikungunya deve englobar estratégias que atuem antes, durante e depois da infecção viral instaurada, para que, tanto a condução dos casos clínicos, quanto a resposta de combate das regiões possivelmente afetadas sejam satisfatórias (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011). Assim, a introdução de métodos de diagnóstico seguros e efetivos juntamente com a capacitação de profissionais na área de saúde, com a finalidade de obter um planejamento adequado destinado à triagem e manejo clínico nas unidades de saúde, atuam como medidas de controle fundamentais. Em relação às estratégias posteriores à introdução do CHIKV, estas, referem-se principalmente à execução dos planos de contingências com auxílio do Ministério da Saúde e o estabelecimento de uma comunicação contínua entre os centros e secretarias de saúde. Essa comunicação contribuirá para um controle efetivo da doença a partir do mapeamento e controle das áreas endêmicas (BRASIL, 2014; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

2.10 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da febre Chikungunya baseia-se em três métodos principais, sendo categorizados em dois grupos: sorológico pela prevalência de anticorpos, envolvendo técnicas de ELISA (do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay) e o grupo virológico com presença da viremia significativa, envolvendo o isolamento viral e a detecção molecular (GOODMAN, 2016; JOHNSON; RUSSELL). Para a escolha do método de diagnóstico utiliza-se como critério a data em que a coleta da amostra foi realizada, e sua correlação ao curso da doença, ou seja, ao início dos sintomas (Figura 10) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; PONGSIRI et al., 2012). As amostras de soro e sangue são comumente empregadas, contudo, o líquido cérebro-espinhal (LCE), também pode ser utilizado para o diagnóstico da doença nos episódios neurológicos com expressões clínicas meningoencefálicas (SIMMONS et al., 2016; BRASIL, 2014).

Figura 10 – Viremia e resposta imune em infecção pelo CHIKV.



Fonte: Adaptado de Brasil (2014).

Nota: Amostras coletadas no período de 1-3 dias, sugere-se o diagnóstico virológico por isolamento viral ou detecção molecular devido a viremia expressiva. Do 4-8 dia pode-se aplicar a detecção molecular ou sorologia, pelo início do surgimento de anticorpos frente a infecção viral e presença da viremia. Do oitavo dia em diante, recomenda-se apenas a sorologia pela presença de anticorpos que podem persistir por meses.

Diagnosticar clinicamente um indivíduo com suspeita de febre Chikungunya pode ser desafiador (BRASIL, 2014). Os sintomas clássicos de febre na presença ou ausência de dores articulares, são também compartilhados em outras doenças transmissíveis como Malária, e principalmente, nas arboviroses, como a dengue, esta, devido a possibilidade de sobreposição e dificuldade na diferenciação clínica com a febre Chikungunya (BRASIL, 2014; LIMA-CAMARA, 2016). Apesar de alguns indivíduos não apresentarem os sintomas clássicos, essas arboviroses podem ocorrer em conjunto. No caso de um diagnóstico diferencial para o vírus Mayaro, de mesma família que o CHIKV (*Togaviridae*), por exemplo, cuja apresentação clínica é similar e com histórico de circulação na região norte brasileira desde da década de 50, utiliza-se como critério de diferenciação a epidemiologia do vírus e a história de viagem do indivíduo em questão (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014; ZUCHI et al., 2014).

2.10.1 Sorológico

O diagnóstico sorológico envolve a captura de anticorpos, IgG e IgM, este principalmente, em resposta ao CHIKV nos indivíduos infectados, em amostras de soro de fase aguda e/ou convalescença em relação ao curso da doença, ou seja, soros coletados nos primeiros oito dias do início dos sintomas e no período de dez a quatorze dias após a coleta da amostra na fase aguda, respectivamente (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Geralmente, os anticorpos são produzidos no final da primeira semana de início dos sintomas e podem persistir por meses. Os protocolos dos ensaios sorológicos para realização *in house* e os kits de diagnóstico já encontram disponíveis, sendo amplamente utilizados na rotina laboratorial, como o kit Anti-CHIKV IgM human ELISA kit (Abcam, UK) (GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

O teste mais utilizado é o ELISA de captura para detecção dos anticorpos IgM, chamado de MAC-ELISA (do inglês Capture ELISA Assay) disponível nas versões *in house* ou kit comercial, seguido do teste de neutralização por redução de placas, PRNT (do inglês, Plaque Reduction and Neutralization Test), pelo aumento de quatro vezes no título de anticorpos neutralizantes contra o vírus, em amostras de soro de fase aguda e convalescença em relação ao curso da doença (BRASIL, 2014; JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). O PRNT atua como um diagnóstico de confirmação, devido a presença de reações cruzadas com outros Alphavirus como vírus o'nyong-nyong (ONNV), Sindbis (SINV) e alguns integrantes do sorogrupo do vírus da Floresta Semliki (SFV) (GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016;

LANCIOTTI et al., 2007). O MAC-ELISA *in house* é considerada uma técnica de fácil execução na rotina laboratorial e amplamente utilizada no diagnóstico sorológico do vírus, tanto em amostras de soro quanto LCE. Placas de 96 poços são revestidas com o anticorpo de captura (anti-IgM humano) e posteriormente com soro do indivíduo a ser testado, e por fim com antígeno viral não infeccioso, o qual poderá ser detectado pela ação do anticorpo antiviral. A detecção baseia-se no método colorimétrico pela interação da enzima, conjugada ao anticorpo antiviral, e ao substrato cromogênio adicionado ao teste (BRASIL, 2014; MARTIN et al., 2000). Este protocolo é utilizado no CDC para o diagnóstico de arboviroses em geral, e apesar de não apresentar ainda dados acerca de sua performance para o CHIKV, na literatura já foi relatada uma sensibilidade de 91% e especificidade 90% para o diagnóstico do vírus do West Nile (WNV), com confirmação por PRNT (MARTIN et al., 2004). Já em relação a sua performance no formato de kit comercial, o MAC-ELISA, apresentou sensibilidade alta próxima a 100% em estudo recente envolvendo os principais fabricantes (Euroimmun e Inbios CHIKV MAC-ELISA, dentre outros), e especificidade variando entre 93% a 100% (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Contudo, a sua sensibilidade é reduzida no período entre o primeiro e o quinto dia da doença na fase aguda e sua especificidade é limitada pela possibilidade do surgimento de reações cruzadas com outros vírus, como ONNV e MAYV já relatadas na literatura, tanto para o protocolo *in house* quanto para os kits comerciais (BLACKSELL et al., 2011).

A imunoglobulina IgG é também utilizada no diagnóstico sorológico do CHIKV, através do ensaio de captura de anticorpos IgG (IgG-ELISA) que diferentemente do MAC-ELISA, utiliza-se unicamente de amostras de soro, porém de ambas as fases, aguda e convalescença, o que dificulta e reduz, conseqüentemente, a sua aplicação na rotina laboratorial (BRASIL, 2014; JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Além disso, a imunoglobulina IgG não é detectada nos cinco primeiros dias de início da doença, apenas tardiamente, com níveis que permanecem mensuráveis por muito tempo e apresenta, no geral, especificidade reduzida em comparação ao IgM, no diagnóstico de arboviroses (JOHNSON et al., 2000; WESTAWAY; DELLA-PORTA; REEDMAN, 1974). Em um estudo avaliando a performance do IgG-ELISA para o diagnóstico do CHIKV, foi relatada uma sensibilidade de 45% e especificidade de 53% do ensaio, frente a amostras de soros dos indivíduos testados (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Assim, no diagnóstico sorológico do CHIKV, o ensaio do MAC-ELISA prevalece em relação a aplicabilidade e a performance em comparação ao IgG-ELISA (BRASIL, 2014).

2.10.2 Viroológico

No início da infecção, nos primeiros oito dias, recomenda-se a realização do diagnóstico virológico, pelos métodos de isolamento viral e detecção molecular, devido à presença do vírus na circulação sanguínea (viremia) de forma significativa, possibilitando a detecção e identificação viral nos indivíduos infectados (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

2.10.2.1 ISOLAMENTO VIRAL

O isolamento viral pode ser conduzido em amostras de soro de fase aguda e em mosquitos coletados no campo, na pesquisa clínica, seguido pela inoculação intracerebral em animais, como camundongos, ou em linhagens celulares susceptíveis ao vírus, como as de mamíferos, HeLa, BHK-21 e Vero, e a linhagem de mosquitos C6/36 (SHAH; GIBBS; BANERJEE, 1964). Encontram-se disponíveis diversas técnicas de isolamento viral, porém a mais utilizada é a inoculação de soro de um indivíduo virêmico em culturas de células C6/36 (originárias da espécie de mosquitos, *Aedes albopictus*), seguida pela identificação do vírus em reações de imunofluorescência indireta (IFI), empregando-se anticorpos específicos, ou por transcrição reversa de parte do genoma viral, seguido de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), aplicando-se o sobrenadante de cultura de células (BRASIL, 2014). Apesar da alta especificidade, 100%, conferida ao isolamento viral e de ser considerado padrão ouro no diagnóstico do CHIKV, a sua sensibilidade varia, e na prática de acordo com o tipo de linhagem celular a sensibilidade descrita é de apenas 40.5% (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

A interpretação do diagnóstico pelo isolamento viral baseia-se na visualização do efeito citopático (CPE), que pode ser compreendido por alterações morfológicas celulares, produzido pelo vírus entre a primeira e segunda semana, seguido de um novo isolamento positivo, o que confere uma desvantagem no tempo de processamento da técnica. Além da necessidade da instalação de um laboratório com nível três de biossegurança (BSL-3) devido ao risco de transmissão pela manipulação do vírus (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011). Outras implicações também são evidenciadas no isolamento viral, como a restrição no tempo de coleta (deve ser realizada de forma rápida em indivíduos infectados de fase aguda) e a qualidade na obtenção e transporte das amostras de soros a serem testadas, tornando o isolamento viral um método de diagnóstico de baixa aplicação na rotina laboratorial para o diagnóstico de CHIKV (BRASIL, 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

2.10.2.2 DETECÇÃO MOLECULAR

O diagnóstico molecular, também conhecido como detecção molecular, em comparação ao isolamento viral, oferece as vantagens de um diagnóstico mais rápido, sensível e efetivo (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). A detecção molecular, portanto, mostra-se ideal para o uso em laboratórios de análises clínicas, a partir da captura de sequências específicas do genoma do vírus em poucos dias do início dos sintomas, nos indivíduos infectados (JACOBSEN et al., 2016). Três métodos podem ser empregados para detecção molecular do vírus Chikungunya: RT-PCR, RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-LAMP (do inglês, Isothermal amplification methods). De maneira geral, a extração do RNA viral, seguida da amplificação, detecção e caracterização de sequências vírus específicas, resultam nos passos aplicados nessas três técnicas moleculares (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). A técnica mais utilizada na rotina laboratorial do diagnóstico molecular de CHIKV, é a RT-qPCR que apresenta como alvo inicial o RNA e sua detecção é de forma quantitativa e em tempo real (BRASIL, 2014; WONG; MEDRANO, 2005).

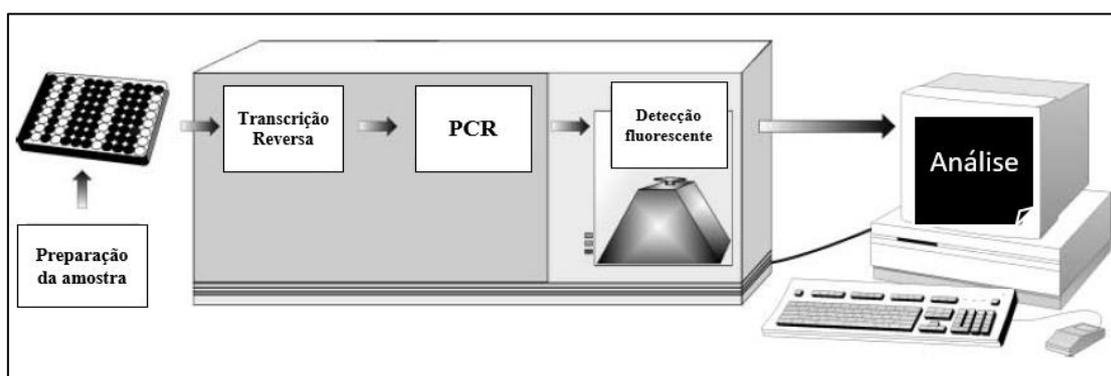
A RT-qPCR pode ser feita através de vários protocolos, em amostras de soro ou sangue, apresentando as vantagens do diagnóstico rápido, sensível e precoce (identificando a fase aguda da infecção, onde a viremia está significativa) (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; PONGSIRI et al., 2012). Diversos protocolos para o diagnóstico molecular do CHIKV foram publicados (AGARWAL et al., 2013; CECILIA et al., 2015; CHIAM et al., 2013; LU et al., 2012; TELLES et al., 2009). Entretanto, ao comparar a performance das técnicas e a aplicabilidade na rotina de diagnóstico, não foram satisfatórias, sendo alguns deles aqui descritos. Em um ensaio utilizando a tecnologia de Amplificação baseada em sequências de ácidos nucleicos (do inglês, Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA), apesar da especificidade relatada de 100%, a sensibilidade para o diagnóstico do CHIKV foi menor, 200 cópias por reação, com um sistema complexo que apresenta limitações na possibilidade de contaminações por ribonucleases (RNase) (LAURI; MARIANI, 2009; TELLES et al., 2009). Um outro ensaio utilizando a metodologia do RT-LAMP para detecção de CHIKV e DENV apresentou aplicabilidade reduzida pela necessidade de etapas adicionais para a obtenção do resultado, como a avaliação do grau de turbidez da amostra e eletroforese em gel de agarose (LU et al., 2012). Já em um ensaio multiplex de RT-qPCR para DENV e CHIKV, a sensibilidade foi menor, com variações de 1 a 50 PFU (unidade formadora de placa) (CECILIA et al., 2015). Entretanto, o ensaio desenvolvido e já utilizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e demais centros de saúde no Brasil, como o Lacen PE, baseado no sistema TaqMan® de detecção,

apresentou alta sensibilidade de <1 PFU e especificidade de 100% para a detecção do CHIKV, principalmente durante a fase de infecção aguda. O conjunto de primers e sonda desenvolvidos pelo ensaio, (com base na cepa CHIKV prototype strain S27 GenBank: AF369024.2) apresentou uma sensibilidade de 0,9 e nenhuma reação cruzada foi observada (LANCIOTTI et al., 2007; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011).

2.10.2.2.1 RT-qPCR

A RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV necessita de uma etapa inicial (transcrição reversa de parte do genoma viral), que pode ser em única etapa ou em duas etapas, a partir da enzima transcriptase reversa, resultando na produção de um DNA complementar ao RNA (cDNA), utilizado então, como alvo para a PCR, onde a amplificação do produto será monitorada em tempo real nos diversos ciclos (Figura 11) (BUSTIN, 2000; GULLETT; NOLTE, 2015). O sistema de detecção dessa técnica baseia-se na emissão de um sinal fluorescente durante a amplificação do produto de DNA a cada ciclo, em decorrência da ação de fluoróforos, moléculas que apresentam a capacidade de absorver e emitir luz quando excitadas (WILLIAMS et al., 1996).

Figura 11 – Etapas de um ensaio de RT-qPCR.

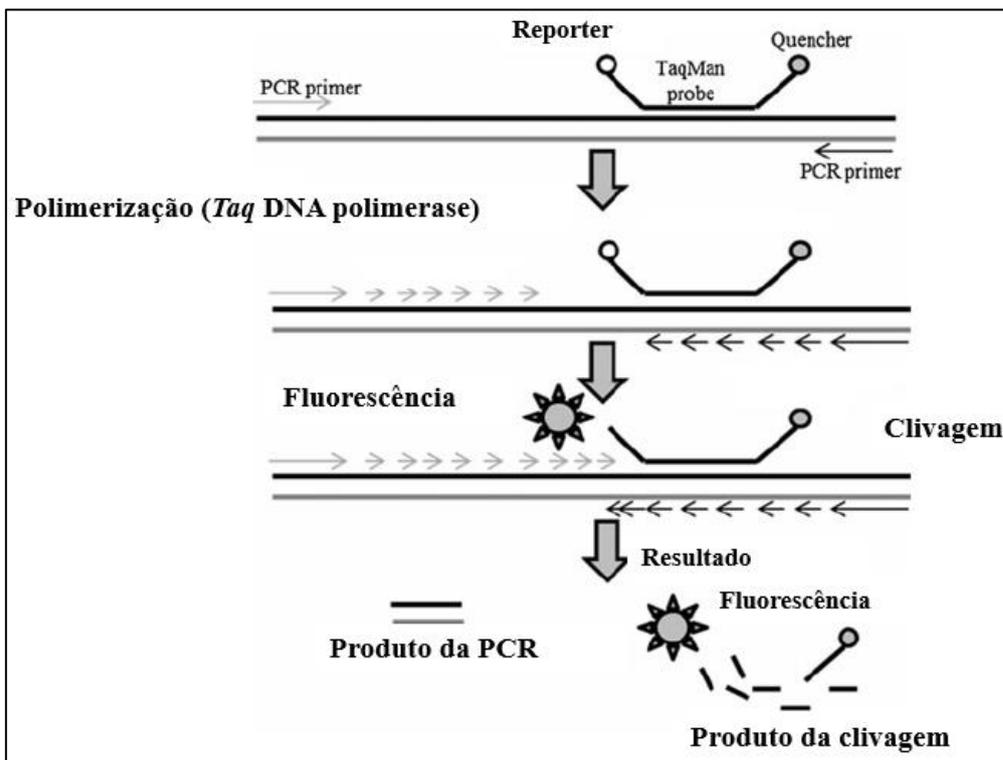


Fonte: Adaptado de Bustin (2000).

Há dois tipos de sistemas de detecção amplamente utilizados na PCR em tempo real, o SYBR Green (corante que emite fluorescência ao se ligar a qualquer DNA dupla fita, dsDNA) e o TaqMan®, este mais específico por se tratar de uma sonda (do inglês, reporter probe) que se anela especificamente a sequência alvo de DNA (NAVARRO et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2015). Para o seu funcionamento, a sonda TaqMan®, que é formada pelo reporter

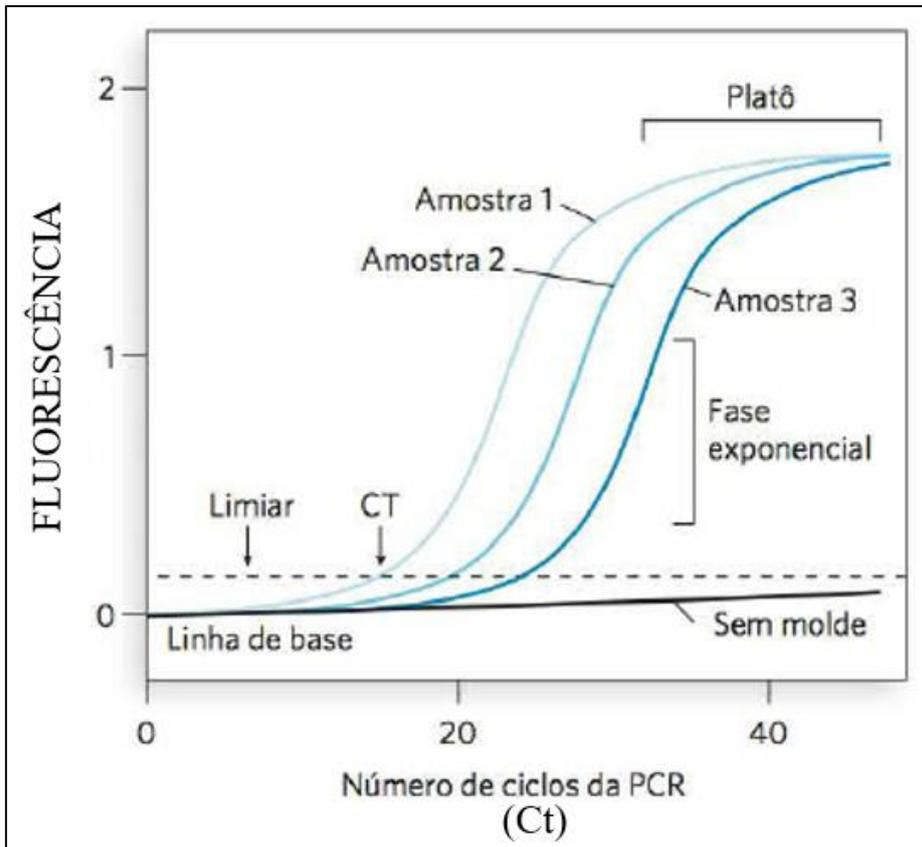
(fluoróforo) e o quencher (molécula que absorve a fluorescência emitida pelo reporter), utiliza-se da função exonuclease 5'-3' da enzima *Taq* DNA polimerase. Assim, logo após o anelamento da sonda ao alvo, há uma hidrólise pela enzima (durante a fase de extensão na PCR), promovendo a separação do quencher do reporter e emissão de sua fluorescência (Figura 12) (WILLIAMS et al., 1996; WONG; MEDRANO, 2005). Quando essa fluorescência emitida na reação ultrapassa um limiar específico de fluorescência do sistema, um ponto é gerado, sendo conhecido por *Cycle Threshold* (C_t), que corresponde ao número de ciclos no qual a amplificação da sequência alvo de DNA foi detectada (KUBISTA et al., 2006). O C_t apresenta uma relação inversamente proporcional a quantidade de produto amplificado, no qual quanto mais rápido o limiar for ultrapassado, pela emissão do sinal fluorescente, menor será o valor do C_t e maior a quantidade do alvo presente na reação, o que permite, portanto, sua quantificação em tempo real através de diluições seriadas do alvo (curva padrão) (Figura 13) (GULLETT; NOLTE, 2015).

