

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Tarciana Fernanda da Silva Celerino

**Estabelecimento de uma RT-qPCR multiplex, capaz de realizar o diagnóstico,
diferencial, dos arbovírus Chikungunya X Mayaro**

Recife

2022

Tarciana Fernanda da Silva Celerino

Estabelecimento de uma RT-qPCR multiplex, capaz de realizar o diagnóstico, diferencial, dos arbovírus Chikungunya X Mayaro

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

Coorientadora: Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros

Recife

2022

Título do trabalho em inglês: Establishment of a multiplex RTqPCR capable of performing differential diagnosis of Chikungunya X Mayaro arboviruses.

C392e Celerino, Tarciana Fernanda da Silva.
Estabelecimento de uma RT-qPCR multiplex, capaz de realizar o diagnóstico, diferencial, dos arbovírus Chikungunya X Mayaro / Tarciana Fernanda da Silva Celerino. -- 2022.
72 p. : il.color.

Orientador: Rafael Dhalia.
Coorientadora: Daniele Barbosa de Almeida Medeiros.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.
Bibliografia: f. 68-72.

1. Alphavirus. 2. Febre de Chikungunya. 3. Infecções por alphavirus. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Técnicas de diagnóstico molecular. I. Título.

CDU 614

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Tarciana Fernanda da Silva Celerino

Estabelecimento de uma RT-qPCR multiplex, capaz de realizar o diagnóstico, diferencial, dos arbovírus Chikungunya X Mayaro

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 7 de outubro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Dhalia
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Elisa de Almeida Neves Azevedo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Dr. Rafael Dhalia, por toda confiança e por acreditar em mim para desenvolver esse projeto. Obrigada!

Às amigas do LaViTE, Ira, Verinha, Suellen, Thaí, Morgs, Elisa, pela paciência, por terem segurado minha mão em tantos momentos de dúvidas e me ensinado tantas coisas novas. Muito obrigada pela disponibilidade.

À coorientadora, Dra. Daniele Medeiros, por ter me recebido tão bem em sua cidade, Belém, e em seu Departamento no Instituto Evandro Chagas (IEC), e aos integrantes do grupo, Bruno e Yvi, por todos os ensinamentos durante minha temporada no IEC.

Agradeço também ao Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Evandro Chagas por cederem toda a infraestrutura para que esse trabalho fosse realizado.

Registro também o meu agradecimento à FACEPE, pelo recurso disponibilizado, que propiciou o desenvolvimento do trabalho.

Toda a minha gratidão aos meus familiares, por todo o apoio, em especial à minha mãe e ao meu primo/irmão André, por estarem sempre dispostos a me ouvir e consolar-me nos momentos difíceis.

RESUMO

CELERINO, Tarciana Fernanda da Silva Celerino. Estabelecimento de uma RT-qPCR multiplex, capaz de realizar o diagnóstico, diferencial, dos arbovírus Chikungunya X Mayaro. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

As arboviroses constituem um importante problema de saúde pública mundial, responsáveis por milhares de infecções anualmente. O Brasil, assim como outros países de clima tropical, apresenta condições favoráveis para a manutenção e disseminação de seus agentes infecciosos, devido a sua vasta diversidade ambiental e animal. Esses fatores também contribuem para a facilidade de adaptação de seus vetores, alguns destes capazes de transmitir mais de um patógeno. A similaridade clínica entre as infecções, principalmente quando ocasionadas por arbovírus pertencentes a mesma família, representa um grande desafio para os sistemas de saúde. Os vírus Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV), ambos Alphavirus, da família *Togaviridae*, possuem características clínicas relevantes, sendo capazes de deixar o indivíduo portador da infecção debilitado por meses e até anos, muitas vezes incapacitados de desenvolverem sequer as suas atividades diárias normalmente, devido a artralgia severa, gerando impactos econômicos significativos. Por estarem sintomatologicamente relacionados, estes arbovírus são frequentemente confundidos entre si, havendo a necessidade de diagnósticos diferenciais entre eles. Este trabalho teve por objetivo, estabelecer um protocolo de diagnóstico molecular (através da técnica de RT-qPCR) para diferenciar CHIKV e MAYV em uma única reação, visando permitir o diagnóstico diferencial dessas doenças para os serviços de saúde. O ensaio duplex para o diagnóstico diferencial do CHIKV X MAYV demonstrou uma boa performance para o diagnóstico do CHIKV, ao ser comparado com o ensaio simples de CHIKV, já estabelecido. O limite de detecção apresentou resultados similares aos encontrados na literatura, com parâmetros de eficiência ainda superiores. Por outro lado, para detecção do MAYV, o ensaio não demonstrou eficiência aceitável. Ajustes precisam ser realizados, buscando a melhor performance. O diagnóstico preciso destas infecções tem ainda a finalidade de melhorar a qualidade das notificações, evitando subnotificação ou notificações errôneas, servindo inclusive de suporte para inquéritos epidemiológicos.