Figura 12 – Mecanismo de funcionamento do sistema TaqMan®.



Fonte: Adaptado de Botes, Kwaadsteniet e Cloete (2013).

Nota: O funcionamento da sonda TaqMan® é baseado na função exonuclease 5'-3' da enzima *Taq* DNA polimerase. Durante a fase de extensão da PCR, a enzima realiza a polimerização e hidrolisa a sonda anelada a sequência alvo. Essa clivagem, gera a separação do fluoróforo (reporter) do quencher, resultando na emissão de sua fluorescência indicando que o produto da PCR foi formado.

Figura 13 – Gráfico de amplificação da PCR em tempo real.

Fonte: Adaptado de Cox, Doudna e O'donnell (2012).

Nota: O gráfico ilustra a amplificação (Fase exponencial) de um alvo na PCR em tempo real, em amostras com concentrações variadas (Amostra 1, 2 e 3), até atingirem a fase platô. Quando a fluorescência emitida ultrapassa o limiar do sistema, o C_t é gerado. *Cycle Threshold* (C_t) corresponde ao número de ciclos no qual a amplificação da sequência alvo de DNA foi detectada. Quando o alvo está mais concentrado (Amostra 1) sua amplificação atinge o limiar do sistema precocemente e um C_t menor é então gerado.

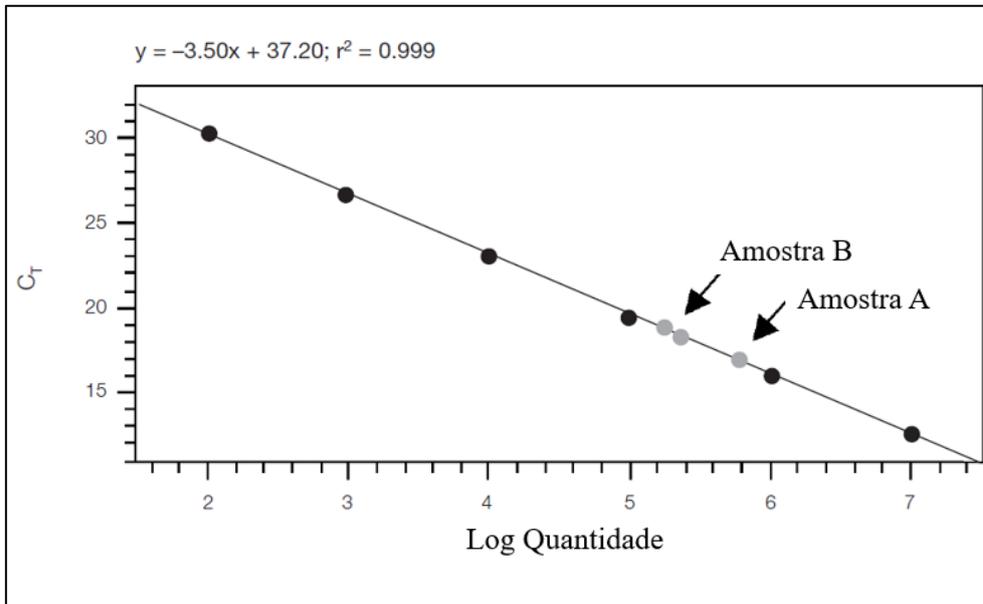
A PCR em tempo real apresenta diversas vantagens como a elevada sensibilidade na detecção do alvo e a ausência de etapas posteriores à reação para visualização do resultado, (como a eletroforese em gel de agarose no caso da PCR convencional) otimizando e reduzindo assim, o risco de contaminação do ensaio. Além da possibilidade de ensaios multiplex (mais de um alvo na mesma reação), tempo de processamento reduzido e a capacidade de analisar simultaneamente um número maior de amostras (HEID et al.,1996; KLEIN, 2002).

Uma diferença crucial entre a PCR convencional e em tempo real está justamente na capacidade de detectar e quantificar o alvo durante a fase exponencial de amplificação (WILLIAMS et al., 1996). Uma das aplicações da PCR em tempo real no diagnóstico e pesquisa clínica de vírus está na construção de uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas do RNA viral, que será aplicada como método comparativo para a quantificação absoluta de

amostras de RNA (Figura 13) (FRONHOFFS et al., 2002; KLEIN, 2002). Assim, a determinação da carga viral utilizando uma curva padrão, permite além da possibilidade de uso no diagnóstico e prognóstico de doenças, o seu uso no monitoramento terapêutico ou preventivo dos indivíduos acometidos (GULLETT; NOLTE, 2015).

A curva padrão fornece parâmetros importantes (*efficiency*, *slope* e r^2) que analisam o desempenho e a correlação dos pontos da curva, permitindo também avaliar o limite de detecção (do inglês, Limit of detection, LOD) de um ensaio (BUSTIN et al., 2009). O parâmetro *efficiency* (eficiência) está relacionado a duplicação do alvo durante cada ciclo da fase exponencial da PCR em tempo real. Em um ensaio, uma eficiência de 100% corresponde a um *slope* (inclinação da curva) de -3.32. Na prática, o *slope* representa a diferença entre valores de C_t em uma curva, sendo o valor de -3.32 a diferença entre C_t ideal, calculada com base na fórmula $(E) = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ (BURNS et al., 2005; BURNS; VALDIVIA; HARRIS, 2004). Assim, para a obtenção de resultados reprodutíveis e acurados, espera-se que as reações apresentem uma eficiência mais próxima de 100% possível. Uma eficiência entre 90% e 110% que equivale a um *slope* variando entre -3.58 a -3.10, já pode ser considerado um parâmetro adequado para uma boa reação de PCR em tempo real (BIO-RAD LABORATORIES, 2006; WONG; MEDRANO, 2005). Em uma curva padrão, o r^2 (coeficiente de correlação) avalia a correlação entre os pontos e a linearidade da curva, assumindo-se o valor de 1,0 como ideal na reação (Figura 14) (BUSTIN et al., 2009).

Figura 14 – Representação esquemática da curva padrão em um ensaio de PCR em tempo Real.



Fonte: Adaptado de Bio-Rad Laboratories (2006).

Nota: Quantificação de duas amostras (A e B) através da curva padrão com diluições seriadas de fator 10 do alvo. A equação de regressão linear ($y = -3.50x + 37.20$) acima é utilizada como base para determinar a quantidade do alvo nas amostras no sistema. O r^2 é o coeficiente de correlação e avalia a correlação entre os pontos e a linearidade da curva.

Além da ampla funcionalidade da curva padrão no ensaio, a inserção de um controle endógeno é também de extrema importância, principalmente na implementação de um diagnóstico, uma vez que poderá assegurar a qualidade do mesmo, evitando a ocorrência de resultados falso negativos promovidos por inibidores (internos ou externos à reação), por exemplo (BURD, 2010). Essa inibição pode decorrer de alterações na concentração iônica ou viscosidade, alterações do pH, ou até mesmo pela inibição direta da enzima *Taq* polimerase (BURD, 2010; WILLIAMS et al., 1996). Frequentemente, utiliza-se genes constitutivos (do inglês, genes housekeeping) dos hospedeiros como controles endógenos do ensaio, por estarem presente naturalmente nas amostras, e assim, sua detecção no diagnóstico juntamente com o alvo principal (do patógeno em questão), permite garantir também que a coleta e a extração da amostra foram bem-sucedidas (FUKASAWA et al., 2010; WONG; MEDRANO, 2005).

O controle endógeno deve amplificar com a mesma eficiência que o alvo principal do ensaio (WILLIAMS et al., 1996). Um controle endógeno já utilizado em ensaios de detecção de vírus é a ribonucleoproteína P, também conhecida por RNase P humana (RNP). Trata-se de uma ribonuclease nuclear, enzima composta por várias subunidades proteicas, com funções no processamento do RNA transportador (tRNA) e na transcrição de pequenos genes não codificantes de RNA (tRNA, rRNA) (CUI et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA

SAÚDE, 2009; REINER et al., 2006). Logo, atua também como um gene constitutivo por estar presente em todas as células e compartimentos celulares que sintetizam tRNA (FUKASAWA et al., 2010; JARROUS, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho se insere com a finalidade de aperfeiçoar o diagnóstico molecular do CHIKV, desenvolvendo um ensaio de RT-qPCR que permita além da detecção, a quantificação do vírus, através da introdução do controle positivo (transcrito de RNA) e do controle endógeno da RNP, com base no protocolo elaborado pelo CDC. Esta metodologia poderá ser aplicada na rotina de diagnóstico, auxiliando no manejo clínico dos casos de infecção pelo CHIKV e também em pesquisas acerca do vírus.

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil por ser considerado alvo de surtos epidêmicos de febre Chikungunya, deve se engajar e apresentar medidas de controle e prevenção da doença para um manejo clínico apropriado. Atualmente, são poucos os laboratórios de pesquisas que disponibilizam o diagnóstico do CHIKV para a população em geral, como o Instituto Evandro Chagas do Ministério da Saúde, localizado no Pará, único centro de referência do país. Para a detecção da infecção aguda, a estratégia mais eficiente é a detecção do vírus por RT-qPCR, um método de diagnóstico rápido, precoce e extremamente sensível, principalmente na detecção de novos casos.

Assim, o presente estudo visa otimizar e implementar em nosso laboratório um sistema de RT-qPCR para a detecção e quantificação do CHIKV com base no protocolo desenvolvido pelo CDC. A inserção de tal método é imprescindível para o mapeamento de possíveis áreas endêmicas, evitando assim o avanço dessa virose no país. A realização desta metodologia dentro do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ PE) é de extrema utilidade pública, uma vez que poderá ser acionado para a triagem de indivíduos infectados pelo CHIKV. A proposta científica aqui apresentada objetiva, ainda, colaborar com o Ministério da Saúde no diagnóstico do vírus, através do auxílio ao Lacen PE, no caso de novos surtos epidêmicos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação e desenvolvimento da RT-qPCR para detecção do vírus Chikungunya (CHIKV), com base no protocolo estabelecido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o sistema de RT-qPCR para detecção e quantificação do CHIKV, analisando o limite de detecção através de uma curva padrão;
- b) Otimizar a RT-qPCR para detecção do controle endógeno (RNase P humana);
- c) Avaliar o desempenho da RT-qPCR frente a amostras de soro;
- d) Correlacionar a carga viral com os dados referente a idade, sexo e IgM da população estudada;
- e) Estabelecer um sistema multiplex para a detecção simultânea do CHIKV e do controle endógeno (RNase P humana) em amostras de soro.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

A população alvo definida para o estudo é composta por indivíduos residentes em áreas endêmicas do estado de Pernambuco, diagnosticados para o CHIKV no Lacen PE, através do sistema de RT-qPCR estabelecido pelo CDC. Para o desenvolvimento do estudo, o processamento e as análises moleculares das amostras da população alvo foram realizados no Laboratório de Virologia, Departamento de Virologia (Lavite) do IAM.

Trata-se de um estudo envolvendo a otimização e avaliação da sensibilidade da RT-qPCR para a detecção e quantificação do CHIKV. Para a seleção das amostras do estudo, foi realizada uma triagem a partir dos registros clínicos arquivados no Lacen PE. Foram selecionadas amostras de soro de indivíduos com menos de oito dias de sintomas (correspondendo a fase aguda de infecção), sem restrição de idade e sexo (critério de inclusão). Foram excluídas amostras que não se enquadravam no critério de inclusão, assim como amostras consideradas insuficientes para as análises.

5.2 CÁLCULO AMOSTRAL

Baseado em uma taxa de incidência da Febre Chikungunya de 89%, com nível de confiança de 95%, e utilizando a população de Pernambuco como base, o tamanho da amostra estimado foi de 151 pacientes calculado através do programa OpenEpi (versão 3.03), utilizado para estatísticas epidemiológicas (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016; DEAN; SULLIVAN; SOE, 2013; HAJIAN-TILAKI, 2014).

5.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram selecionadas amostras de soro de indivíduos com menos de oito dias de sintomas (correspondendo a fase aguda de infecção), registradas no Lacen PE, no primeiro semestre de 2016 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016).

5.4 ALVO MOLECULAR

O alvo molecular utilizado foi a sequência gênica de tamanho 126 pares de base (pb). Este alvo corresponde a região conservada do genoma viral, presente nos genótipos do CHIKV, que codifica as proteínas virais não estruturais (nsP1-4) (CHIKV prototype strain S27-GenBank: AF369024.2) (Figura 15) (LANCIOTTI et al., 2007).

Figura 15 – Alvo molecular do CHIKV.

```
GGTACCGGATCCGACAGAAACATCTCTGGAAAGATCGGGGACTTACAAGCAGTAATGGCCGTGCCAGACACGGA
GACCCAACATTCTGCTTACACAGATGTATCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCGATATAACCAAGACGTCTAT
GCTGTACACGCCACCCACGTCGCTATAACCAGGCGATTAAAGGGGTCCGATTGGCGTACTGGGTAGGGTTTGAC
ACAACCCCGTTCATGTACAATGCCATGGCGGGTGCTACCCCTCATACTCGACAAATTGGGCAGATGAGCAGGTAC
TGAAGGCTAAGAACATAGGATTATGTTCAACAGACCTGACGGAAGGTAGACGAGGCAAATTGTCTATTATGAGAG
GAAAAAAGCTAGAACCGTGCACCGTGTGCTTCTCAGTAGGGTCAACGCTCTACCCGAAAGCCGTAAGCTA
CTTAAGAGCTGGCACCTACCATCGGTGTTCCATTTAAAGGGCAAACCTCAGCTTCACATGCCGCTGTGATACAGTGG
TTTCGTGTGAAGGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCAGGCCTTTACGAAAAACCACAGGGTATGCGG
TAACCCACCACGCAGACGGATTCTGATGTGCAAGACCACCGACACGGTTGACGGCGAAAAGAGTGTCAATTCTCG
GTGTGCACGTACGTGCCGGCGACCATTTGTGATCAAAAAGAAAGTCCAATGGATAGGTTACAGTAGACATGAAA
AGGGATGTGAAGGTGACTCCTGGTACAAAACACAGAGGAAAGACCTAAGGTACAGGTTATACAGGCGGCTGA
ACCCTTGGAACAGCATACCTATGTGGATTACAGAGAGCTGGTTAGGAGGCTGAACGCCGCTCCTCTACCCAA
TGTACATACTATTGACATGTCTGCCGAGGATTCGATGCCATCATAGCCGCACACTTTAAGCCAGGAGACACT
GTTTTAGAAACGGACATAGCCTCCTTTGATAAGAGCCAAGATGATTCACTTGCCTTACTGCTTTAATGCTGTTAGA
GGATTTAGGGGTGGATCACTCCCTGTTGGACTTGATAGAGGCTGCTTTCGGAGAGATTTCCAGCTGTCATCTAC
CGACAGGTACGGCGCTTCAAGTTCGGCGCCATGATGAAATCTGGTATGTTCTAACTCTGTTTCGTCAACACACT
GCTAAATATACCATCGCCAGCCGAGTGTGGAAGATCGTCTGACAAAATCCGCGTGCGCAGCCTTCATCGGCGA
CGACAACATAATACATGGAGTCGTCTCCGATGAATTGATGGCAGCCAGATGCGCCACTTGATGAACATGGAAGT
GAAGATCATAGATGCAGTTGTATCCCAGAAAGCCCCTTACTTTTGTGGAGGGTTTTCTAGAAAGCTT
```

Tamanho: 1416 pb

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: As sequências em destaque nas cores verde e roxo correspondem aos primers, e em amarelo, a sonda.

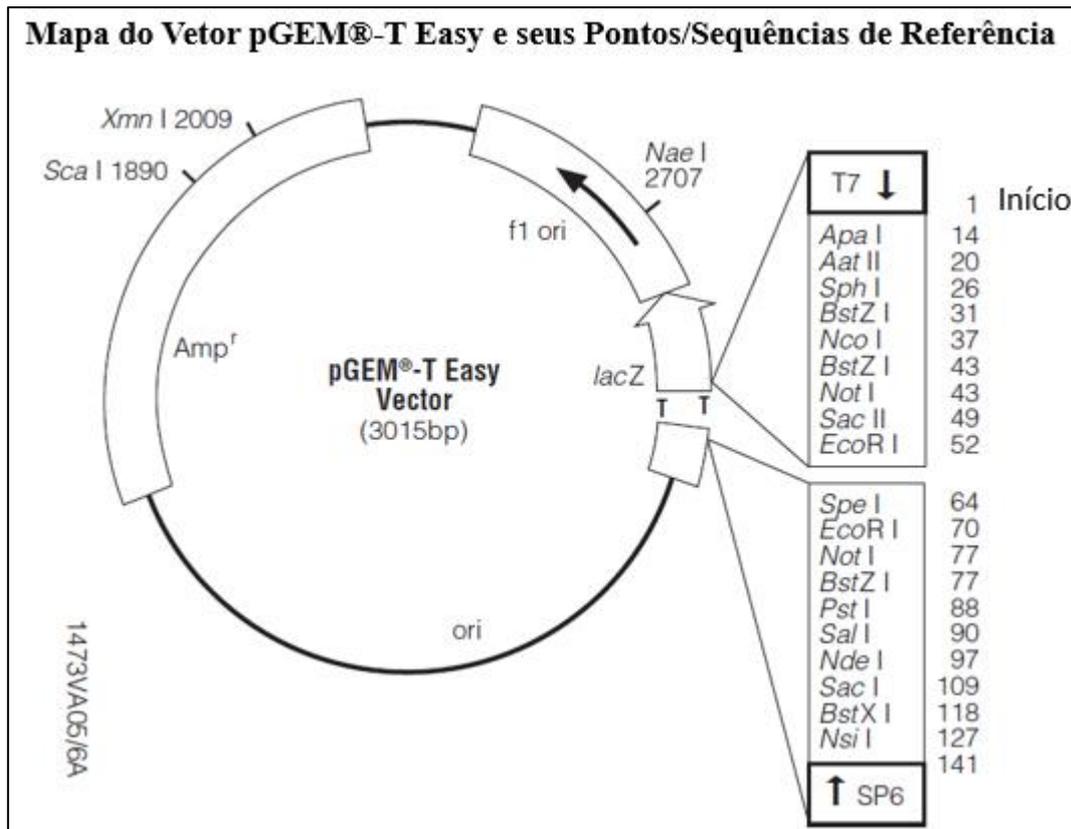
Nota: O primers amplificam a sequência de 126pb (alvo molecular) destacada em negrito na figura, e foram utilizados tanto na clonagem quanto na reação de RT-qPCR (juntamente com a sonda) descritas a seguir em nosso trabalho.

5.5 CLONAGEM GÊNICA DO ALVO MOLECULAR

A estratégia utilizada para a clonagem foi a de amplificar inicialmente a região de interesse (alvo molecular) (Figura 15) em uma reação de PCR simples, usando os primers de maior sensibilidade desenhados por Lanciotti et al. (2007) (Quadro 2). O gene sintético desenvolvido pela equipe para obtenção do alvo molecular foi enviado pela empresa Integrated DNA Technologies (IDT, EUA), liofilizado, para conservação do produto biológico. Em

seguida, foi então ressuspenso em nosso laboratório em tampão TE (tampão Tris – HCL-EDTA), para atingir a concentração final de 10ng/μl conforme indicação do fabricante, antes de dar seguimento a clonagem do alvo molecular. Com o objetivo de concentrar o gene sintético foram realizadas três reações de PCR com volume final de 50μl, utilizando o GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) que facilita a PCR e minimiza o tempo de processamento, por conter em único tubo todos os reagentes da PCR (à exceção dos primers) e um corante para análise direta na eletroforese em gel de agarose. Assim na reação, foram adicionados 25μl do Master Mix, 0,5μl de cada primer a 50μM de concentração, 0,5μl do gene sintético e o restante de água ultrapura (Milli-Q®). Utilizando um termociclador, as reações de PCR foram conduzidas da seguinte forma: uma desnaturação inicial a temperatura de 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos (94°C – 30s; 52°C – 30s; 72°C – 30s) e uma extensão final de 72°C por 5min. Os fragmentos de 126 pb foram visualizados em eletroforese e purificados usando o Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences), conforme indicações do fabricante. A segunda etapa do processo de clonagem, foi caracterizada pela ligação do alvo molecular purificado ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) (Figura 16) seguindo as instruções do fabricante, nas proporções 1:3 e 1:8 de vetor: inserto.

Figura 16 – Vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega).



Fonte: Adaptado de Promega (2015).

Legenda: Em destaque o gene de resistência a ampicilina (Amp^r) e o gene *LacZ*, necessários na verificação do sucesso da clonagem.

Nota: Os sítios de clonagem estão localizados próximos ao gene *LacZ*, delimitados pelas sequências promotoras com os sítios de iniciação das enzimas RNA polimerase T7 e SP6, que atuam na transcrição *in vitro*.

A terceira etapa da clonagem foi a de transformação bacteriana por eletroporação, que tem por finalidade amplificar o DNA plasmidial (ligação) na forma de várias cópias, aplicando-se uma alta voltagem (choque elétrico). Esse choque promove a formação de poros nas membranas celulares bacterianas e assim, a entrada do DNA na célula (SOLIOZ; BIENZ, 1990). Para isto, utilizou-se 2 μ l de cada ligação em 50 μ l de células bacterianas do tipo eletrocompetentes, produzidas em todo laboratório. As misturas foram então submetidas ao processo de eletroporação nas seguintes condições: 5 pulsos de 2000V (voltagem) e duração de 0,99s. Com o objetivo de recuperar e promover o crescimento das bactérias transformadas, foi adicionado 950 μ l de SOC (meio de cultura bacteriano enriquecido) para cada transformação, sendo deixadas por 1 hora em um agitador (velocidade: 2.000rpm a 37°C), sob constante movimentação. Posteriormente, 50 μ l das transformações foram plaqueadas em um meio seletivo do tipo LB/Amp (meio de cultura bacteriano Luria-Bertani broth, acrescido do

antibiótico ampicilina), no qual as substâncias indicadoras IPTG e X-GAL foram também adicionadas as placas nas quantidades de 10µl e 20µl, respectivamente. As placas foram deixadas de um dia para o outro (O.N – overnight) em uma estufa a 37°C.

O plaqueamento em meio seletivo permite o isolamento das colônias bacterianas contendo os clones de interesse, no caso, o vetor de clonagem utilizado contém um gene de resistência a ampicilina e o gene LacZ (Figura 16). Este, quando interrompido no processo de clonagem, não codifica sua enzima e por tanto não há o consumo do X-GAL, evidenciando que o inserto foi inserido ao vetor, na forma de colônias bacterianas brancas (colônias azuis são produzidas quando o gene LacZ não é interrompido). No dia seguinte ao experimento, uma grande quantidade de colônias brancas em comparação às azuis foram visualizadas na placa contendo a ligação 1:8, o que possibilitou a triagem dos clones de interesse. Dez clones foram selecionados e confirmados por PCR de colônia, com reações de volume final de 25µl, utilizando o GoTaq® Green Master Mix. Nas reações de PCR foram empregados os mesmos primers utilizados na clonagem, nas mesmas condições retratadas anteriormente, a exceção do aumento no tempo de desnaturação inicial para 10min, com a finalidade de lisar mais eficientemente as colônias.

Por fim, as colônias confirmadas na PCR foram repicadas em uma nova placa, mantida na estufa a 37°C - O.N, e em seguida, colocadas em meio LB/Amp, O.N, seguindo as indicações do fabricante (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen), com a finalidade de extrair o DNA plasmidial de cada clone. As minipreparações contendo o DNA plasmidial foram então quantificadas através de um espectrofotômetro e sequenciadas pela plataforma da instituição (IAM) com o objetivo de confirmar de uma forma mais segura as clonagens.

5.6 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

A transcrição *in vitro*, síntese de RNA a partir do DNA, foi realizada utilizando as minipreparações, com objetivo de produzir os transcritos para serem utilizados como controles positivos no diagnóstico do CHIKV. O protocolo de transcrição segue três etapas principais: linearização do plasmídeo, transcrição *in vitro* e eluição. As minipreparações obtidas na clonagem (item 5.5) foram linearizadas por digestão enzimática pela enzima SacII, com base no programa ApE A plasmid Editor. Para cada digestão de volume final 50µl, foram utilizados: 9µl da minipreparação, 1µl da enzima e 5µl do buffer CutSmart (tampão enzimático), completando com água Milli-Q®. Em seguida, foi realizada uma eletroforese das digestões, com objetivo de purificar as bandas obtidas, através do kit ilustra plasmidPrep Mini Spin Kit

(GE Healthcare Life Sciences). As transcrições *in vitro* foram então conduzidas segundo indicações do kit MEGAscript® SP6 Transcription Kit (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Califórnia) e sob algumas adaptações já padronizadas pela equipe com objetivo de melhorar a eficiência da transcrição, como aumento no volume do DNA purificado e o aumento do tempo de incubação. Duas transcrições foram realizadas para cada clone, volume final de 20µl cada, e incubadas em um banho seco a 37°C – 6h. Foram adicionados por reação: 8µl do DNA purificado, 2 µl do tampão 10x Sp6 do kit, 2 µl de cada rNTPs (ATP, GTP, CTP e UTP) e 2 µl da enzima Sp6, sem a presença de água, para concentrar o RNA.

Os transcritos do alvo viral produzidos foram tratados com a enzima TURBO™ DNase (Ambion, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Califórnia) (5µl por reação: 37°C – 30min no banho seco), utilizada para evitar possíveis contaminações por DNA. Por fim, os transcritos foram precipitados em etanol, ressuspendidos e eluidos utilizando 30µl de água Milli-Q® com 4µl da enzima RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Califórnia), que tem por finalidade impedir a degradação do RNA. Alíquotas de 6µl dos transcritos foram armazenadas no freezer a - 80°C. Os transcritos foram visualizados por uma eletroforese conduzida em uma cuba refrigerada com adição da substância dietilpirocarbonato (DEPC), para inativação de agentes degradantes de RNA (RNases), ao tampão de eletroforese.

5.7 CURVA PADRÃO

Os transcritos foram submetidos a uma diluição seriada para geração de uma curva padrão, e assim estabelecer o LOD do sistema de RT-qPCR. A curva padrão funciona também como controle positivo da reação e possibilitou a quantificação das amostras biológicas (BRASIL, 2014). O desenvolvimento da curva baseou-se inicialmente na quantificação dos transcritos (X) em um espectrofotômetro (NanoDrop Technologies), para a obtenção do número de cópias de moléculas de RNA pela fórmula: $(X \text{ g}/\mu\text{l RNA} / [\text{comprimento do transcrito em nucleotídeos} \times 340]) \times 6.022 \times 10^{23} = \text{ssRNA}/\mu\text{l}$ ou cópias/µl (SEKARAN et al., 2010; WANG et al., 2016). A curva padrão foi então realizada com diluições seriadas de fator 10 utilizando-se 5µl do transcrito em 45µl de água nuclease-free, com diluições variando 10^8 a 10^1 cópias/µl, com objetivo de avaliar a sensibilidade da RT-qPCR, assim como, permitir a quantificação das amostras no diagnóstico. Essas diluições foram aplicadas na reação (5µl de cada) em ensaios duplicata e os parâmetros das curvas (eficiência, *slope* e r^2) foram também analisados.

A curva padrão também foi construída com a finalidade de avaliar a sensibilidade do sistema em amostras de soro, através de diluições seriadas de fator 10 do transcrito. Para isso utilizou-se 20µl do transcrito em 180µl de soro negativo para infecção pelo CHIKV, simulando uma amostra infectada, com base na metodologia descrita por Laurent et al. (2007). Em seguida essas amostras foram extraídas utilizando o kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN Sample and Assay Technologies) e aplicadas na reação de RT-qPCR em um ensaio duplicata.

5.8 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O kit QIAamp® Viral RNA (QIAGEN Sample and Assay Technologies) foi utilizado na extração do RNA viral das amostras de soro do estudo. Resumidamente, 140µl de cada amostra foi empregado para extração do RNA viral segundo instruções do fabricante. O RNA obtido foi posteriormente eluído em um volume final de 60µl e estocado em freezer -80°C para realização da RT-qPCR.

5.9 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DA RNP

Um controle endógeno (controle interno positivo) para detecção da RNase P humana (RNP) foi adicionado com objetivo de garantir uma maior qualidade ao diagnóstico, avaliando a integridade (grau de degradação do material genético) da amostra. Um ensaio único (primers e sonda em formato único tubo) foi otimizado para sua detecção em amostras de soro do estudo, utilizando as seguintes sequências apresentadas no Quadro 1 (GenBank: NM_006413.4) (CUI et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). A sonda utilizada foi do tipo TaqMan com fluoróforo “CY5” e Quencher “3IAbRQSp”, permitindo a detecção e o monitoramento em tempo real dos produtos da reação.

A otimização refletiu a escolha da concentração ótima do conjunto (do inglês, set) no ensaio RNP. Assim, utilizando 1,5 µl do respectivo set e sob as mesmas condições do ensaio CHIKV descrito anteriormente (item 5.9), as concentrações a seguir do set foram avaliadas: 500nM (primers) com 250nM (sonda), 250nM (primers) com 125nM (sonda) e por fim, 5000nM (primers) com 2500nM de sonda, o que equivale a 5µM e 2,5µM, respectivamente. Para as reações foi também utilizado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Controles negativos foram empregados e os experimentos foram realizados em duplicata. Como critério de positividade, amostras com $C_t < 38$ foram

consideradas positivas com base no ensaio para detecção da RNP descrito pelo CDC (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Quadro 1 – Conjunto de primers e sonda para detecção da RNP (CUI et al., 2016).

Nome/ Posição	Sequência (5'– 3')
RNP Primer Forward (50–68)	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G
RNP Primer Reverse (71–93)	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT
RNP Sonda TaqMan (95–114)	5'-5Cy5-TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG-3IAbRQSp-3'

Fonte: Elaborado pela autora.

5.10 CONDIÇÕES DA RT-qPCR

Cada uma das amostras do estudo teve sua positividade confirmada ou não, para a infecção viral, através da técnica de RT-qPCR. Os primers utilizados foram: CHIKV Forward e CHIKV Reverse que amplificam uma sequência específica do genoma viral de 126 pb (alvo molecular), descrita previamente (Figura 15). A sonda (CHIKV Probe) utilizada foi do tipo TaqMan® com fluoróforo FAM e Quencher BHQ1, permitindo a detecção e o monitoramento em tempo real dos produtos da reação (Quadro 2) (LANCIOTTI et al., 2007). Um corante de referência (CXR) foi adicionado ao sistema com objetivo de normalizar o sinal fluorescente emitido na reação. O protocolo abaixo descrito é executado pelo Lacen PE e segue as recomendações do CDC e da Organização Pan-americana de Saúde (PAHO) com algumas modificações realizadas pela equipe em detrimento da utilização de um kit de PCR em tempo real diferente do proposto (BRASIL, 2014; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011). Para as reações de RT-qPCR foi utilizado o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Este kit realiza a confecção do cDNA seguida da qPCR em um único passo (*one step*), minimizando etapas experimentais.

Quadro 2 – Conjunto de primers e sonda para detecção do CHIKV (LANCIOTTI et al., 2007).

Nome / Posição	Sequência (5'– 3')
CHIKV Forward (6856–6879)	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA
CHIKV Reverse (6981–6956)	TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC
CHIKV Probe (6919–6941)	5'-FAM-AGG TAC GCG CTT CAA GTT CGG CG-BHQ1-3'

Fonte: Elaborado pela autora.

Para cada reação de RT-qPCR com volume final de 20µl, foi adicionado 10µl do 2x GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 0,5µl de cada primer na concentração de 50µM com 0,5µl da sonda na concentração de 10µM, 0,4µl do 50x GoScript™ RT Mix, completando com água nucleasase-free, e 5µl da amostra de RNA previamente quantificada por absorção a 260nm (Nanodrop 2000) entre 1pg a 500ng por reação. Foi também adicionado ao mix, 2ul do CXR. As etapas de ciclagem foram 50°C por 30 minutos para realização da transcrição reversa, 95°C por 15 minutos para ativação da enzima DNA polimerase seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O resultado das amplificações foi monitorado em tempo real através do termociclador modelo: 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, CA, USA), e o software ABI PRISM 7500 SDS foi utilizado para a análise e interpretação dos resultados. Controles negativos foram utilizados contendo água nucleasase free no lugar da amostra e, como controle positivo, uma curva padrão foi aplicada contendo diluições conhecidas do transcrito de RNA produzido com variações de 10⁵ a 10¹ para quantificação das amostras. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.10.1 Critérios de positividade das amostras biológicas na técnica RT-qPCR

Para que fosse estabelecido a positividade das amostras os seguintes critérios foram avaliados:

- o valor de C_t correspondente à amplificação do transcrito de RNA da última diluição obtida através de curva padrão;
- obtenção de duplicatas homogêneas e curvas de amplificação de qualidade.

5.11 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIPLEX DE RT-qPCR

O sistema multiplex de RT-qPCR foi desenvolvido com base na combinação dos ensaios individuais de CHIKV e RNP para detecção simultânea do RNA viral e do controle endógeno da RNase P humana, respectivamente (BRASIL, 2014; CUI et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011). O teste preliminar do sistema multiplex ocorreu segundo as condições de ciclagem padronizadas para o sistema simples. As concentrações dos primers e das sondas definidas no sistema simples foram testadas no sistema multiplex, entretanto, precisaram ser ajustadas para que o sistema fosse efetivo e reprodutível.

Inicialmente, para o alvo CHIKV foram testadas as concentrações de 50 e 100 μ M de primer, e 10, 25 e 50 μ M de sonda, juntamente com a concentração fixa do set da RNP definida na otimização do sistema de RT-qPCR simples, estabelecendo por tanto, as concentrações ótimas do set CHIKV a serem empregadas no sistema multiplex. Com a finalidade de melhorar a performance do sistema multiplex, outras concentrações do set da RNP foram analisadas. Assim, em combinação ao set CHIKV já definido, concentrações variadas do set da RNP (entre 2,5 e 20 μ M) de primers com uma concentração fixa de 2,5 μ M de sonda, e em seguida outro experimento contendo concentrações variadas de sonda (entre 1,25 e 10 μ M) e concentração fixa de primers (selecionada no experimento anterior), foram testadas para otimizar o multiplex.

O sistema multiplex de RT-qPCR foi avaliado em experimentos preliminares compostos por amostras sem RNA (CN, controle negativo da reação), transcritos de RNA do alvo molecular (controle positivo para o alvo CHIKV), amostras de soro negativas (controle positivo para o alvo RNP) e positivas para a infecção pelo CHIKV (controle positivo da reação).

A escolha das concentrações ótimas de cada reagente para o sistema multiplex foi determinada seguindo alguns critérios: análise dos valores do C_t , qualidade das curvas de amplificação e obtenção de duplicatas homogêneas.

5.12 ANÁLISE DOS DADOS

A análise referente a carga viral da população alvo determinada pelo sistema de RT-qPCR aqui otimizado, foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

A análise preliminar de concordância entre os resultados obtidos pelo novo sistema multiplex desenvolvido com os do sistema RT-qPCR simples, foi realizada por meio de

estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais e os dados foram comparados utilizando o teste Exato de Fisher ao nível de significância de 1%, utilizando o *software* BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do CPqAM/FIOCRUZ (CEP) sob resolução CNS de nº 466/12 (CAE: 56203916.5.0000.5190). Foram utilizadas amostras de soro de indivíduos com suspeita de infecção pelo CHIKV, oriundas do Lacen PE, via acordo de colaboração (termo de anuência) com o desenvolvimento da pesquisa (ANEXO A). As amostras foram disponibilizadas pelo Lacen PE sob sigilo e anonimato dos envolvidos na pesquisa. Os indivíduos selecionados no estudo não serão submetidos a qualquer risco ou desconforto adicional.

7 RESULTADOS

7.1 ANÁLISE DEMOGRÁFICA DA POPULAÇÃO ALVO

Foram selecionados 151 indivíduos residentes em áreas endêmicas do estado de Pernambuco (população alvo), com suspeita de infecção pelo CHIKV e com menos de 8 dias de sintomas, registrados e diagnosticados no Lacen PE, no primeiro semestre de 2016. A análise demográfica da população alvo revelou um total de 60,3% (n=91) indivíduos do sexo feminino e 39,7% (n=60) do sexo masculino e suas idades apresentaram variação de 6 dias de nascimento a 92 anos, com média de 30 anos e maior frequência de casos suspeitos na faixa adulta (49,7%) n=75 (Tabela 1). Da totalidade, a maioria reside em municípios agrupados na Geres I, Gerências Regionais de Saúde de Pernambuco, com o município do Recife concentrando o maior número de casos suspeitos, n=34

Tabela 1 – Perfil demográfico da população alvo. N=151.

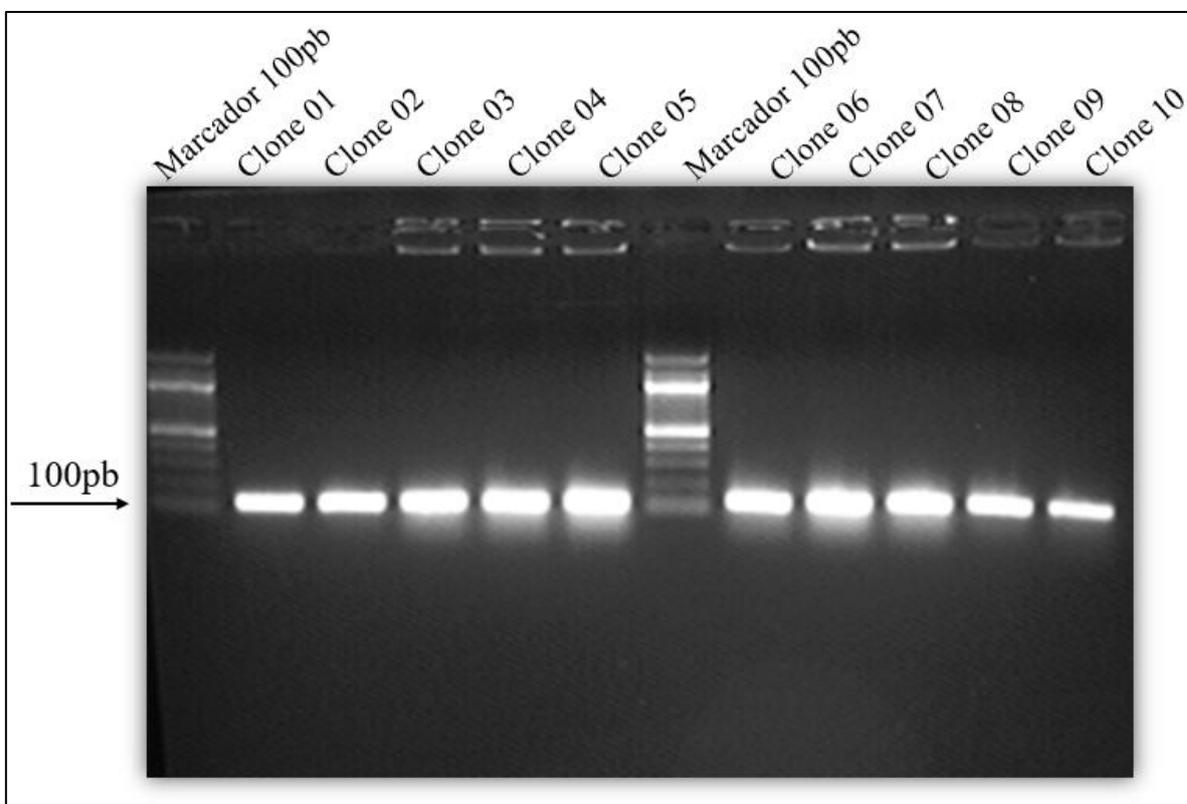
	N	%
Sexo		
Feminino	91	60,3
Masculino	60	39,7
Faixa etária		
Até os 11 anos (criança)	46	30,5
12 aos 18 anos (adolescente)	11	7,2
19 a 59 anos (adulto)	75	49,7
≥ 60 anos (idoso)	19	12,6

Fonte: Elaborado pela autora.

7.2 CLONAGEM GÊNICA DO ALVO MOLECULAR

A clonagem do alvo molecular foi necessária para a produção do controle positivo (transcrito) no diagnóstico do CHIKV, utilizado nesse trabalho. Os clones do alvo molecular foram confirmados e visualizados por uma PCR de colônia com as respectivas bandas de 126pb, em uma corrida eletroforética. Pode-se evidenciar a confirmação das clonagens em todas as dez colônias selecionadas. Os resultados obtidos nas reações de PCR podem ser observados na figura 17.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 2.0% dos clones do alvo molecular. Marcador molecular de 100pb.