Palavras chaves: infecções por alphavirus; febre de chikungunya; febre do mayaro; reação em cadeia da polimerase; técnicas de diagnóstico molecular.

ABSTRACT

CELERINO, Tarciana Fernanda da Silva Celerino. Establishment of a multiplex RT-qPCR capable of performing differential diagnosis of Chikungunya X Mayaro arboviruses. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

Arboviruses are an important public health problem worldwide, responsible for thousands of infections annually. Brazil, like other tropical countries, has favorable conditions for the maintenance and dissemination of its infectious agents, due to its vast environmental and animal diversity. These factors also contribute to the ease of adaptation of their vectors, some of which are capable of transmitting more than one pathogen. The clinical similarity between infections, especially when caused by arboviruses belonging to the same family, represents a major challenge for health systems. The Chikungunya (CHIKV) and Mayaro (MAYV) viruses, both Alphavirus, from the *Togaviridae* family, have relevant clinical characteristics, being able to leave the infected individual debilitated for months and even years, often unable to perform even their daily activities, usually due to severe arthralgia, generating significant economic impacts. Because they are symptomatically related, these arboviruses are often confused with each other, requiring differential diagnoses between them. This study aimed to establish a molecular diagnosis protocol (through the RT-qPCR technique) to differentiate CHIKV and MAYV in a single reaction, aiming to allow the differential diagnosis of these diseases for health services. The duplex assay for the differential diagnosis of CHIKV X MAYV demonstrated a good performance for the diagnosis of CHIKV, when compared with the simple assay of CHIKV, already established. The detection limit presented results similar to those found in the literature, with even higher efficiency parameters. On the other hand, for the detection of MAYV, the assay did not demonstrate acceptable efficiency. Adjustments need to be made, seeking the best performance. The accurate diagnosis of these infections also aims to improve the quality of notifications, avoiding underreporting or erroneous notifications, even serving as support for epidemiological surveys.

Key words: alphavirus infections; chikungunya fever; mayaro fever; polymerase chain reaction; molecular diagnostic techniques.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo de manutenção dos arbovírus	14
Figura 2 -	Filogenia dos <i>Alphavirus</i>	19
Figura 3 -	Representação estrutural dos <i>Alphavirus</i>	20
Figura 4 -	Organização genômica dos <i>Alphavirus</i> Chikungunya e Mayaro	21
Figura 5 -	Distribuição geográfica das epidemias de CHIKV e seus vetores	22
Figura 6 -	Casos prováveis de Chikungunya de 2019 a 2022	23
Figura 7 -	Incidência de Chikungunya (nº de casos / 100 mil habitantes) por região em 2022.....	24
Figura 8 -	Epidemiologia do vírus Mayaro no mundo	25
Figura 9 -	Ciclo de transmissão CHIKV	26
Figura 10 -	Ciclo de transmissão através de mosquito vetor	27
Figura 11 -	Ciclo de transmissão MAYV	28
Figura 12 -	Principais manifestações clínicas das infecções ocasionadas pelos vírus CHIKV, MAYV, DENV e ZIKV	30
Figura 13 -	Resposta imunológica no período de viremia da doença e após viremia	32
Figura 14 -	Etapas da técnica de PCR	33
Figura 15 -	Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real	34
Figura 16 -	Representação esquemática das sondas TaqMan	35
Quadro 1 -	Iniciadores e sondas utilizados na RT-qPCR para CHIKV x MAYV	40
Figura 17 -	Desenho do plasmídeo contendo as sequências de iniciadores e sondas do vírus Chikungunya	41
Figura 18 -	Desenho do plasmídeo contendo as sequências de iniciadores e sondas do vírus Mayaro	42
Figura 19 -	Inserto vírus Mayaro	43
Figura 20 -	Diluições para avaliação do limite de detecção do protocolo duplex de RT-qPCR	48
Figura 21 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação do tamanho do inserto do MAYV, após digestão enzimática	51
Quadro 2 -	Concentrações dos clones do MAYV após digestão enzimática	52