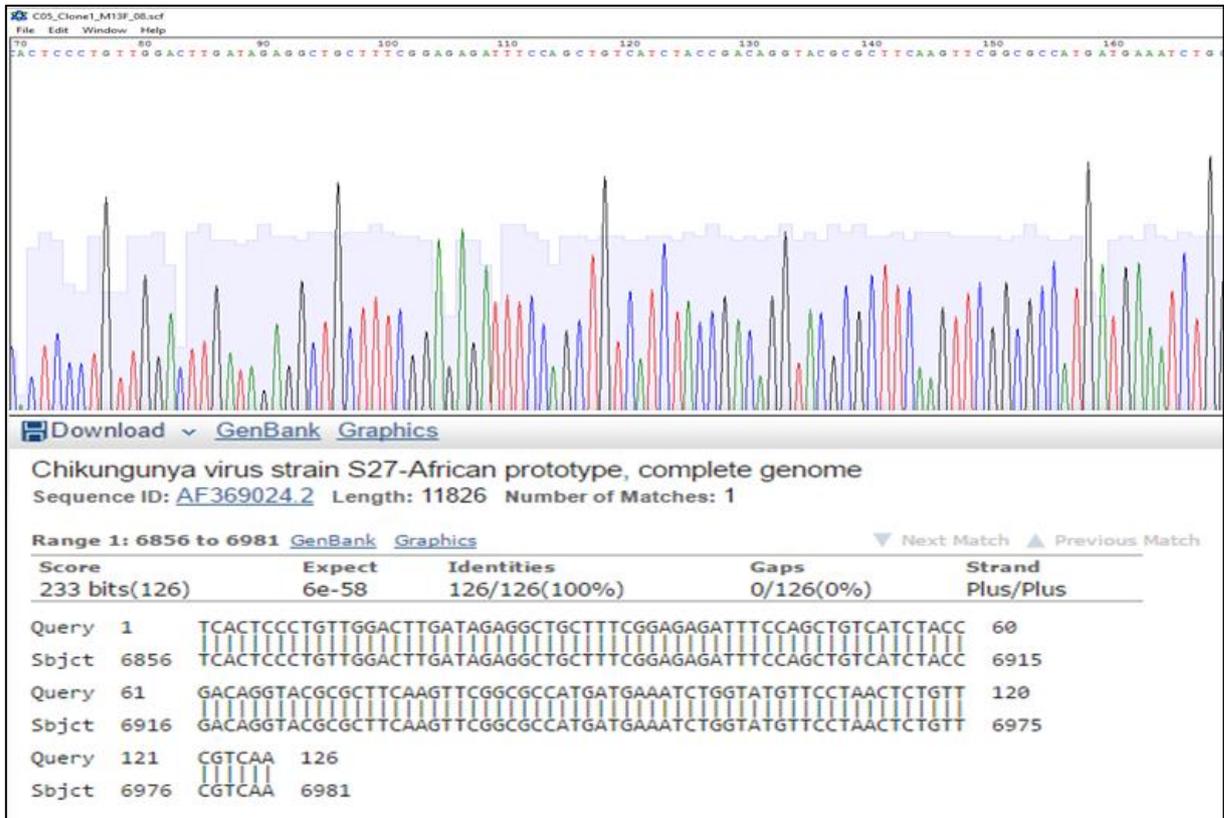
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Dez colônias foram selecionadas e confirmadas as clonagens por uma PCR simples, com bandas de 126pb (alvo molecular).

Os clones foram confirmados também por sequenciamento e as análises ocorreram com auxílio do programa ApE A plasmid Editor e da ferramenta Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Na análise do sequenciamento foi possível assegurar a qualidade do mesmo, assim como, observar uma identidade e o Query cover (percentual de alinhamento entre a sequência em questão e as demais do banco de dados) de 100% em todos os clones gerados,

com a sequência do alvo molecular (CHIKV prototype strain S27- GenBank: AF369024.2), a exemplo do resultado do sequenciamento do clone 01 apresentado a seguir (Figura 18).

Figura 18 – Resultado do sequenciamento do clone 01 com auxílio do programa ApE A plasmid Editor e da ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).



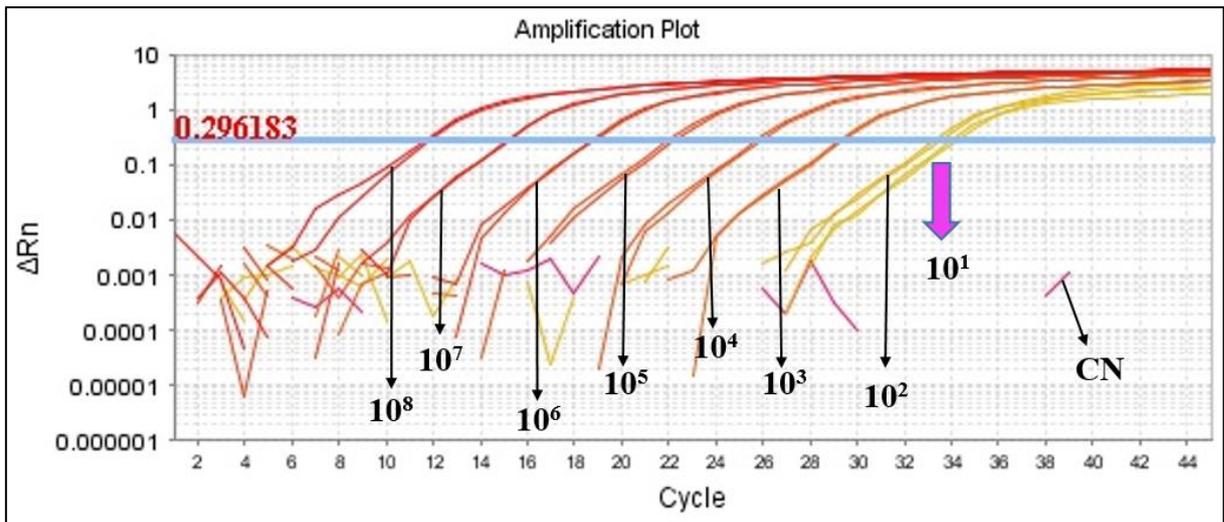
Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A análise do resultado do sequenciamento revelou a qualidade do mesmo, com uma identidade e o Query cover (percentual de alinhamento entre a sequência em questão e as demais do banco de dados) de 100%, em comparação a sequência do alvo molecular (CHIKV prototype strain S27- GenBank: AF369024.2).

7.3 CURVA PADRÃO

A curva padrão foi construída em um ensaio duplicata de RT-qPCR, através de diluições seriadas de fator 10, variando entre 10^8 a 10^1 cópias/ μ l do transcrito produzido. Para cada diluição, apresentada no gráfico de amplificação (do inglês, Amplification Plot), um C_t e sua correspondência em moléculas de RNA foi gerado, como pode-se observar nas figuras 19 e 20.

Figura 19 – Limite de detecção do sistema de RT-qPCR para a detecção do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



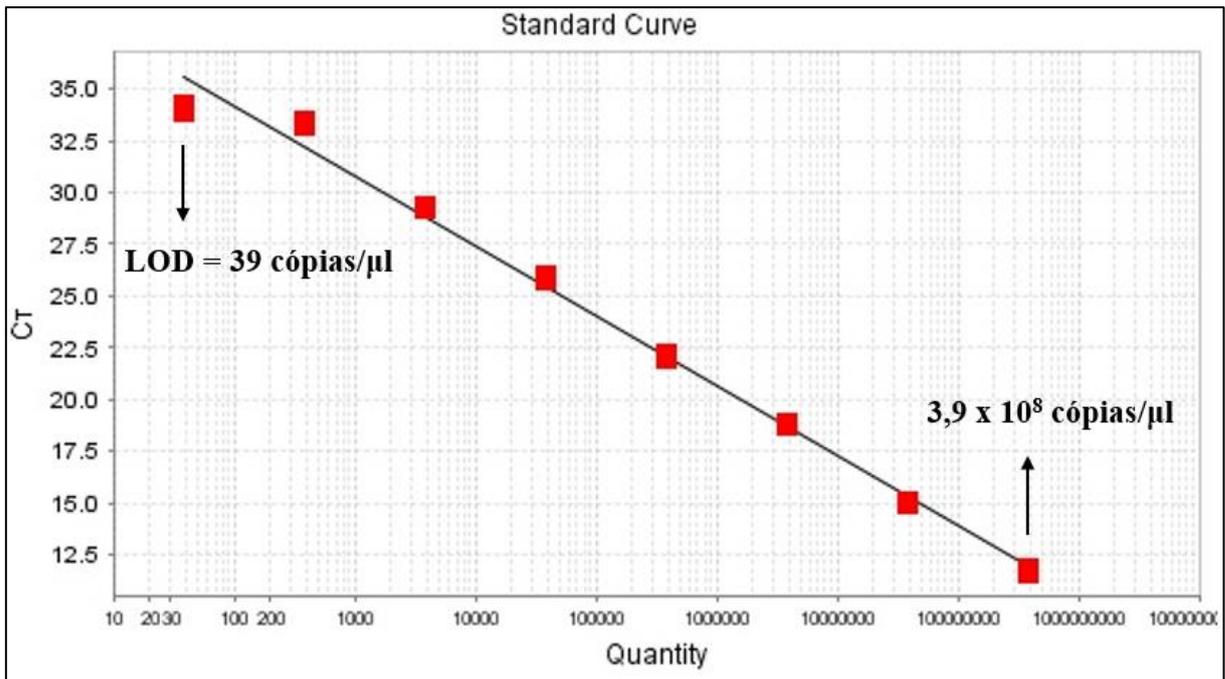
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo

Nota: O LOD do sistema de RT-qPCR para detecção do CHIKV foi determinado através de diluições seriadas de fator 10 do transcrito, nas concentrações variando entre $3,9 \times 10^8$ a $3,9 \times 10^1$ cópias/ μ l. O LOD atingido foi de 39 cópias/ μ l de maneira reprodutível, com $C_t = 34,04$.

A curva padrão aqui apresentada, que teve por objetivo avaliar o LOD e a sensibilidade da RT-qPCR, demonstrou uma eficiência de 98%, calculada pela fórmula $(E) = 10^{-1/\text{slope}} - 1$ BUSTIN et al. (2009) no sistema, um *slope* de -3.366 e r^2 de 0.991, amplificando até o último ponto da curva (10^1), o que representa em número de cópias de moléculas de RNA, o total de 39 cópias/ μ l (LOD), e um C_t de 34,04 (Figura 20). A curva também funciona como controle positivo da reação e foi aplicada para quantificação das amostras testadas.

Figura 20 – Curva padrão do sistema de RT-qPCR para detecção do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



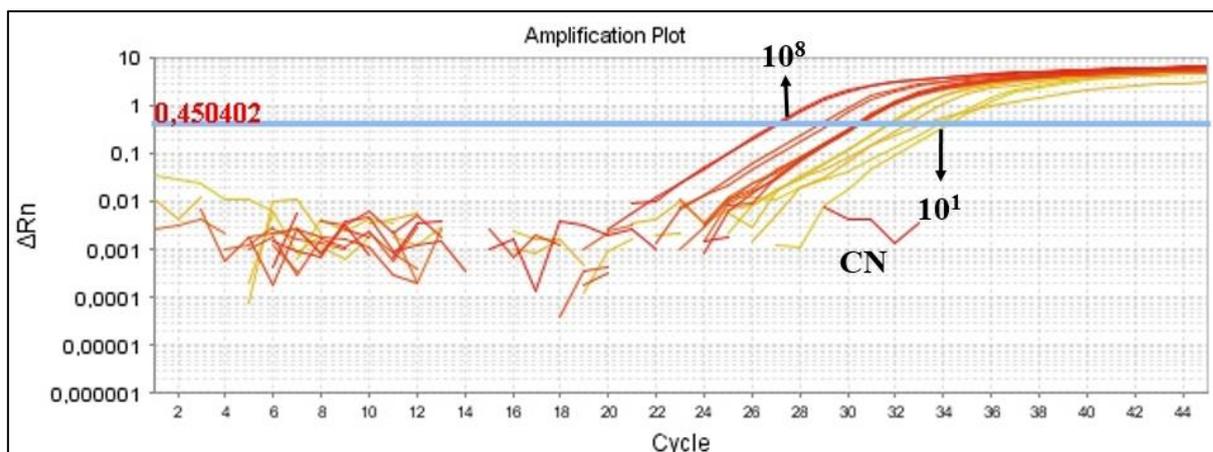
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: LOD: Limite de detecção.

Nota: A curva padrão avaliou a sensibilidade e a performance do sistema de RT-qPCR, que apresentou um LOD de 39 cópias/μl com C_t de 34,04, e os seguintes parâmetros: eficiência (Eff%) de 98%, *slope* de -3.366 e r^2 de 0.991.

O sistema de RT-qPCR também foi avaliado frente a diluições seriadas de fator 10 do transcrito em uma amostra de soro negativa, simulando amostras biológicas infectadas pelo CHIKV. Nessa análise, o sistema revelou a mesma sensibilidade, amplificando em todos os pontos da curva do 10^8 a 10^1 , com um LOD de 39 cópias/μl e C_t de 34,12 (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação da sensibilidade do sistema de RT-qPCR frente a diluições seriadas de fator 10 do transcrito em amostra de soro negativa. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



Fonte: Elaborado pela autora.

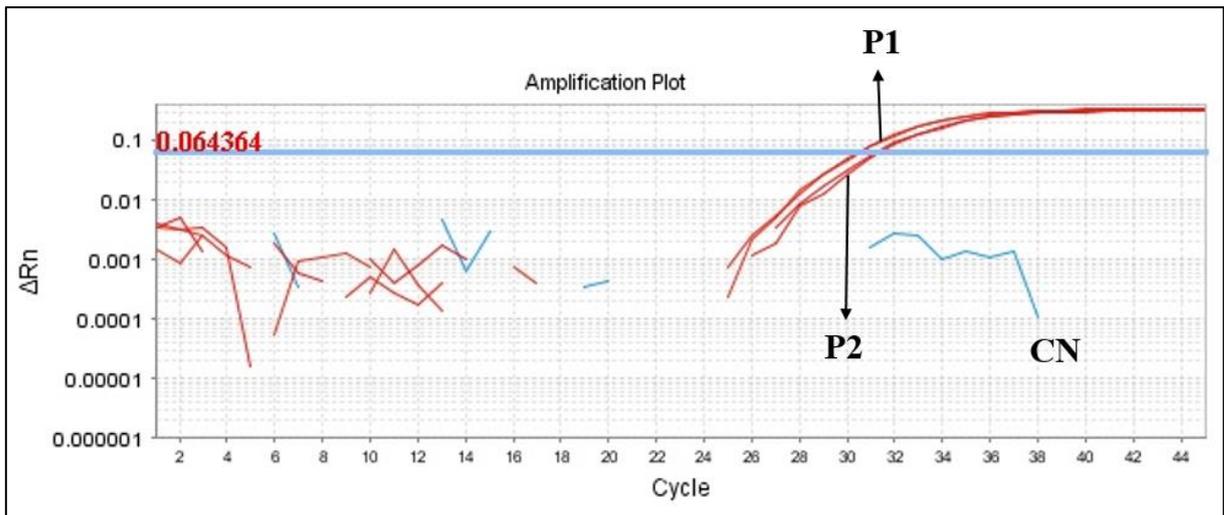
Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: A sensibilidade do sistema de RT-qPCR foi avaliada através de diluições seriadas de fator 10 do transcrito, nas concentrações variando entre $3,9 \times 10^8$ a $3,9 \times 10^1$ cópias/ μ l, em amostra de soro negativa. O LOD foi de 39 cópias/ μ l com C_t de 34,12.

7.4 OTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DA RNP

O controle endógeno da RNP, foi também adicionado ao sistema com objetivo de garantir uma maior qualidade ao diagnóstico, uma vez que é aplicado na verificação da integridade do RNA extraído. A otimização foi baseada em um ensaio único (primers e sonda em único tubo) com diferentes concentrações testadas: 250nM, 500nM e 5000nM para os primers, e 125nM, 250nM e 2500nM para as sondas. A concentração ideal para o ensaio foi de 5000nM (5 μ M) de cada primer e 2500nM (2,5 μ M) da sonda (Figura 22). Como critério de positividade, amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas com base no ensaio para detecção da RNP descrito pelo CDC (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009).

Figura 22 – Otimização do ensaio para detecção do controle endógeno da RNP. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



Fonte: Elaborado pela autora.

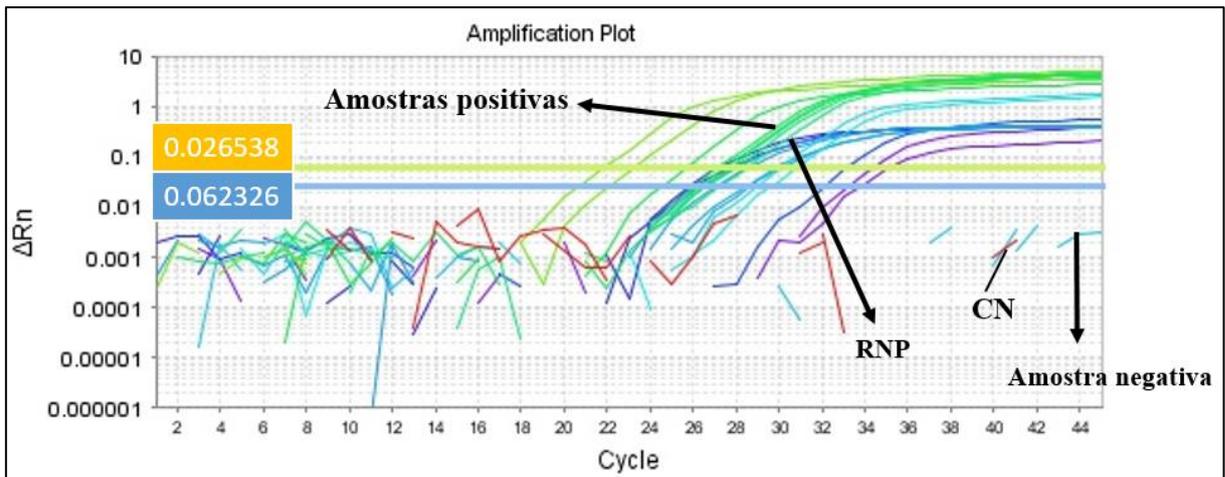
Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: O ensaio para detecção da RNP foi otimizado com primers e sonda na concentração ideal de $5\mu\text{M}$ e $2,5\mu\text{M}$, respectivamente, frente a duas amostras do estudo. A média do C_t (do inglês, C_t mean) das duas amostras do estudo testadas (P1 e P2) foi: 31,28 (P1) e 30,47 (P2). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas.

7.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA RT-qPCR EM AMOSTRAS DE SORO

As 151 amostras de soro do estudo foram extraídas e analisadas através do ensaio de RT-qPCR, otimizado no presente trabalho, que apresentou dois alvos separadamente: CHIKV e RNP. Em todas as placas de RT-qPCR uma curva padrão nova foi também aplicada, funcionando como controle positivo da reação e permitindo a quantificação das amostras. Da totalidade, 53,6% ($n=81$) amostras foram positivas, enquanto 46,4% ($n=70$) foram negativas, destas, a maioria 70% ($n=49$) apresentando C_t indeterminado. Todas as amostras apresentaram ampliações para o controle endógeno da RNP. A figura 23 esquematiza um resultado de uma placa de RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV.

Figura 23 – Gráfico de amplificação da RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV em amostras de soro do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

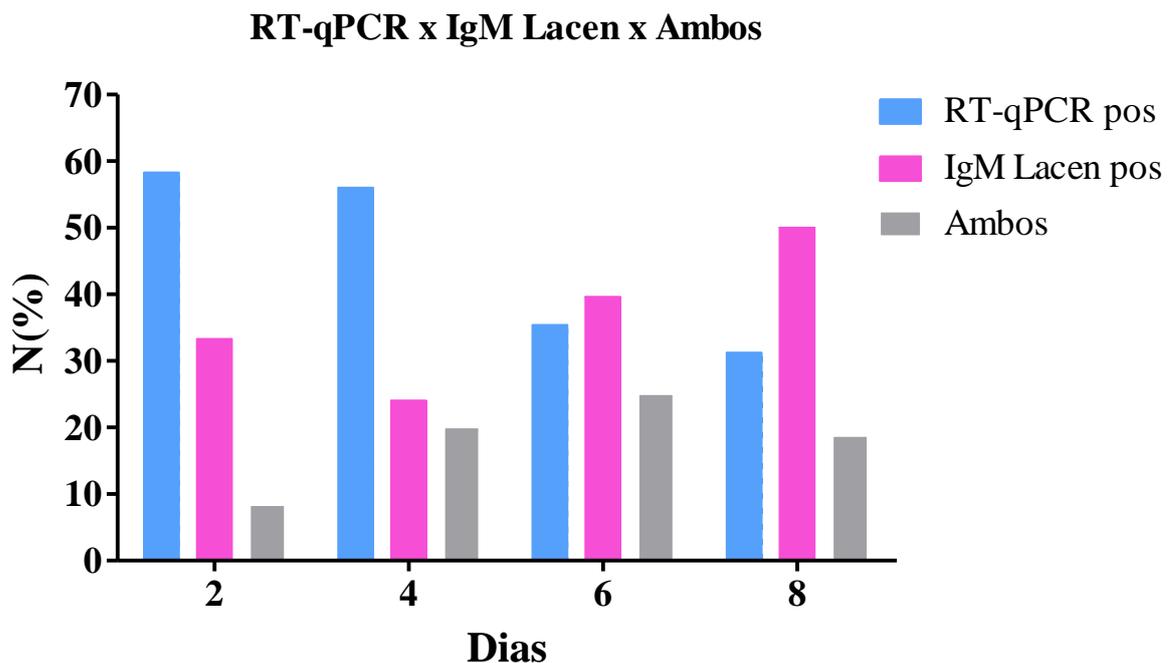


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: As curvas não destacadas representam a curva padrão (10^5 a 10^1 cópias/ μ l) utilizando diluições seriadas de fator 10 do transcrito. Amostras com $C_t < 34,04$ (LOD) foram consideradas positivas (curvas em verde na figura) de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas (curvas em azul escuro) de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP).