Figura 22 -	Gráfico de amplificação da padronização das condições ideais de iniciadores	53
Figura 23 -	Gráfico de amplificação da padronização das condições ideais de sonda	54
Quadro 3 -	Concentrações dos RNAs do CHIKV e MAYV, após quantificação por PCR-Digital	55
Figura 24 -	Curva de Amplificação do limite de detecção do protocolo de RT-qPCR para o vírus Chikungunya	55
Figura 25 -	Limite de detecção do sistema RT-qPCR para a detecção do CHIKV	56
Figura 26 -	Limite de detecção do protocolo de RT-qPCR para detecção do vírus Mayaro	57
Figura 27 -	Curva de Amplificação do RT-qPCR para o CHIKV	58
Figura 28 -	Comparação da performance do ensaio singleplex e duplex do CHIKV	59
Quadro 4 -	Parâmetros obtidos na curva padrão do CHIKV	59
Figura 29 -	Curva de Amplificação do RT-qPCR para o MAYV	60
Figura 30 -	Comparação da performance do ensaio singleplex e duplex do MAYV	61
Quadro 5 -	Parâmetros obtidos na curva padrão do MAYV	61
Figura 31 -	Comparação: Singleplex X Duplex (CHIKV e MAYV)	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Capsídeo
CDC	Center for Disease Control and prevention
C _t	Cycle Threshold
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGLab	Coordenação Geral de Laboratório
CHIKF	Chikungunya Fever
CHIKV	Chikungunya Virus
DENV	Dengue Virus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Envelope
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
ICTV	Catálogo Internacional de Taxonomia Viral
IEC	Instituto Evandro Chagas
IgG	Imunoglobulina G
LaViTE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	Membrana
MS	Ministério da Saúde
OROV	Oropouche Virus
PNH	Primatas não-humanos
prM	Proteína precursora de Membrana
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Real Time Quantitative PCR
SAAB	Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas
SE	Semana Epidemiológica
SFV	<i>Semliki Forest</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SVS	Semana de Vigilância em Saúde
TE	Tampão de Eluição
WHO	World Health Organization
YFV	Yellow Fever Virus
ZIKV	Zika Virus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	ESTRUTURA E GENOMA – <i>ALPHAVIRUS</i> : CHIKV E MAYV ...	19
2.2	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA: VÍRUS CHIKUNGUNYA	21
2.3	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA: VÍRUS MAYARO	23
2.4	VETOR E TRANSMISSÃO: CHIKV E MAYV	25
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: CHIKV E MAYV	28
2.6	TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR CHIKV E MAYV	30
2.7	DIAGNÓSTICO	31
2.7.1	RT-qPCR para diagnóstico de arbovírus	32
3	JUSTIFICATIVA	36
4	PERGUNTA CONDUTORA	37
5	HIPÓTESE	38
6	OBJETIVOS	39
6.1	OBJETIVO GERAL	39
6.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	39
7	METODOLOGIA	40
7.1.	DESIGN DE INICIADORES E SONDA	40
7.2	PRODUÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO SINTÉTICO: CHIKV	41
7.3	PRODUÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO SINTÉTICO: MAYV	41
7.4	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL: MAYV	43
7.4.1	Transcrição in vitro (Promotor T7)	45
7.4.1.1	Digestão....	45
7.4.1.2	Purificação	45
7.4.1.3	Reação de Transcrição	45
7.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE REAÇÃO	46
7.5.1	Avaliação dos limites de detecção, quantificação e faixa dinâmica linear	47