Em relação ao desempenho do sistema de RT-qPCR aqui otimizado em comparação ao teste MAC-ELISA para captura de anticorpos IgM, realizado no Lacen PE, para o diagnóstico do CHIKV, foi possível constatar a capacidade de detecção da infecção viral nos indivíduos testados, em todos os dias pós infecção (0-2, 3-4, 5-6 e 7-8), principalmente no período inicial ao surgimento de sintomas (0-4 dias), como podemos observar na figura 24.

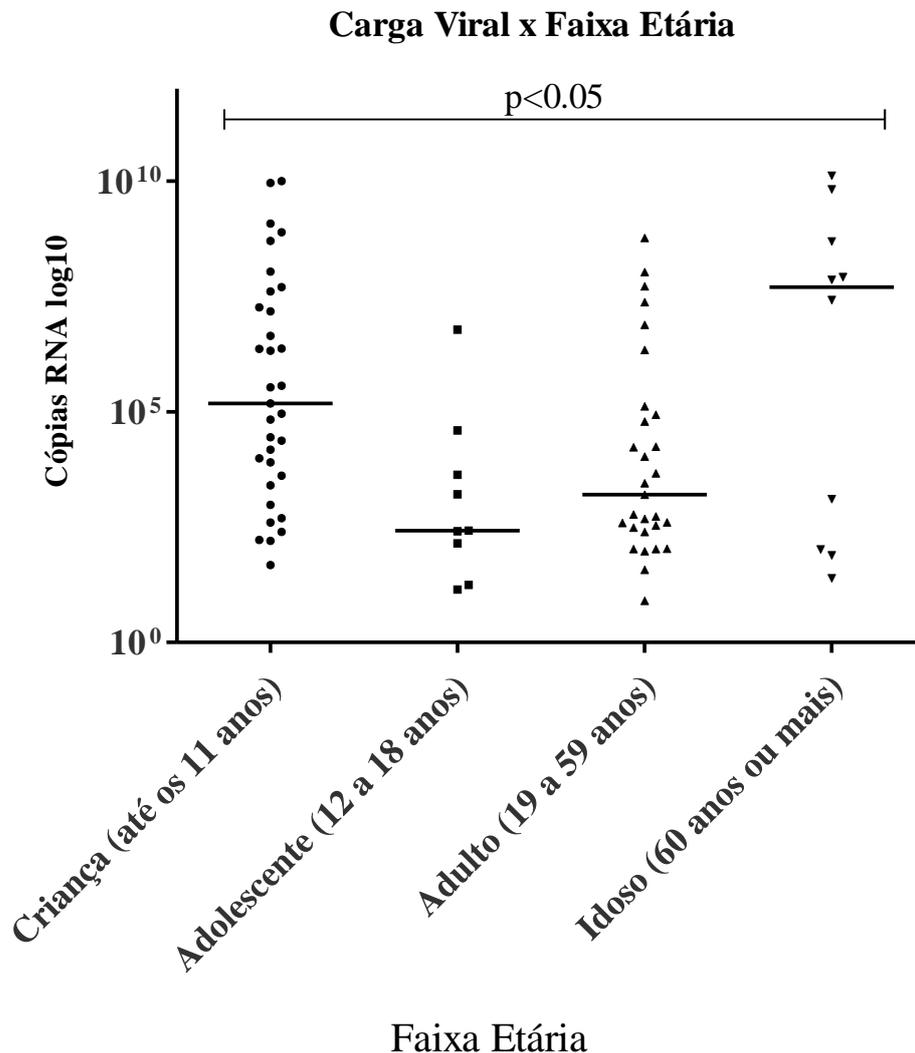
Figura 24 – Desempenho das técnicas no diagnóstico do CHIKV, em amostras de soro do estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Em comparação a técnica sorológica, o sistema de RT-qPCR foi capaz de detectar a infecção viral em todos os dias, principalmente no período de 0-4 dias. Dias: calculado pela diferença entre a data da coleta e a data de início de sintomas dos indivíduos testados. Foram incluídos na análise apenas os indivíduos diagnosticados em ambas as técnicas, com resultados positivos para a infecção viral.

O sistema de RT-qPCR otimizado em nosso laboratório, também permitiu a quantificação das amostras através da curva padrão com diluições seriadas de fator 10 (10^5 a 10^1) do transcrito do alvo viral. A quantificação absoluta é calculada pelo Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) comparando os valores de C_t , entre as amostras e curva. Cargas virais maiores ou iguais a 10^3 cópias/ μ l representaram a maioria das amostras positivas testadas, com (64,2%) $n=52$, com poucos indivíduos ($n=5$) atingindo uma carga viral ainda mais alta, acima de 10^8 . A quantificação média foi de $5,31 \times 10^8$ cópias/ μ l. As amostras foram ainda submetidas a análises em relação a carga viral apresentada. A análise da distribuição da carga viral em número de cópias de RNA por faixa etária, revelou uma maior carga viral ($\geq 10^7$) nas faixas criança e idoso ($p < 0,05$), na qual a amostra que apresentou a maior carga viral foi a de uma mulher de 75 anos de idade com quantificação de $1,31 \times 10^{10}$ cópias/ μ l e um C_t de 9,16 (Figura 25).

Figura 25 – Distribuição da carga viral (CV) em número de cópias de RNA por faixa etária.

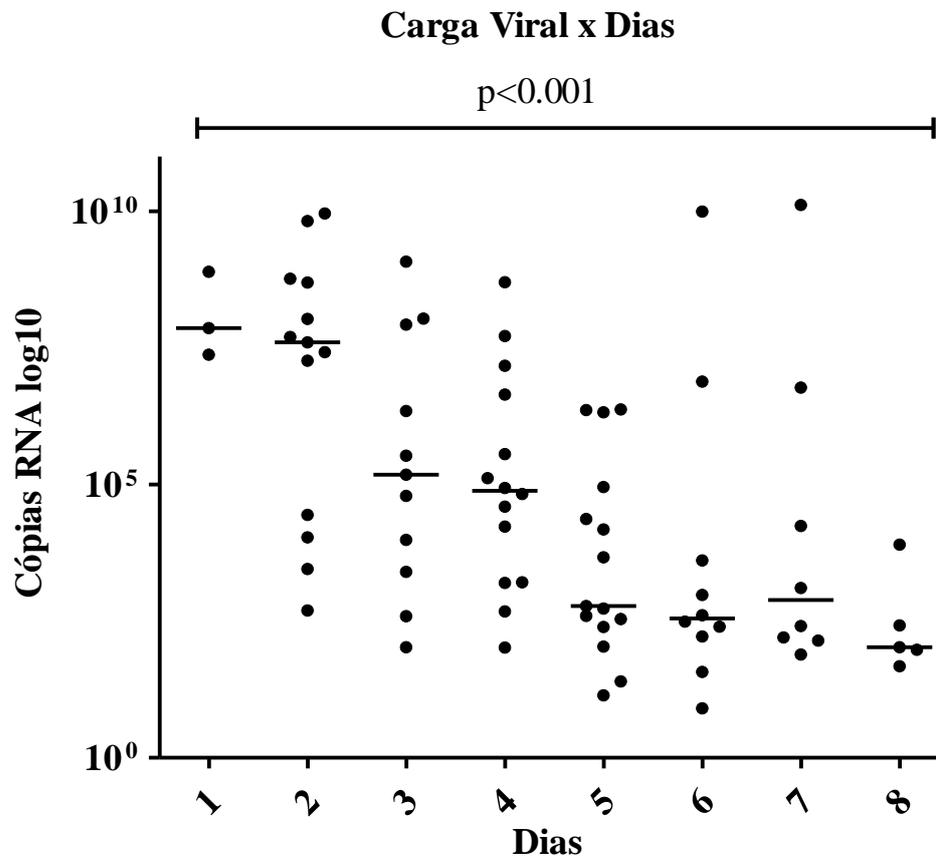


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Na análise, índices $\geq 10^7$ de carga viral foram evidenciados nas faixas criança e idoso. As faixas etárias foram definidas conforme: Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) (Lei 8.069, de 1990) e pelo Estatuto do Idoso (Lei 10.741, de 2003). A análise foi conduzida utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA).

A análise da carga viral das amostras positivas, em relação ao tempo de surgimento de sintomas revelou uma média de 5 dias na população estudada ($p < 0.001$). A maioria dessas 81 amostras positivas, 69,1% ($n=56$), foram coletadas entre os 5 primeiros dias de início de sintomas, como podemos observar no gráfico abaixo. A concentração das maiores cargas virais foi entre os 4 primeiros dias, principalmente até 2 dias pós infecção, com um índice de carga viral de $\geq 10^7$ cópias/ μ l na maioria dos positivos (Figura 26).

Figura 26 – Distribuição da CV em número de cópias de RNA por dias de início de sintomas.

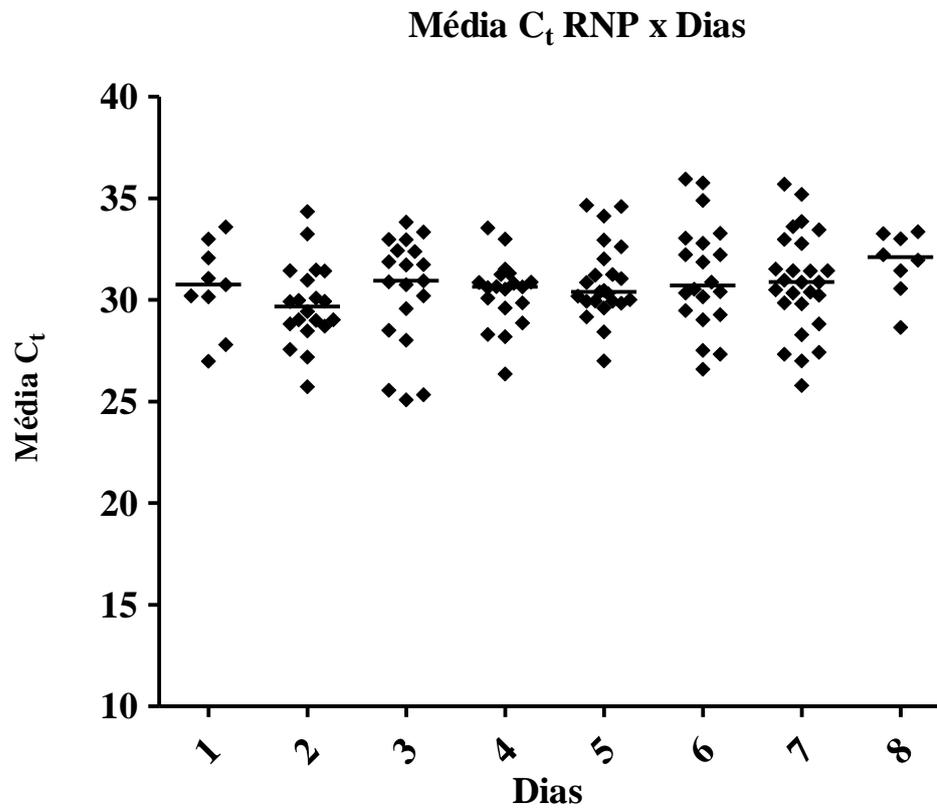


Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A análise da CV no estudo revelou que a maioria das amostras, 69,1% (n=56), foram coletadas entre os 5 primeiros dias de início de sintomas. $CV \geq 10^7$ cópias/ μ l foram registradas nos 4 primeiros dias, especialmente de 0-2 dias. Dias: calculado pela diferença entre a data da coleta e a data de início de sintomas dos indivíduos testados. A análise foi conduzida utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA)

Em relação ao ensaio da RNP uma variação mínima da média do C_t (25 a 35), com maioria em torno de 30, foi constatada nos diversos dias pós surgimento de sintomas, em todos os indivíduos do estudo, como também, ao correlacionar o C_t com a carga viral dos indivíduos positivos ($p < 0.0001$) (Figuras 27 e 28). Em contrapartida, os valores da média do C_t no ensaio CHIKV oscilaram de maneira significativa na faixa de 9 a 35 na população alvo, assim como, os índices da carga viral (10^1 a 10^{10} cópias/ μ l) nos positivos. As análises aqui apresentadas permitiram observar que o alvo da RNP se manteve praticamente constante, sendo detectado em todas as amostras do estudo, demonstrando sua aplicação como controle endógeno no diagnóstico do CHIKV.

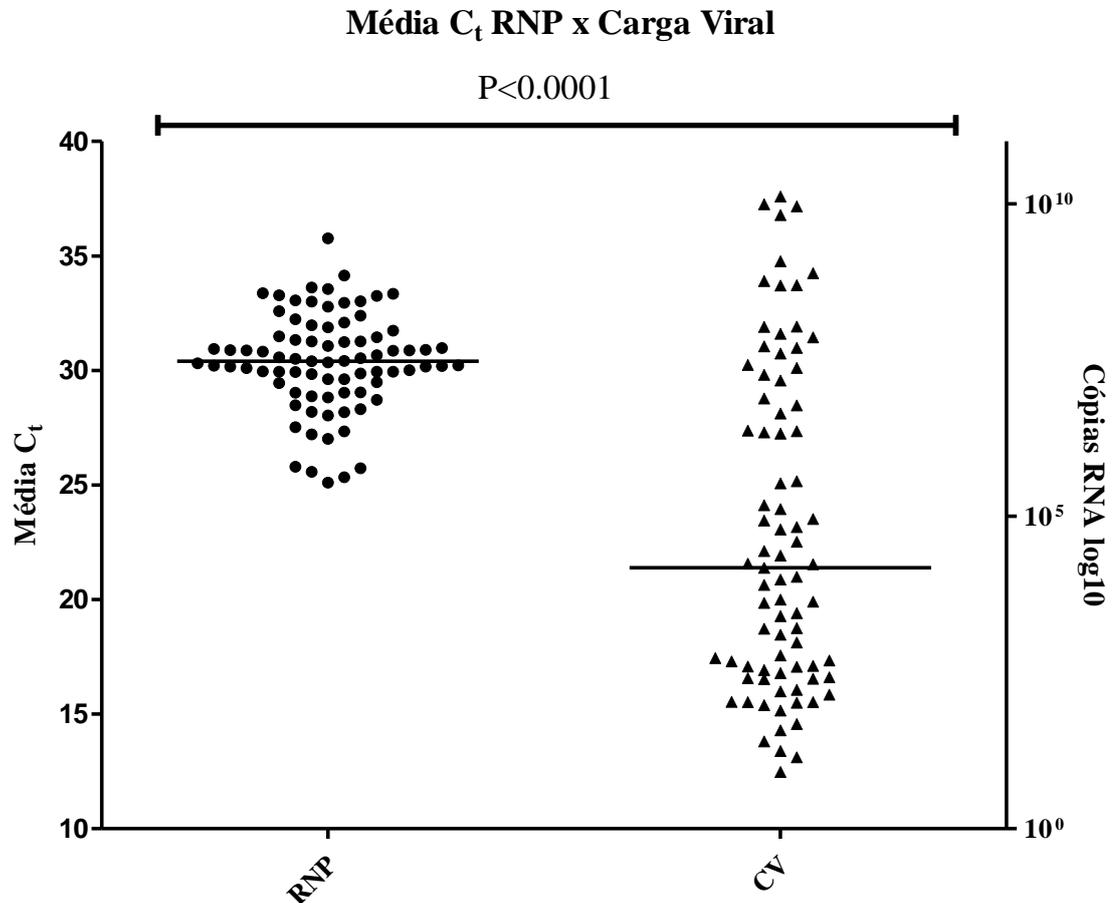
Figura 27 – Distribuição da média do C_t (ensaio RNP) por dias de início de sintomas nas amostras do estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: RNP: RNase P humana.

Nota: Variação mínima da média do C_t (25 a 35), com maioria em torno de 30, foi constatada nos diversos dias pós surgimento de sintomas, na população do estudo. Dias é calculado pela diferença entre a data da coleta e a data de início de sintomas dos indivíduos testados.

Figura 28 – Distribuição da média do Ct (ensaio RNP) e carga viral nas amostras positivas do estudo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CV: carga viral. RNP: RNase P humana.

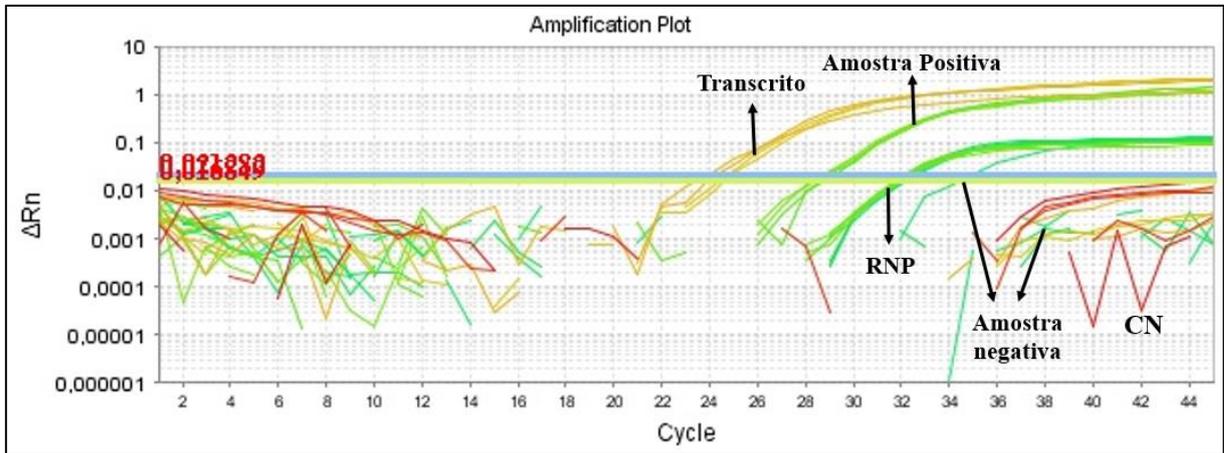
Nota: Na análise do C_t (ensaio RNP) e da CV (ensaio CHIKV) nas amostras positivas, uma variação mínima da média do C_t (25 a 35), com maioria em torno de 30, e uma variação expressiva nos índices da CV (10¹ a 10¹⁰ cópias/μl) foi encontrada, demonstrando a aplicação do alvo RNP como controle endógeno no diagnóstico viral. A análise foi conduzida utilizando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (ANOVA).

7.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA MULTIPLEX DE RT-qPCR

As concentrações dos primers e das sondas definidas no sistema simples precisaram ser ajustadas para que o sistema multiplex com detecção simultânea dos alvos do CHIKV e da RNP, fosse efetivo e reprodutível. Os testes preliminares de otimização do multiplex foram realizados utilizando: transcritos CHIKV, amostras positivas e negativas, e o controle negativo (água no lugar da amostra). Assim, a partir dos valores de C_t (como critério a menor variação de C_t em comparação ao sistema simples), da qualidade das curvas de amplificação e da obtenção de duplicatas homogêneas, as concentrações ótimas dos sets foram escolhidas: 100μM

de cada primer e 25 μ M de sonda (set CHIKV) (Figura 29) com 10 μ M de cada primer e 5 μ M de sonda (set RNP) (Figuras 30 e 31).