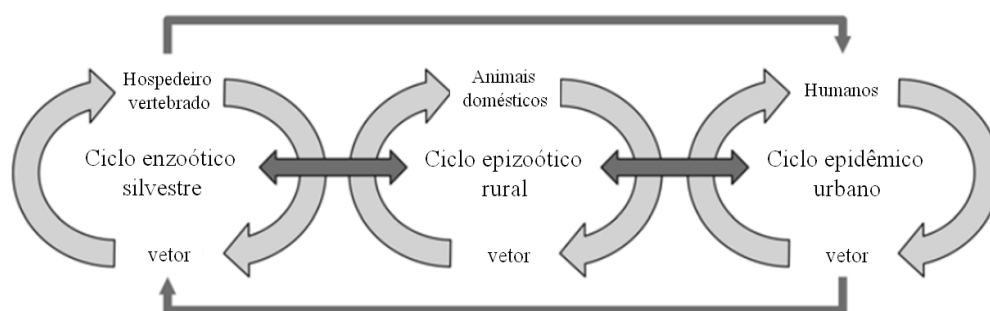
7.5.2	Curva Padrão	48
8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	50
9	RESULTADOS	51
9.1	DIGESTÃO PLASMIDIAL	51
9.2	TRANSCRIÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
9.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE REAÇÃO	52
9.3.1	Concentrações ideais de iniciadores – MAYV	52
9.3.2	Concentrações ideais de sondas – MAYV	53
9.3.3	Sensibilidade e especificidade analítica	54
9.3.3.1	Limite de Detecção	54
9.3.3.1.1	<i>chikv</i>	55
9.3.3.1.2	<i>mayv</i>	56
9.3.3.2	Curva Padrão	57
9.3.3.2.1	<i>chikv</i> – curva de amplificação (<i>amplification plot</i>)	57
9.3.3.2.2	<i>chikv</i> – curva padrão (<i>standard curve</i>)	58
9.3.3.2.3	<i>mayv</i> – curva de amplificação (<i>amplification plot</i>)	60
9.3.3.2.4	<i>mayv</i> – curva padrão (<i>standard curve</i>)	60
9.3.3.2.5	comparação: <i>singleplex x duplex (chikv e mayv)</i>	62
10	DISCUSSÃO	63
11	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O termo Arbovírus deriva da expressão “*arthropod-borne virus*”, introduzida em 1942 para descrever os vírus que são transmitidos e mantidos na natureza em um ciclo que envolve artrópodes hematófagos infectados e hospedeiros vertebrados suscetíveis (WHO, 1967). Possuem uma classificação taxonômica bastante diversificada, de acordo com o Catálogo Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), e são distribuídos em cinco famílias principais, levando em consideração as suas características físico-químicas: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae*. Cerca de 550 arbovírus encontram-se registrados atualmente no Catálogo Internacional de Arbovírus do CDC (*Center for Disease Control and prevention* – Centro de Controle e Prevenção de Doenças) (CDC, 2021). No Brasil, cerca de 220 espécies de arbovírus diferentes já foram isoladas e caracterizadas, onde, cerca de 40 delas causam doenças em humanos (FIQUEIREDO, 2007; MEDEIROS; VASCONCELOS, 2019).

Em geral, cada arbovírus possui vetor e hospedeiro específicos. No entanto, os mais ecléticos, para se manterem ativos, possuem diversos vetores e utilizam diversos hospedeiros vertebrados como reservatórios (MEDEIROS; VASCONCELOS, 2019). Os mamíferos e as aves são os vertebrados que tem o maior potencial para dispersão destes vírus, podendo facilitar a movimentação do patógeno de uma área de transmissão ativa para outro local. Esse movimento de dispersão também ocorre através de humanos e vetores infectados que se deslocam entre as regiões, países e continentes. Já os vetores, atuam como hospedeiros invertebrados e compreendem artrópodes como: mosquitos, flebotomíneos, carrapatos e culicídeos (YOUNG, 2018).

Figura 1 – Ciclo de manutenção dos arbovírus



Fonte: Adaptado de Young (2018).

A manutenção desses patógenos na natureza e a sua transmissão, depende de três elementos chave: o hospedeiro vertebrado, o vetor e as condições ambientais adequadas para a manutenção desse ciclo (YOUNG, 2018). O Brasil possui mais de um terço de seu território apresentando uma flora e fauna extremamente diversificada, o que fornece condições ideais para a existência de muitos arbovírus e uma variedade de ciclos zoonóticos (ciclo que envolve um vetor e um animal silvestre, como macacos e pássaros). Esses elementos associados ao crescimento populacional e a facilidade de tráfego entre as nações, ao processo de globalização e às mudanças climáticas contribuem para aumentar a prevalência do vetor e sua adaptação ao convívio junto ao ser humano, favorecendo a transmissão desses agentes infecciosos ao homem (FIGUEIREDO, 2007; LIMA-CAMARA, 2016). A grande diversidade de vetores e de hospedeiros contribuem para a evolução e adaptação dessas espécies e vem fazendo com que os arbovírus apresentem grande capacidade de manter o seu ciclo, em diferentes ecossistemas (silvestres, rurais e/ou urbanos), utilizando o homem como hospedeiro principal em seus ciclos de manutenção (FIGUEIREDO, 2007; LIMA-CAMARA, 2016; YOUNG, 2018). Com grande potencial de dispersão dos arbovírus, as infecções ocasionadas por estes, deixaram de ser doenças exclusivas da região amazônica, estando cada vez mais adaptadas às áreas urbanas. Tornaram-se um crescente problema de saúde pública no Brasil e no mundo, necessitando de uma vigilância eficiente de todos os agentes envolvidos no ciclo de transmissão desse vírus (DONALISIO, 2017).

Dentre os arbovírus de maior importância médica podem-se destacar os do gênero *Flavivirus*: vírus da Febre Amarela (VFA), vírus Dengue (DENV), vírus do Nilo Ocidental (WNV) e mais recentemente o vírus Zika (ZIKV). Estes arbovírus são responsáveis por causarem grandes epidemias em nível global, tornando-se preocupantes em diversos segmentos. Apresentam características reemergentes e a dificuldade em controlar o vetor, continua sendo um grande desafio a ser enfrentado (YOUNG, 2018).

O vírus da Febre Amarela foi o primeiro flavivirus a ser identificado como arbovírus (VASCONCELOS, 2003) e desde o seu surgimento causa frequentes surtos nas regiões em que predominantemente circulam. Apesar de atualmente a FA estar restrita à África e Américas, já foi uma doença endêmica em todo mundo, sendo responsável por aproximadamente 200 mil casos e 30 mil mortes anualmente

(MACIEL JR *et al.*, 2015). O VFA tem os mosquitos do gênero *Aedes* e *Haemagogus* como principais vetores e dois ciclos de manutenção: um ciclo silvestre [bastante complexo envolvendo primatas não-humano (PNH) (QUEIROZ *et al.*, 2021), várias espécies de mosquitos relacionadas à transmissão, que pode variar de acordo com a região onde ocorre, e um ciclo urbano simples (homem – mosquito / mosquito – homem) (VASCONCELOS, 2003). O vírus da Febre Amarela recebe este nome em virtude da icterícia que a infecção ocasiona em alguns pacientes (OPAS, 2021). A sintomatologia da doença pode variar de manifestações características também de outras infecções como febre aguda, dor de cabeça, náuseas, fadiga, até dores musculares intensas e formas mais graves como febre hemorrágica e acometimento de órgãos alvo como rins e fígado, provocando coloração amarelada na pele e olhos (icterícia). A letalidade da doença fica em torno de 5% a 10% nos casos mais leves, porém, pode chegar a 50% quando o paciente é acometido pelas formas mais graves (VASCONCELOS, 2003).