Figura 29 – Otimização do set CHIKV no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de sonda testadas foram: 25 e 50 μ M, com concentração fixa de primer a 100 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

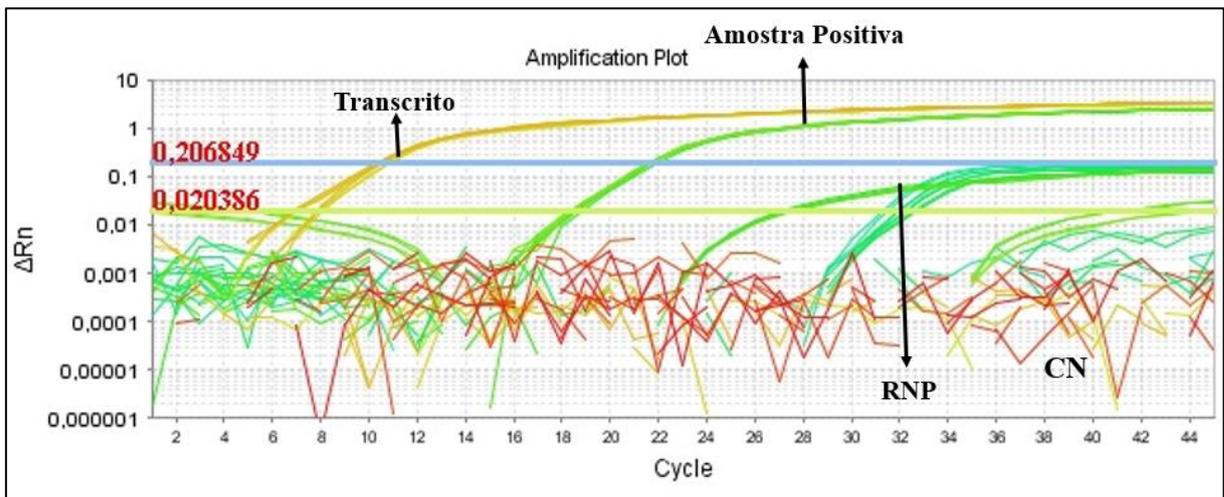


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: Na otimização, o set da RNP foi fixado com as concentrações do sistema simples (5 μ M de cada primer e 2,5 μ M de sonda) para que apenas o set CHIKV fosse avaliado dentro do sistema multiplex. A concentração da sonda escolhida como ótima foi de 25 μ M. Amostras com $C_t < 34,04$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP). Ensaio duplicata.

Figura 30 – Otimização do set RNP no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de primer testadas foram entre 2,5 a 20 μ M, com concentração fixa de sonda a 2,5 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

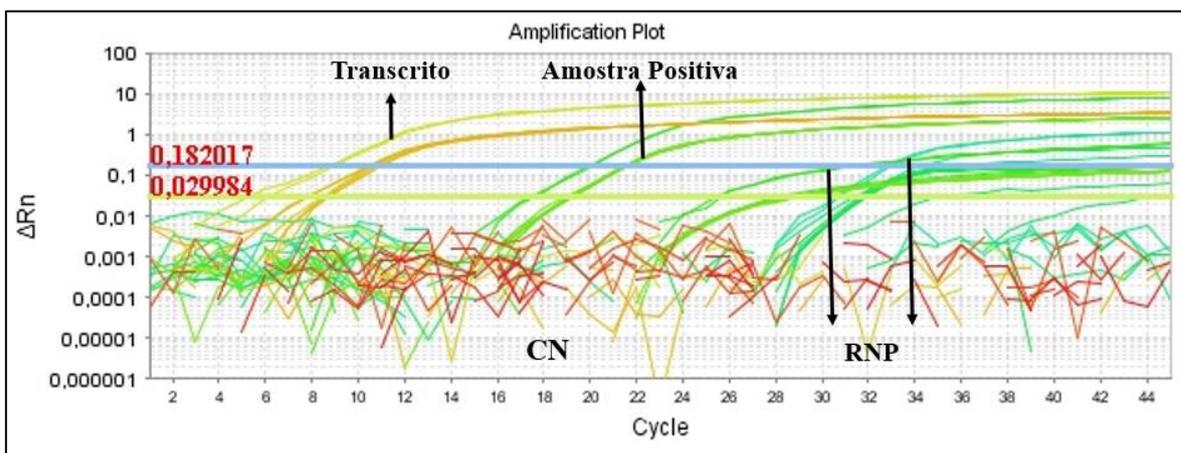


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: Na otimização do set RNP, foram utilizadas as concentrações ótimas do set CHIKV definidas anteriormente (Figura 29). A concentração do primer escolhida como ótima foi de 10 μ M. Amostras com $C_t < 34,04$ (LOD) foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP). Ensaio duplicata.

Figura 31 – Otimização do set RNP no sistema multiplex frente a amostras do estudo. As concentrações de sonda testadas foram entre 1,25 a 10 μ M, com concentração fixa de primer a 10 μ M. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



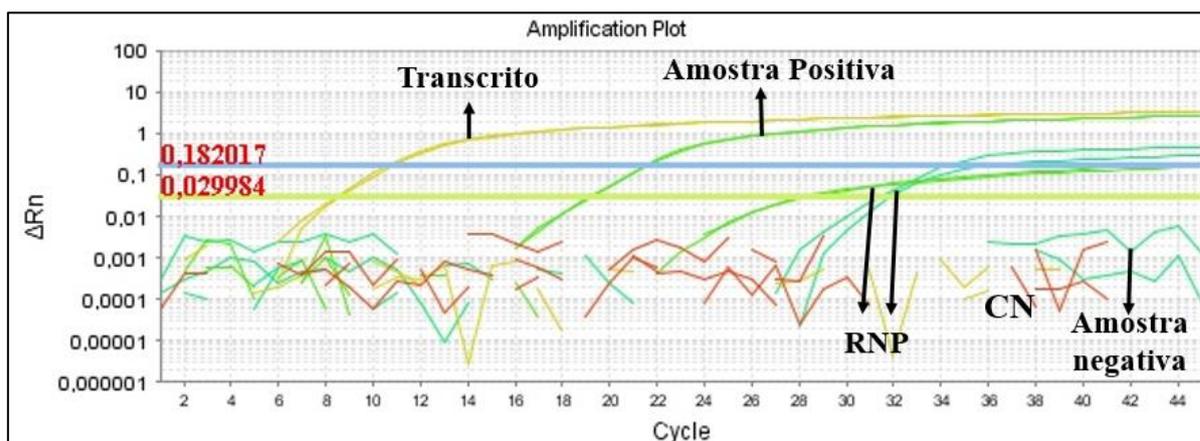
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: Na otimização do set RNP, foram utilizadas as concentrações ótimas do set CHIKV definidas anteriormente (Figura 29). A concentração da sonda escolhida como ótima foi de 5 μ M. Amostras com $C_t < 34,04$ (LOD) foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP). Ensaio duplicata.

Assim, o sistema multiplex foi considerado otimizado no qual houve amplificação de cada amostra de maneira específica: amplificação do alvo viral apenas no transcrito do CHIKV, amplificação do alvo RNP apenas na amostra negativa e amplificação de ambos os alvos na amostra positiva (Figura 32).

Figura 32 – Sistema multiplex de RT-qPCR otimizado, frente amostras do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



Fonte: Elaborado pela autora.

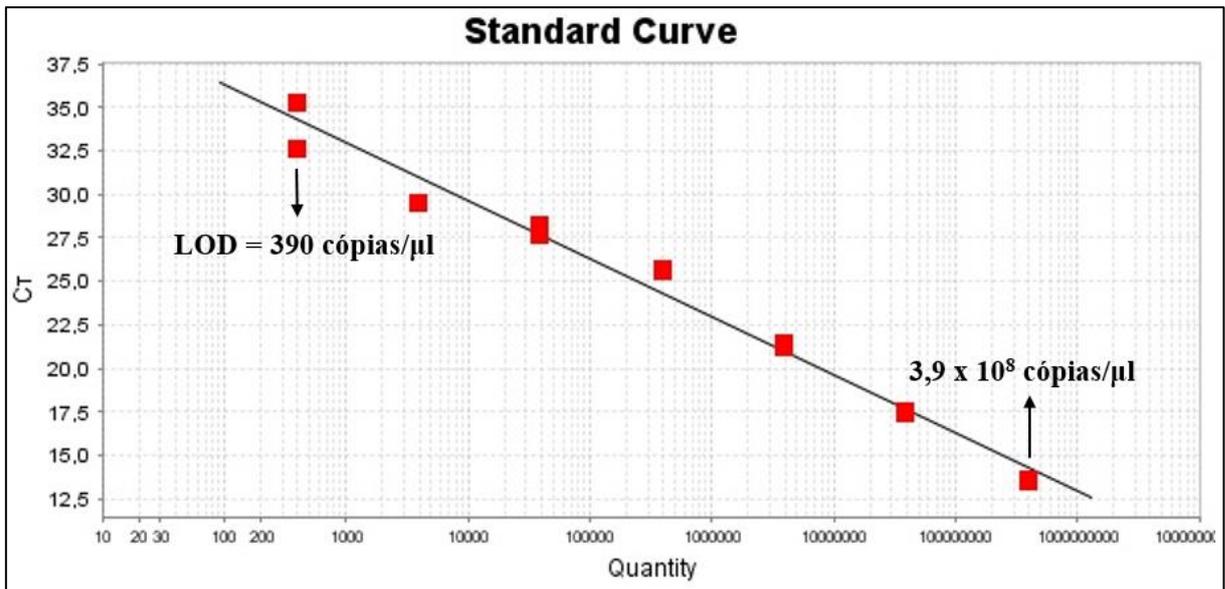
Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: Primers e sondas nas concentrações ideais: 100 μ M de cada primer e 25 μ M de sonda (set CHIKV) com 10 μ M de cada primer e 5 μ M de sonda (set RNP), Amostras com $C_t < 34,04$ (LOD) foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP). Ensaio duplicata.

Em seguida, o sistema multiplex foi avaliado com a curva padrão do transcrito em diluições seriadas de fator 10 (10^8 ao 10^1) e algumas amostras do estudo, demonstrando um bom desempenho no diagnóstico do CHIKV, como podemos observar nas figuras 33 e 34.

No sistema multiplex, podemos evidenciar o funcionamento da curva padrão que além de avaliar a sensibilidade do sistema, permitiu a quantificação das amostras. Apesar da curva não ter atingido o último ponto de diluição, apresentou um LOD de 390 cópias/ μ l, e a média do C_t ($C_t=33,94$) foi muito próxima a do nosso sistema simples de RT-qPCR ($C_t=34,04$) (item 7.3). Ainda, podemos constatar uma ótima performance do sistema multiplex com a curva padrão, alcançando os seguintes parâmetros: *slope* de -3.333, $r^2 = 0.981$ e uma eficiência de 99% (Figura 33).

Figura 33 – Curva padrão no sistema multiplex de RT-qPCR para o diagnóstico do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

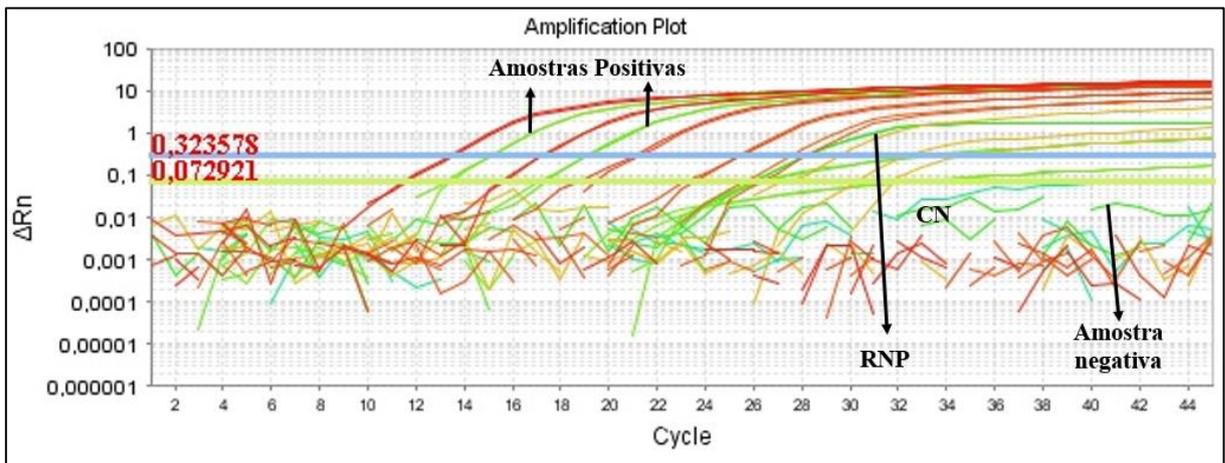


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: LOD: Limite de detecção.

Nota: A curva padrão avaliou a sensibilidade e a performance do sistema multiplex de RT-qPCR, que apresentou um LOD de 390 cópias/μl com C_t de 33,94, e os seguintes parâmetros: eficiência (Eff%) de 99%, *slope* de -3.333 e r^2 de 0.981.

Figura 34 – Gráfico de amplificação do sistema multiplex em amostras de soro do estudo. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: CN: Controle Negativo.

Nota: Funcionamento do sistema multiplex de RT-qPCR nas amostras do estudo. Curvas em vermelho representam a curva padrão do transcrito em diluições seriadas de fator 10 (10^8 ao 10^1). Amostras com $C_t < 33,94$ (LOD) foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio CHIKV). Amostras com $C_t < 38$ foram consideradas positivas de acordo com os critérios de positividade (ensaio RNP). Ensaio duplicata.

Com a finalidade de avaliar de maneira preliminar a sensibilidade em amostras clínicas do novo sistema multiplex otimizado, uma análise estatística utilizando o teste Exato de Fisher foi realizada em comparação aos resultados obtidos pelo sistema simples de RT-qPCR. Uma concordância ótima de 88,88% foi encontrada e sem diferença estatística significativa entre os testes, o que indica que o multiplex pode ser aplicado no diagnóstico do CHIKV (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise de concordância entre o sistema multiplex e o sistema simples de RT-qPCR, para o diagnóstico do CHIKV nas amostras de soro do estudo.

Testes	Positivo	Negativo	N	%
RT-qPCR Multiplex	3	6	9	100
RT-qPCR Simples	4	5	9	100
Concordância	3	5	8	88,88
Valor de <i>p</i> (Exato de Fisher)				1,0000

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Avaliação preliminar da sensibilidade do sistema multiplex em amostras clínicas do estudo, em comparação ao sistema simples, utilizando o teste Exato de Fisher. Uma concordância ótima (88,88%) foi evidenciada ($p=1$). p : nível de significância estabelecido em 1% ($p<0.01$).

8 DISCUSSÃO

Identificado em mais de 100 países no mundo, o CHIKV tem sido referenciado como um dos arbovírus de grande relevância médica recentemente, em decorrência as diversas epidemias, principalmente no Brasil, e também pelas altas taxas de morbidade e mortalidade associadas ao vírus (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; SMALLEY et al., 2016). Atualmente não há tratamento específico ou vacina comercialmente disponível para a infecção pelo CHIKV, o que reforça a importância da realização de um método de diagnóstico seguro, precoce e sensível, que auxilie no manejo clínico dos indivíduos acometidos e no controle das epidemias, com aplicação também em estudos epidemiológicos (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONELOS, 2015; WANG et al., 2016).

A estratégia mais eficiente para a identificação da infecção aguda, é a detecção do CHIKV por RT-qPCR, um método molecular de diagnóstico rápido, precoce e extremamente sensível, principalmente na detecção de novos casos, possibilitando também o mapeamento de áreas endêmicas e assim, a implementação de medidas de controle e prevenção da doença (KUBISTA et al., 2006; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). A técnica de RT-qPCR confere diversas vantagens e aplicações no diagnóstico e na pesquisa clínica do vírus, pois além de detectar o vírus consegue determinar a sua carga viral. Assim, além do uso no diagnóstico e prognóstico da doença, permite também o monitoramento terapêutico ou preventivo do indivíduo infectado, além de estudos acerca do comportamento do vírus e sua relação com o hospedeiro, através das análises da carga viral (GULLETT; NOLTE, 2015; MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002).

Com a finalidade de garantir uma maior qualidade ao diagnóstico molecular, o uso de controles endógenos, através de genes constitutivos do hospedeiro, é uma ferramenta crucial, evitando o surgimento de resultados falso negativos, por assegurar a integridade do material genético nas amostras (BURD, 2010; WILLIAMS et al., 1996). A detecção do alvo principal (do patógeno em questão) juntamente com o controle endógeno no diagnóstico, avalia a integridade do material genético e ocorrência de inibidores de PCR, garantindo que a extração foi bem-sucedida, o que confere uma maior confiabilidade ao resultado (FUKASAWA et al., 2010; WONG; MEDRANO, 2005). Ensaio multiplex de PCR em tempo real podem ser empregados nessa situação, através do uso de diferentes sondas com marcação de corantes fluorescentes distintos para cada alvo molecular (HEID et al., 1996). Com essa tecnologia é possível analisar mais de um alvo em uma mesma reação, como o controle endógeno e o alvo

do patógeno, o que gera economia de reagentes e da amostra, e uma maior aplicabilidade na rotina de um diagnóstico (KLEIN, 2002).

A busca pelo aprimoramento das ferramentas moleculares é imprescindível para a confirmação segura de novos casos de infecção pelo CHIKV, o que permite além de um tratamento apropriado, o monitoramento das áreas endêmicas, fornecendo suporte ao Ministério da Saúde tanto no diagnóstico, quanto no desenvolvimento de pesquisas acerca do vírus (BRASIL, 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). O presente estudo, diante desse contexto, teve por objetivo otimizar (às condições locais) e implementar um sistema de RT-qPCR para detecção e quantificação do CHIKV, com base no protocolo estabelecido pelo CDC. O sistema otimizado foi avaliado através de uma curva padrão que também permitiu a quantificação das amostras do estudo, no qual análises da carga viral foram realizadas. No presente trabalho, o controle endógeno da RNase P humana foi adicionado ao sistema com a finalidade de gerar uma maior qualidade ao diagnóstico do CHIKV, e sua detecção simultânea (juntamente com o alvo viral) foi otimizada em um ensaio multiplex de RT-qPCR, tornando o diagnóstico além de mais seguro, simples, e com grande potencial de uso na rotina.

O perfil demográfico da doença em 2016 revelou no Brasil, uma maior incidência de indivíduos do sexo feminino com suspeita de infecção pelo CHIKV. Pham et al. (2017) encontraram também uma maior frequência de mulheres com suspeita de infecção pelo CHIKV em um trabalho conduzido na Jamaica. No Brasil, no mesmo período do presente trabalho, boletins epidemiológicos dos estados da Bahia, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, dentre outros, relataram a maior concentração de casos notificados em mulheres, para a infecção viral (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Bahia, 2016; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Rio de Janeiro, 2016; BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, Rio Grande do Norte, 2016). Dos 151 indivíduos analisados (população alvo) no estudo, registrados no Lacen PE no primeiro semestre de 2016, foi observado também uma maior frequência de casos suspeitos do sexo feminino 60,3% (n=91), corroborando com os achados da literatura. Essa concentração mais acentuada de casos suspeitos do sexo feminino, pode ser atribuída a maior presença das mulheres, em comparação aos homens, nos ambientes domiciliares. Assim, ficam mais expostas a transmissão viral, pela grande incidência dos mosquitos vetores em caixas d'água, vasos de flores, dentre outros locais domiciliares (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016; PHAM et al., 2017). Embora não tenha sido relatado na literatura outra razão (de fundo molecular ou imunológico, por exemplo) que possa ser associada a essa maior frequência de casos notificados do sexo feminino, alguns fatores podem ser levados em conta. Observa-se que a taxa de desemprego no Brasil afeta mais mulheres do que homens, ao longo dos anos. Em

2011, o índice de desemprego foi de 7,5 para as mulheres contra 4,7 para os homens, e essa realidade infelizmente seguiu nos anos seguintes, assim como, quase que a totalidade dos serviços domésticos são ocupados por mulheres (94,8%), o que reflete no maior tempo das mulheres em domicílios e assim o maior risco de transmissão viral (IBGE, 2014).

Em relação a faixa etária, o maior número de casos notificados de infecção pelo CHIKV foi na faixa adulta com idades variando entre 20 e 39 anos, em Pernambuco e demais estados brasileiros (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016). Observa-se também, que a maioria dos casos notificados (n=19.371) ocorreram na GERES I (abrange os municípios de Abreu e Lima, Camaragibe, Igarassu, Ilha de Itamaracá, Ipojuca, Itapissuma, Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista, Recife e São Lourenço da Mata (INFORME EPIDEMIOLÓGICO ARBOVIROSES, 2017). Na análise demográfica do estudo, da totalidade, foi encontrada também uma maior frequência na faixa adulta, em municípios da GERES I, principalmente em Recife (n=34).

O diagnóstico para o CHIKV pode ser realizado pelo isolamento viral, pela sorologia ou pela detecção do genoma viral em indivíduos infectados (SIMMONS et al., 2016). Entretanto, o diagnóstico molecular através da RT-qPCR apresenta características de um diagnóstico seguro, sensível, rápido e precoce (identificando a fase aguda da infecção, onde a viremia está significativa) (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; PONGSIRI et al., 2012). Apesar de vários protocolos publicados de RT-qPCR para detecção do RNA viral, o ensaio desenvolvido e utilizado pelo CDC e demais centros de saúde no Brasil, recebe o destaque pela alta sensibilidade de <1 PFU e especificidade de 100% para a detecção do CHIKV, sendo o protocolo de escolha para o presente trabalho (LANCIOTTI et al., 2007; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2011).

No processo de avaliação desse ensaio de RT-qPCR no estudo, uma curva padrão foi construída para avaliar sua sensibilidade em número de cópias de RNA/ μ l, estabelecendo o LOD, assim como, a performance do ensaio. Em um ensaio de RT-qPCR para detecção do CHIKV relatado por Carletti et al. (2007) utilizando uma curva padrão com DNA plasmidial, a sensibilidade atingida foi de 20 cópias por reação com um C_t equivalente de 35. Pongsiri et al. (2012) em um ensaio multiplex de RT-qPCR para detecção do CHIKV e do DENV, apresentaram um LOD de 10 cópias/ μ l com um C_t de 35 para ambos os alvos, utilizando também DNA plasmidial na curva padrão. Em um outro ensaio multiplex para os mesmos alvos, descrito por Simmons et al. (2016), um LOD de 12 cópias/ μ l e C_t de 34,59 para o alvo CHIKV foi apresentado, com protocolo semelhante ao utilizado no presente estudo, para geração do transcrito e da curva padrão. O resultado da avaliação no estudo, demonstrou que o ensaio de RT-qPCR foi sensível, apresentando um LOD de 39 cópias de RNA/ μ l (com C_t de 34,04),

aproximando-se bastante dos resultados aqui discutidos, confirmando a mesma sensibilidade também em um experimento com amostra negativa com diluições seriadas do transcrito, simulando amostras biológicas infectadas com o vírus. Parâmetros importantes podem ser obtidos através de uma curva padrão (eficiência, *slope* e r^2), úteis para avaliar o sistema em termos de desempenho e eficiência (BUSTIN et al., 2009). Para a obtenção de resultados reprodutíveis e acurados, espera-se que as reações de PCR apresentem uma eficiência mais próxima de 100% possível, com valores de *slope* em torno de -3.32 (indicando a diferença ideal entre C_t nas diluições) e de r^2 (coeficiente de correlação entre os pontos) mais próximo a 1,0 (BIO-RAD LABORATORIES, 2006; BURNS et al., 2005). Assim, no presente estudo, a curva padrão apresentou parâmetros de extrema qualidade, com um *slope* de -3.366, r^2 de 0,991 e uma eficiência de 98%, demonstrando a performance do sistema.

A utilização de transcritos de RNA tanto na avaliação quanto na rotina de um diagnóstico oferece vantagens de um procedimento seguro (não envolvendo a necessidade de manipulação viral em laboratório de biossegurança BSL-3), extremamente sensível e controlado, por determinar exatamente o número de cópias de RNA viral por amostra positiva (BURD, 2010; BUSTIN et al., 2009). Ainda, o RNA, diferentemente do DNA, é o controle mais indicado em reações de RT-qPCR, por verificar a eficiência da reação de transcrição reversa (WONG; MEDRANO, 2005). No trabalho aqui descrito, o transcrito produzido foi necessário para construção da curva padrão e assim apresentou ampla funcionalidade: estabelecendo o LOD do sistema, atuando como controle positivo na reação e permitindo também a quantificação das amostras do estudo, através da carga viral.

Como critério de positividade foi utilizado o LOD=34,04 definido previamente, e também obtenção de duplicatas homogêneas com curvas de amplificação de qualidade. Analisando o sistema de RT-qPCR em amostras clínicas, do total de 151 amostras testadas, 53,6% (n=81) foram positivas, enquanto 46,4% (n=70) foram negativas com maioria 70% (n=49), apresentando C_t indeterminado. Em uma análise comparativa dos resultados, a capacidade de detecção da infecção pelo CHIKV através da RT-qPCR, em relação ao teste MAC-ELISA para captura de anticorpos IgM (realizado no Lacen PE), foi maior no período inicial ao surgimento de sintomas (0-4 dias) dos indivíduos positivos testados. Foi também observado que a partir do quinto dia, o teste IgM revelou uma capacidade de detecção um pouco melhor em comparação a RT-qPCR. Lanciotti et al. (2007) relataram também em seu trabalho que a maioria dos resultados IgM positivos para a infecção viral foram de indivíduos com mais de 4 dias de sintomas. Sabe-se que o CHIKV replica rapidamente no hospedeiro, gerando altos títulos, com possibilidade de detecção do RNA viral por RT-qPCR, logo nos primeiros dias de

surgimento dos sintomas (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Assim como, espera-se que a produção de anticorpos frente a infecção viral inicie no final da primeira semana de início de sintomas, com possibilidade de perdurar por meses (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014; WESTAWAY; DELLA-PORTA; REEDMAN, 1974). Com base nos resultados, foi possível constatar que o sistema de RT-qPCR otimizado foi capaz de detectar o alvo viral em todo o período analisado (0-8 dias), no qual recomenda-se a realização do diagnóstico virológico, demonstrando sua performance na detecção da infecção viral de maneira geral (BRASIL, 2014).

No presente estudo a curva padrão também foi utilizada para a quantificação das amostras positivas, apresentando uma variação entre 10^1 a 10^8 cópias/ μ l na maioria, com poucos indivíduos ($n=5$) atingindo uma carga viral ainda mais alta (acima de 10^8). A quantificação média foi de $5,31 \times 10^8$ cópias/ μ l e uma viremia $\geq 10^3$ cópias/ μ l foi observada na maioria das amostras positivas (64,2%) $n=52$. Através de um ensaio quantitativo de RT-qPCR, Sekaran et al. (2010) relataram também cargas virais entre 10^3 e 10^7 cópias/ μ l em indivíduos infectados pelo CHIKV. Semelhante aos nossos achados, Santhosh et al. (2007) descreveram uma viremia na faixa de 10^4 a 10^6 PFU/ml em infecções pelo CHIKV, em um estudo na Índia, e em alguns casos, uma quantidade de vírus expressiva de 10^7 PFU/ml foi encontrada. Cargas virais acima de 10^4 PFU/ml também foram evidenciadas no estudo conduzido por Lanciotti et al. (2007) para detecção do CHIKV. Como podemos observar, as análises da carga viral relatadas no estudo, foram bastante próximas as aqui discutidas, o que refletiu na presença de uma carga viral significativa nos indivíduos positivos durante o período virêmico, que corresponde aos oito dias pós infecção pelo CHIKV (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Em estudos de competência vetorial, já foi demonstrado que títulos virais em torno de 10^4 PFU/ml foram suficientes para produção e disseminação em mosquitos vetores (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) da infecção pelo CHIKV em macacos, o que reforça a importância de estudos na avaliação da carga viral na população endêmica (TURELL; BEAMAN; TAMMARIELLO, 1992). Ainda, a utilização da RT-qPCR na determinação da carga viral, confere vantagens de uma metodologia mais rápida, sensível e segura em comparação ao isolamento viral, que necessita de um laboratório de biossegurança BSL-3, pelo risco de transmissão viral, é mais laboriosa e demanda mais tempo para obtenção dos resultados (MADARIAGA; TICONA; RESURRECION, 2016; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

Outras análises através da carga viral determinada no estudo foram conduzidas, correlacionando-a com a faixa etária da população alvo e com dias de surgimento de sintomas. As faixas etárias criança (até os 11 anos de idade) e idoso (60 anos ou mais) concentraram as

maiores cargas virais de $\geq 10^7$ cópias/ μ l ($p < 0.05$), incluindo uma mulher de 75 anos de idade com quantificação de $1,31 \times 10^{10}$ cópias/ μ l, cuja viremia foi a maior do estudo. Laurent et al. (2007) através de um ensaio de RT-qPCR para quantificação e detecção do CHIKV, revelaram que em sua população alvo cargas virais elevadas, $> 10^8$ cópias/ml, foram detectadas em recém-nascidos e idosos acima dos 60 anos, corroborando com os nossos achados. Os autores desse trabalho sugerem ainda a presença de uma resposta imune menos eficiente, o que pode ter conduzido a uma taxa de replicação viral maior nesses indivíduos. Sabe-se que a febre Chikungunya apresenta uma expressão clínica diversificada de acordo com a idade, no qual neonatos e idosos são reconhecidos como grupos de risco em comparação a outras faixas etárias, isto pode ser atribuído a um sistema imune não tão eficaz, somado a condições pré-existentes, outras doenças associadas, e demais fatores (BRASIL, 2014; MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, 2016). De acordo com o último boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da Saúde, em 2016 foram confirmados oficialmente um total de 196 óbitos por febre Chikungunya no Brasil, e Pernambuco concentrando o maior número de casos $n=58$, com mediana de idade dos óbitos de 62 anos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016). Assim, a determinação da carga viral vai além do diagnóstico e incide na correlação com o estado da doença, com possibilidade de atuar como uma ferramenta valiosa no direcionamento e acompanhamento clínico, no que se refere a um tratamento precoce e mais efetivo, principalmente para os que se encontram no grupo de risco (GULLETT; NOLTE, 2015).

Em relação ao tempo de surgimento de sintomas, foi encontrada uma média de 5 dias com maioria das amostras positivas 69,13% ($n=56$) coletadas entre os 5 primeiros dias de sintomas. As maiores cargas virais foram observadas nos 4 primeiros dias de surgimento de sintomas, principalmente até 2 dias, com um índice de carga viral de $\geq 10^7$ cópias/ μ l na maioria dos indivíduos, refletindo possivelmente a viremia expressiva ($p < 0.001$). No estudo de Laurent et al. (2007) também foi observado um perfil similar da população alvo analisada, na qual 89% das amostras foram coletadas entre os 3 primeiros dias de surgimento de sintomas, com alguns indivíduos apresentando cargas virais mais altas, acima de 10^7 cópias/ml. Em acordo com o que o que foi observado no presente trabalho, Sekaran et al. (2010) relataram uma viremia mais alta entre 10^5 e 10^7 cópias/ μ l no período de 0-2 dias pós infecção pelo CHIKV. Pode-se evidenciar que o sistema de RT-qPCR foi sensível na determinação da carga viral, permitindo que diversas análises fossem conduzidas, como esta última, demonstrando a correlação entre carga viral e dias pós infecção, através da ocorrência de cargas virais elevadas nos dias iniciais ao surgimento de sintomas, que pode ser atribuída ao período virêmico no hospedeiro (WEAVER et al., 2012).

O sistema de RT-qPCR apresentou dois alvos separadamente: CHIKV e RNaseP humana (RNP), este, aplicado como controle endógeno da reação. Apesar de ter sido utilizada a mesma sequência de primers e sonda da RNP que o CDC no diagnóstico do vírus da Influenza A, foi necessária uma otimização para que o ensaio da RNP funcionasse na proposta do estudo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). Ajustes nas concentrações de primers e sonda (formato único tubo) foram realizadas através do mesmo protocolo de RT-qPCR definido para o ensaio do CHIKV. Todas as 151 amostras testadas no estudo apresentaram ampliações para o controle endógeno da RNP (critério de positividade $C_t < 38$), e foi observada uma variação pouco expressiva da média do C_t nos diversos dias pós infecção, e também ao correlacionar com a carga viral dos indivíduos positivos ($p < 0.0001$). Nessa análise foi verificado que o C_t oscilou numa faixa entre 25 e 35, com maioria apresentando C_t em torno de 30, em todos os indivíduos do estudo, diferentemente do que foi observado no ensaio para detecção do CHIKV, com variações significativas tanto do C_t (valores de 9 a 35) na população alvo, quanto da carga viral (10^1 a 10^{10} cópias/ μ l) nos positivos. Boddicker et al. (2007) em um ensaio multiplex de RT-qPCR para detecção do vírus da caxumba e da RNP utilizando as mesmas sequências de primers e sonda, demonstraram também uma variação reduzida de C_t (26 a 32) no alvo RNP, com maioria apresentando valores em torno de 30, em comparação a uma distribuição de C_t diversificada do alvo viral. No trabalho de Waggoner et al. (2013) foi relatado níveis similares de RNP na totalidade das amostras analisadas, em um ensaio multiplex de RT-qPCR para detecção do DENV, verificando a ausência de inibidores da reação e uma adequada extração de RNA, corroborando com os nossos achados. Assim, no presente trabalho foi possível observar a funcionalidade do alvo RNP como gene constitutivo, expresso em níveis praticamente constantes em todas as células, o que permite seu uso como controle endógeno nas reações. A inserção de controles endógenos é de extrema importância pois garantem a qualidade da extração das amostras e conferem uma maior confiabilidade aos resultados em um diagnóstico (CUI et al., 2016; WONG; MEDRANO, 2005).

Uma das diversas vantagens aqui relatadas da utilização do sistema de PCR em tempo real, está no desenvolvimento de ensaios multiplex (mais de um alvo na mesma reação), o que reflete na redução de custos com reagentes e de tempo, e mais importante, na economia da amostra do paciente (KLEIN, 2002). Após a avaliação da RT-qPCR no formato simples, no qual foi observada uma ótima performance na detecção e quantificação viral, foi realizada a otimização do sistema multiplex, com detecção simultânea dos alvos CHIKV e RNP. As concentrações dos primers e sondas foram ajustadas para que o sistema fosse reprodutível e efetivo, e amostras controles foram inseridas. Assim, levando-se em consideração as menores

diferenças dos valores de C_t entre os sistemas, qualidade das curvas de amplificação e obtenção de duplicatas homogêneas, o sistema multiplex de RT-qPCR foi otimizado e então avaliado de maneira preliminar, através da curva padrão e análise de concordância pelo Teste Exato de Fisher.

No sistema multiplex, a curva padrão construída apesar de não ter alcançado o último ponto da diluição (10^1), apresentou um LOD de 390 cópias/ μ l (10^2) e uma média do C_t ($C_t=33,94$) muito próxima a descrita previamente no sistema simples de RT-qPCR ($C_t=34,04$), cujo LOD foi de 39 cópias/ μ l. Ainda, embora a curva padrão tenha apresentado um LOD menor, parâmetros de qualidade (*slope* de -3.333, $r^2 = 0.981$ e uma eficiência de 99%) foram observados, revelando a performance do sistema multiplex. Próximo ao que foi encontrado, Kui et al. (2013) em um ensaio multiplex para detecção do CHIKV e da DENV, juntamente com o controle endógeno da RNP contendo as mesmas sequências do conjunto de primers e sonda do presente estudo, descreveram uma sensibilidade analítica de 10 a 100 cópias do transcrito de RNA para os alvos virais, com um C_t de 31,82 para o alvo CHIKV. A curva padrão também foi demonstrada nesse trabalho e apresentou os seguintes parâmetros: *slope* = -3.37, $r^2 = 0.98$ e uma eficiência de 97,90%. O sistema multiplex aqui otimizado demonstrou um desempenho um pouco melhor em relação aos parâmetros da curva padrão, quando comparado aos de Kui et al. (2013). Seguindo para a avaliação preliminar em amostras clínicas do estudo, o sistema multiplex apresentou uma ótima concordância percentual de 88,88% em comparação aos resultados obtidos no sistema simples, ainda, nenhuma diferença estatística foi observada entre os testes ($p=1$), mostrando-se uma ferramenta promissora na aplicação da rotina do diagnóstico do CHIKV. Estudos futuros são necessários para uma avaliação mais completa e também para validação desse novo ensaio multiplex, utilizando um número maior de amostras.

O estudo aqui desenvolvido teve por finalidade o aperfeiçoamento da ferramenta molecular de RT-qPCR para a detecção do CHIKV, trazendo uma aplicação mais abrangente na pesquisa e diagnóstico clínico, através da inserção do transcrito de RNA e do controle endógeno da RNP. O transcrito, através da curva padrão, permitiu a avaliação do sistema de RT-qPCR para detecção e quantificação viral, atuou como controle positivo da reação e também determinou a carga viral dos indivíduos testados. As análises da carga viral possibilitaram além da aplicação no diagnóstico do CHIKV, uma melhor compreensão acerca da infecção viral no hospedeiro e potencial aplicação em diversos estudos na área clínica, como no monitoramento da doença no hospedeiro, assim como, na resposta do vírus ao fármaco e à candidatos vacinais, dentre outras pesquisas. Já o controle endógeno da RNP, garantiu que o processamento das amostras foi realizado de maneira efetiva, assegurando a integridade do RNA, evitando,

portanto, a ocorrência de resultados falso negativos. Ainda, foi realizada a otimização do sistema multiplex, com detecção do alvo viral e da RNP em conjunto, que oferece inúmeras vantagens, como a praticidade na rotina de diagnóstico, menor tempo de processamento, economia dos reagentes e da amostra (especialmente em situações de difícil coleta pela condição do paciente). O sistema multiplex foi avaliado de maneira preliminar, apresentando ótima concordância e nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada em comparação ao teste no formato simples. Com a introdução dos controles (transcrito e RNP) foi possível atribuir uma maior qualidade ao sistema de RT-qPCR, tornando-o além de qualitativo, quantitativo para a detecção do CHIKV, uma arbovirose de alta relevância médica, endêmica no país, principalmente na região nordeste, onde o estado de Pernambuco ainda é bastante acometido, demonstrando-se uma ferramenta promissora a ser implementada na rotina laboratorial.

9 CONCLUSÕES

O sistema simples de RT-qPCR para detecção e quantificação do CHIKV, avaliado através da curva padrão em nosso laboratório, foi sensível e demonstrou uma ótima performance, com resultados próximos aos encontrados na literatura. As cargas virais dos indivíduos positivos foram determinadas com a curva padrão e suas análises relataram uma viremia mais alta no grupo de risco (criança e idoso), assim como, nos primeiros dias de surgimento de sintomas. Essas análises foram importantes para uma melhor compreensão do comportamento do vírus e sua relação com o hospedeiro na infecção.

O controle endógeno da RNP introduzido ao diagnóstico do CHIKV, apresentou uma variação baixa em relação ao C_t em todas as amostras, o que indica uma expressão praticamente constante no hospedeiro, demonstrando sua aplicação como gene constitutivo, garantindo o sucesso da extração e conferindo uma melhor qualidade ao diagnóstico.

O sistema multiplex com detecção simultânea dos alvos CHIKV e RNP foi otimizado, revelando uma boa sensibilidade analítica, com uma ótima concordância percentual em comparação ao sistema simples, sem diferença estatística entre os testes, mostrando-se promissor para o diagnóstico viral.

Portanto, estudos de validação devem ser conduzidos para que o novo sistema multiplex otimizado seja inserido na rotina de diagnóstico do CHIKV no IAM. Uma ferramenta rápida e prática, ao mesmo tempo sensível, confiável e precoce, permitindo a detecção e quantificação viral. A inserção de tal metodologia também possibilitará o mapeamento de áreas endêmicas e implementação de medidas de controle e prevenção da doença, fornecendo, no mais, auxílio ao Ministério da Saúde tanto no diagnóstico quanto no desenvolvimento de pesquisas acerca do CHIKV.

REFERÊNCIAS

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Antiviral Strategies Against Chikungunya Virus. Methods in molecular biology, Totowa, v. 1426, p. 243-253, 2016.

AGARWAL, A. et al. Application of real-time RT-PCR in vector surveillance and assessment of replication kinetics of an emerging novel ECSA genotype of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. Journal of virological methods, Amsterdam, v. 193, n. 2, p. 419-425, 2013.

ALBERTS, B. et al. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artrned, 2010.

ALBERT, M. L.; SCHWARTZ, O. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nature Reviews Microbiology, London, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.

ALBUQUERQUE, I. G. C. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.

AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Chikungunya risk in Brazil. Revista de saúde pública, São Paulo, v. 49, n. 58, p. 49-58, 2015.

AYRES, M. et al. BIOESTAT: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BEESEON, S. et al. Chikungunya fever, Mauritius, 2006. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 14, n. 2, p. 337-338, 2008.

BIO-RAD LABORATORIES. Real-Time PCR Applications Guide. California, 2006. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>>. Acesso em: 07 ago. 2016.

BLACKSELL, S. D. et al. Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the acute diagnosis of chikungunya infection. Clinical and vaccine immunology, Washington, v. 18, n. 10, p. 1773-1775, 2011.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (Bahia). Salvador: Secretaria da Saúde do Estado, n. 12, 16 ago. 2016. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/novoportal/images/stories/PDF/BoletimEpidemiologico/Boletim%20epidemiologico%20n%2012%20dengue%20_chikungunya_zika.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 46, n. 14, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 48, n. 31, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (Rio de Janeiro). Rio de Janeiro: Secretaria de Estado de Saúde, n. 5, 20 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.riocontradengue.com.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=1w6WrUKf%2BXA%3D>>. Acesso em: 22 abr. 2017.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO (Rio Grande do Norte). Natal: Secretaria de Saúde Pública, n. 23, 23 jun. 2016. Disponível em: <<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC00000000121221.PDF>>. Acesso em: 25 abr. 2017.

BOTES, M.; KWAADSTENIET, M.; CLOETE, T. E. Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Heidelberg, v. 405, n. 1, p. 91–108, 2013.

BODDICKER, J. D. et al. Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Mumps Virus RNA in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 9, p. 2902–2908, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. *Ministerio da Saude atualiza situação do virus-Chikungunya*. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias_svs/15072-ministerio-da-saude-atualiza-situacao-do-virus-chikungunya>. Acesso em: 06 mar. 2016.

BUCHEN-OSMOND, C. *ICTVdB - The Universal Virus*. Database, version 4. New York: Columbia University, 2006.

BURD, E. M. Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews*, Washington, v. 23, n. 3, p. 550–576, 2010.

BURNS, M. J; VALDIVIA, H.; HARRIS, N. Analysis and interpretation of data from real-time PCR trace detection methods using quantitation of GM soya as a model system. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Heidelberg, v. 378, n. 6, p. 1616–1623, 2004.

BURNS, M. J. et al. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BioMed Central biotechnology Biotechnology*, London, v. 5, n. 31, 2005.

BUSTIN. S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, New York, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

BUSTIN. S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, New York, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Revista de saúde pública*, São Paulo, v. 50, n. 36, 2016.

CAGLIOT, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. New microbiologica, Pavia, v. 36, n. 3, p. 211-227, 2013.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity. Journal of the history of medicine and allied sciences, New Haven, v. 26, n. 3, p. 243-262, 1971.

CARLETTI, F. et al. Short Report: Rapid Detection and Quantification of Chikungunya Virus by a One-Step Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Real-Time Assay. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 521–524, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). Chikungunya Virus Transmission, Geographic Distribution. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/>>. Acesso em: 27 mai. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Chikungunya, Information for healthcare providers. Atlanta, 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_Clinicians.pdf >. Acesso em: 07 abr. 2016.

CECILIA, D. et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. Archives of virology, Wien, v. 160, n. 1, p. 323-327, 2015.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A.-B.; WEAVER, S. C. Chikungunya Virus–Vector Interactions. Viruses, Basel, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, 2014.

CHAVES, T. S. S. et al. Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 18, n. 3, p. 529-530, 2012.

CHIAM, C. W. et al. Real-time polymerase chain reaction for diagnosis and quantitation of negative strand of chikungunya virus. Diagnostic microbiology and infectious disease, New York, v. 77, n. 2, p. 133-137, 2013.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin- 6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. The Journal of infectious diseases, Chicago, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

CONDIT, R. C. Principles of Virology. In: KNIPE, D. M. et al. Fields of Virology. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

COX, M. M.; DOUDUNA J. A.; O'DONNELL, M. Biologia Molecular Princípios e Técnicas.1. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CUI, D. et al. Simultaneous detection of influenza A subtypes of H3N2 virus, pandemic (H1N1) 2009 virus and reassortant avian H7N9 virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay. Springer Plus, Switzerland, v. 5, n. 1, 2016.

DASH, M.; MOHANTY, I.; PADHI, S. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus: Do We Really Need It? Indian Journal of Medical Sciences, Bombay, v. 65, n. 3, 2011.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Disponível em: <www.OpenEpi.com>. Acesso em: 01 mai. 2017.

DIALLO, M. et al. Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 281-286, 1999.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 6, n 3, e1446, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001446>>. Acesso em: 7 abr. 2017.

EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live Chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. The American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 62, n. 6, p. 681-685, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 48, n. 3, p. 233-234, 2015.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Molecular Aspects of Medicine, Elmsford NY, v. 27, p. 126–139, 2006.

FORTERRE, P. The great virus comeback. Biologie aujourd'hui, Paris, v. 207, n. 3, p. 153-168, 2013.

FRONHOFFS, S. et al. A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes, London, v. 16, n. 2, p. 99-110, 2002.

FUKASAWA, L. O. et al. Implantação e otimização da PCR em tempo real para o diagnóstico da influenza A (H1N1) pandêmica no Instituto Adolfo Lutz e perspectivas para 2010. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 131-135, 2010.

GAIBANI, P.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Diagnostic Methods for CHIKV Based on Serological Tools. Methods in molecular biology, Totowa, v. 1426, p. 63-73, 2016.

GASQUE, P. et al. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. Vector borne and zoonotic diseases, Larchmont, v. 15, n. 4, p. 241-249, 2015.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. PLoS medicine, San Francisco, v. 5, n. 3, 2008. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050060>>. Acesso em: 15 out. 2016.

GULLETT, J. C.; NOLTE, F. S. Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections. Clinical chemistry, New York, v. 61, n. 1, p. 72-78, 2015.

HAIJAN-TILAKI, K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. Journal of Biomedical Informatics, San Diego, v. 48, p. 193-204, 2014.

HARRISON, V. R. et al. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. Journal of immunology, Baltimore, v. 107, n. 3, p. 643-647, 1971.

HEID, C. A. et al. Real Time Quantitative PCR. Genome research, New York, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HER, Z. et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. Journal of immunology, Baltimore, v. 184, n. 10, p. 5903-5913, 2010.

HOARAU, J. et al. Identical Strength of the T Cell Responses against E2, nsP1 and Capsid CHIKV Proteins in Recovered and Chronic Patients after the Epidemics of 2005-2006 in La Reunion Island. PLOS ONE, San Francisco, v. 8, n. 12, p. e84695, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084695>>. Acesso em: 20 out. 2016.

HOCHEDÉZ, P. et al. Chikungunya infection in travelers. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 12, n. 10, p. 1565-1567, 2006.

IBGE. Estatísticas de gênero: uma análise dos resultados do Censo Demográfico 2010. Rio de Janeiro, 2014. (Série estudos e pesquisas, n. 33.). Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=288941>>. Acesso em: 10 mai. 2017

JACOBSEN, S. et al. External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v. 76, p. 55-65, 2016.

JARROUS, N. Human ribonuclease P: Subunits, function, and intranuclear localization. RNA, New York, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2002.

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Réunion Island. Emerging infectious diseases, Atlanta, v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006.

JOHNSON, A. J. et al. Detection of Anti-Arboviral Immunoglobulin G by Using a Monoclonal Antibody-Based Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 38, n. 5, p. 1827-1831, 2000.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. Journal of infectious diseases, Chicago, v. 214 (suppl 5), p. 471-S474, 2016.

JUPP, P. G.; KEMP, A. What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in Southern Africa? South African medical journal, Cape Town, v. 86, n. 1, p. 35-37, 1996.

KASHYAP, R. S. et al. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. Cerebrospinal Fluid Research, London, v. 7, n. 12, 2010. Disponível em: <<https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8454-7-12>>. Acesso em: 14 jan. 2017.

KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, Oxford, v. 8, n. 6, p. 257-260, 2002.

KOEV, G.; MILLER, W. A. A Positive-Strand RNA Virus with Three Very Different Subgenomic RNA Promoters. Journal of virology, Washington, v. 74, n. 13, p. 5988–5996, 2000.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. Molecular aspects of medicine, Elmsford NY, v. 27. (n. 2-3), p. 95-125, 2006.

KUI, Z. et al. Rapid detection of Dengue virus and Chikungunya virus by multiplex real-time RT-PCR assay with an internal control. Chinese Journal of Zoonoses, Fuzhou, v. 29, n. 3, p. 242-247, 2013.

LAM, S. K. et al. Chikungunya infection-an emerging disease in Malaysia. Southeast Asian journal of tropical medicine and public health, Bangkok, v. 32, n. 3, p. 447-451, 2001.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. Emerging Infectious Diseases Journal, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 764-767, 2007.

LAURENT, P. et al. Development of a Sensitive Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay with an Internal Control to Detect and Quantify Chikungunya Virus. Clinical Chemistry, New York, v. 53, n. 8, p. 1408–1414, 2007.

LAURI, A.; MARIANI, P. O. Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. Genes & Nutrition, New Orleans, v. 4, n. 1, p. 1–12, 2009.

LEUNG, J. YAT-SING.; NG, MAH-LEE. M.; CHU, J. J. H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. Advances in Virology, New York, v. 2011, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265296/pdf/AV2011-249640.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

LOPES, N. et al. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, Pará, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LU, X. et al. Rapid identification of Chikungunya and Dengue virus by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. American journal of tropical medicine and hygiene, Baltimore, v. 87, n. 5, p. 947-953, 2012.

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 49, n. 1, p. 33-57, 1955.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. Nucleic acids research, London, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. Brazilian journal of infectious diseases, Salvador, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2016.

MAHENDRADAS, P. et al. Ocular manifestations associated with Chikungunya. Ophthalmology, Philadelphia, v. 115, n. 2, p. 287-291, 2008.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/834371/>>. Acesso em: 16 nov. 2016

MARTIN, D. A. et al. Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 38, n. 5, p. 1823-1826, 2000.

MARTIN, D. A. et al. Evaluation of a Diagnostic Algorithm Using Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Differentiate Human West Nile Virus and St. Louis Encephalitis Virus Infections during the 2002 West Nile Virus Epidemic in the United States. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Washington, v. 11, n. 6, p. 1130-1133, 2004

MAVALANKAR, D. et al. Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 14, n. 3, p. 412-415, 2008.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. Clinica chimica acta: International journal of clinical chemistry and medical biochemistry, Amsterdam, v. 439, p. 231-250, 2015.

NAVARRO, T. P. Y.; FERNÁNDEZ, M. L. Fiebre Chikungunya. Revista Cubana de Medicina, La Habana, v. 54, n. 1, p. 74-96, 2015. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232015000100008>. Acesso em: 02 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory, 2013-2014 (to week noted): cumulative cases. Washington, 2014. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931>. Acesso em: 15 mar. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory, 2016 (to week noted): cumulative cases. Washington, 2016. Disponível em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931>. Acesso em: 25 mar. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Preparedness and Response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas. Washington, 2011. Disponível em:

<http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_English.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2016.

PANNING, M. et al. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 14, n. 3, p. 416-422, 2008.

PARASHAR, D. et al. Administration of E2 and NS1 siRNAs Inhibit Chikungunya Virus Replication In Vitro and Protects Mice Infected with the Virus. PLoS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 7, n. 9, p. e2405, 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3764232/>>. Acesso em: 7 out. 2016.

PHAM, N. P. et al. Epidemiology of Chikungunya fever outbreak in Western Jamaica during July–December 2014. Research and Reports in Tropical Medicine, London, v. 8, p. 7–16, 2017.

PRESTI, A. Lo. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. Infection, Genetics and Evolution, Amsterdam, v. 41, p. 270–278, 2016.

PROMEGA. Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Madison, 2015. Disponível em: <<https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>>. Acesso em: 02 abr.2017.

PONGSIRI, P. et al. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Heidelberg, v. 5, n. 5, p. 342-346, 2012.

RAO, T. R.; PAUL, S. D.; SINGH, K. R. Experimental studies on the mechanical transmission of Chikungunya virus by *Aedes aegypti*. Mosquito News, New York, v. 28, n. 3, p. 406–408, 1968.

REINER, R. et al. A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. Genes & development, New York, v. 20, n. 12, p. 1621-1635, 2006.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. Clinical features. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

RODRÍGUEZ, A. et al. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. Methods in molecular biology, Totowa, v. 1275, p. 31-56, 2015.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. Journal of General Virology, London, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 2015.

SEKARAN, S. D. et al. Development and evaluation of a one-step SYBR-Green I-based real-time RT-PCR assay for the detection and quantification of Chikungunya virus in human, monkey and mosquito samples. Tropical Biomedicine, Kuala Lumpur, v. 27, n. 3, p. 611–623, 2010.

SANTHOSH, S. R. et al. Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. Journal of Clinical Virology, Amsterdam, v. 39, p. 188–193, 2007.

SHAH, K. V.; GIBBS, C. J. Jr.; BANERJEE, G. Virological investigation of the epidemic of haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of three strains of Chikungunya virus. Indian journal of medical research, New Delhi, v. 52, p. 676-683, 1964.

SIMMONS, G. et al. High incidence of chikungunya virus and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1221-1228, 2016.

SIMMONS, M. et al. Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 54, n. 7, p. 1766-1773, 2016.

SMALLEY, C. et al. Status of research and development of vaccines for Chikungunya. Vaccine, Kidlington, v. 34, n. 26, p. 2976–2981, 2016.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. Virology, New York, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

SOLIOZ, M.; BIENZ, D. Bacterial genetics by electric shock. Trends in biochemical sciences, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 175-177, 1990.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging Chikungunya virus. PLoS Pathogen, v. 3, n. 6, 2007. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030089>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

STETSON, D. B.; MEDZHITOV, R. Type I interferons in host defense. Immunity, Cambridge, v. 25, n. 3, p. 373-381, 2006.

STRAUSS J. H.; STRAUSS E. M. The alphaviruses: gene expression, replication and evolution. Microbiological reviews, Washington, v. 58, n. 3, p. 491-562, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372977/pdf/microrev00022-0209.pdf>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

STRAUSS, E. G.; RICE, C. M.; STRAUSS, J. H. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. Virology, New York, v. 133, n. 1, p. 92–110, 1984.

INFORME EPIDEMIOLÓGICO ARBOVIROSES. Recife: Secretaria de Saúde do Estado, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.mp.pe.gov.br/mppe/attachments/article/7318/INFORME%20ARBOVIROSES%20SES-PE%20SE%2003-2017.pdf>>. Acesso em: 3 mai. 2017.

TALWAR, G. P.; HASNAIN, S. E.; SARIN, S. K. VII. Textbook of Biochemistry, Biotechnology, Allied and Molecular Medicine. 4. ed. New Jersey: PHI Learning, 2015. p. 1273–1278.

TELLES, J. N. et al. Evaluation of real-time nucleic acid sequence-based amplification for detection of Chikungunya virus in clinical samples. Journal of medical microbiology, Edinburgh, v. 58, n. 9, p. 1168-1172, 2009.

THIBOUTOT, M. M. et al. Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? PLOS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 4, n. 4, p. e623, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0000623&type=printable>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PloS pathogens, San Francisco, v. 3, n. 12, p. e201, 2007. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.0030201&type=printable>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

TURELL, M. J.; BEAMAN, J. R.; TAMMARIELLO, R. F. Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to chikungunya virus. Journal of medical entomology, Honolulu, v. 29, n. 1, p. 49–53, 1992.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed). Medicina Tropical e infectologia na Amazônia. 2. ed. Belém: Samauma editorial, 2013. p. 481–503.

VAZEILLE, M.; MOUSSON, L.; FAILLOUX, A. Failure to demonstrate experimental vertical transmission of the epidemic strain of Chikungunya virus in *Aedes albopictus* from La Réunion Island, Indian Ocean. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso), Rio de Janeiro, v. 104, n. 4, p. 632-635, 2009.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. Journal of virology, Washington, v. 84, n. 13, p. 6497–504, 2010.

WAGGONER, J. J. et al. Single-Reaction, Multiplex, Real-Time RT-PCR for the Detection, Quantitation, and Serotyping of Dengue Viruses. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 7, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002116&type=printable>>. Acesso em: 20 mai. 2017

WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. International journal of infectious diseases, Hamilton, v. 58, p. 69-76, 2017.

WANG, S. M. et al. Detection and Quantification of Chikungunya Virus by Real-Time RT-PCR Assay. Methods in molecular biology, Totowa, v. 1426, p. 105-17, 2016.

WAUQUIER, N. et al. The acute phase of chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. Journal of infectious diseases, Chicago, v. 204, n. 1, p. 115-123, 2011.

WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. Expert review of vaccines, London, v. 11, n. 9, p. 1087–1101, 2012.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on Public health. PloS neglected tropical diseases, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002921&type=printable>>. Acesso em> 3 jun. 2016

WESTAWAY, E. G.; DELLA-PORTA, A. J.; REEDMAN, B. M. Specificity of IgM and IgG antibodies after challenge with antigenically related togaviruses. Journal of immunology, Baltimore, v. 112, n. 2, p. 656–663, 1974.

WHITE, A.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J. P. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. Applied microbiology, Washington, v. 23, n. 5, p. 951-952, 1972.

WILLIAMS, P. M. et al. Real Time Quantitative PCR. Genome research, New York, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chikungunya. Fact sheet, Gênebra, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>. Acesso em: 05 abr. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). Gênebra, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2017.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques, Natick, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

ZUCHI, N. et al. Molecular Detection of Mayaro Virus during a Dengue Outbreak in the State of Mato Grosso, Central-West Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso), Rio de Janeiro, v. 109, n. 6, p. 820–823, 2014.

ANEXO A – Termo de Anuência (Lacen PE)

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO – SES
SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA
"Dr. Milton Bezerra Sobral" – LACEN/PE



Secretaria de Saúde
PERNAMBUCO
GOVERNO DO ESTADO

Ofício nº 19/2016

Recife, 31 de Maio de 2016.

Prezado Senhor,

Em atenção a vossa solicitação, e de acordo com a Gerência de Diagnóstico Laboratorial para Controle e Prevenção de Doenças - GDLCPD e Núcleo de Estudo e Pesquisa do LACEN PE - NEPEL, comunicamos nossa concordância e encaminhamos o PARECER para realização da parceria no projeto de pesquisa do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da FIOCRUZ/PE para "Avaliação e Desenvolvimento da RT-PCR em tempo Real para Detecção do Vírus da Chikungunya".

Colocamo-nos à disposição para esclarecimentos necessários.

Atenciosamente,



Ovídio Alencar Araripe Neto
Diretor Geral de Laboratórios Públicos

Dr. Rafael Dhalia
Tecnologista em Saúde Pública
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães
Departamento de Virologia - Lavite

Av, Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
Recife - PE
CEP.: 50.670-420

Rua João Fernandes Vieira, S/N – Soledade – Recife/PE – CEP: 50.050-200
Fone: (0xx81) 3181-6416/6417 – Fax: (0xx81) 3181-6333
e-mail: lacen@saude.pe.gov.br



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO - SES
SECRETARIA EXECUTIVA DE VIGILANCIA EM SAÚDE
DIRETORIA GERAL DE LABORATÓRIOS PÚBLICOS-LACEN PE
NÚCLEO DE ESTUDO E PESQUISA DO LACEN PE-NEPEL



PARECER

Nº.12/2016

Após análise detalhada e criteriosa do projeto intitulado "**Avaliação e Desenvolvimento da RT-PCR em Tempo Real para a Detecção do Vírus Chikungunya**" apresentado pela mestrandia **TÂMISA MORAIS DO RÊGO**, do Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE e orientada pelo professor Dr. Rafael Dhalia, e considerando as justificativas, os objetivos, a metodologia e as contribuições científicas, observamos que:

Trata-se de um projeto a nível de Mestrado que irá otimizar o ensaio de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-PCR), estabelecendo uma curva padrão para quantificação das amostras e determinação do limite de detecção da técnica, avaliando a eficácia do ensaio frente as amostras de referência através de análises estatísticas.

De acordo com a concordância da *Gerência de Diagnóstico Laboratoriais para Controle e Prevenção de Doenças - GDLCPD*, informando que disponibilizará 151 amostras de soro de pacientes, sem qualquer tipo de identificação, oriundas da rotina epidemiológica de Chikungunya do Setor de Virologia, salientando que as amostras serão alíquotadas, permanecendo uma alíquota do soro no setor.

Esclarecemos ainda que a nossa concordância com a realização da parceria do projeto não implica responsabilidade nos "orçamento das necessidades".

Entendemos e reconhecemos que o presente projeto é importante pela contribuição epidemiológica que trará para a Saúde Pública do nosso estado, e ressaltamos a obrigatoriedade do sigilo absoluto dos dados coletados, e a necessidade de nos enviar cópias de toda e quaisquer publicação advinda do projeto para compor o acervo da biblioteca do **NEPEL**, conseqüentemente servir de fonte de pesquisas e consultas para outros trabalhos científicos;

Ressaltamos a garantia de solicitar, se necessário, esclarecimentos antes, durante e depois do desenvolvimento da pesquisa e, no caso do não cumprimento dos itens acima, a liberdade de retirar a **CONCORDÂNCIA** a qualquer momento da pesquisa sem penalidade alguma.

Diante do exposto e não havendo outra consideração a ser feita no momento, **CONCORDAMOS** que seja pelo **LACEN-PE** oferecida todas as condições necessárias para o profícuo desenvolvimento da pesquisa.

Recife, 31 de maio de 2016

Sandra Salgueiro

Coordenadora do Núcleo de Estudo e Pesquisa do LACEN PE - NEPEL

Rua João Fernandes Vieira, S/N - Soledade - Recife/PE - CEP: 50.050-200
Fone: (0xx81) 3181-6406/6407 - Fax: (0xx81) 3181-6146
e-mail: nepel.lacenpe@hotmail.com

ANEXO B - Parecer de aprovação do CEP



Título do Projeto: "Avaliação e Desenvolvimento da RT-PCR em Tempo Real para a Detecção do Virus Chikungunya".

Pesquisador responsável: Tâmisia Rêgo

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 18/05/2016

Registro no CAAE: 56203916.5.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.594.134

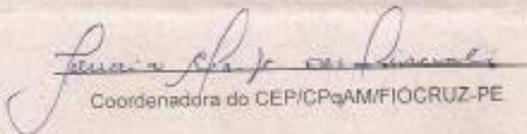
PARECER

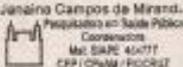
O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 21 de junho de 2016.


Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE



Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Moraes Rêgo, s/nº
CEP-06.870-420 Fone: (51) 2101.2639
Fax: (51) 3451.1012 | 3205.2639
Recife - PE - Brasil
- comite@cep@cpqam.fiocruz.br