O vírus Dengue pertence a mesma família do VFA, a *Flaviviridae*, e é considerado o Flavivirus causador de doenças em humanos mais estudado atualmente, responsável por cerca de 400 milhões de infecções em todo o mundo (todos os anos), e por provocar novos surtos a cada 3 a 5 anos (FARES *et al.*, 2015; PIERSON; DIAMOND, 2020). Os primeiros registros de DENV no Brasil datam de 1845, após um surto da doença no estado do Rio de Janeiro. Quando o primeiro surto por DENV explodiu, o YFV já circulava no país, fato que tornou esses surtos ainda mais preocupantes, dada a similaridade dos sintomas provocados pelas infecções agudas e por serem transmitidos pelo mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. Levando isso em consideração, estratégias para erradicação do mosquito foram adotadas pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), afim de prevenir essas doenças. As iniciativas fizeram com que tanto as epidemias de Febre Amarela, quanto as epidemias de Dengue fossem contidas, e se mantivessem extintas até o final da década de 1970. Somente por volta do ano de 1981 novas epidemias de Dengue foram relatadas no estado de Roraima, confirmando a reintrodução do DENV no Brasil, desta vez, por mais de um sorotipo, simultaneamente (FARES *et al.*, 2015). Desde a sua reintrodução, o número de infecções por DENV tem crescido consideravelmente. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS, 2020), aproximadamente metade da população mundial está em risco de contrair a doença.

Existem 4 sorotipos distintos do DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e no Brasil há circulação de todos eles. Ao infectar-se com um sorotipo do vírus Dengue o indivíduo adquire imunidade permanente contra o mesmo, mas, continua suscetível a contrair os demais sorotipos, e, infecções subsequentes por sorotipos diferentes podem aumentar as chances de desenvolver a forma mais grave da doença (OPAS/OMS, 2020). A maior parte das infecções pelo DENV são assintomáticas ou subclínicas, já a forma sintomática pode incluir febre alta, dores de cabeça, náusea, vômito e exantema. A maioria dos indivíduos se recuperam após essa fase febril, enquanto outros evoluem para a forma mais grave que é caracterizada por síndrome do choque acompanhada de sangramento (PIERSON; DIAMOND, 2020).

Mais recentemente, houve a introdução no Brasil de mais um arbovírus, o vírus Zika. Apesar de ter sido isolado pela primeira vez em 1947 na África, a transmissão do ZIKV no Brasil iniciou em 2015 na região Nordeste, causando alerta devido as complicações neurológicas oriundas da infecção como Síndrome de Guillain-Barré e malformações do SNC nos fetos de gestantes infectadas, incluindo microcefalia (OPAS, 2016). Essas complicações neurológicas ocasionadas pela infecção por ZIKV foram descritas posteriormente como Síndrome Congênita do vírus Zika (SCZ) (COSTELLO *et al.*, 2016; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2018). De modo geral, 80% das infecções são assintomáticas e quando o indivíduo apresenta algum sintoma, estes, manifestam-se na maioria das vezes, de maneira leve como febre baixa, exantema, dores de cabeça, muscular e articulares, e conjuntivite. Ou seja, uma sintomatologia bastante semelhante a apresentada nas infecções por DENV. Um grande destaque sobre o ZIKV é a diversidade de formas de transmissão do patógeno, além da transmissão clássica desse tipo de vírus, que é através do mosquito vetor, foi comprovada a transmissão sexual e a transmissão vertical (materno-fetal), até então não registrada para outros arbovírus que causam doença em humanos (CDC, 2019).

Apesar de serem os *Flavivirus* os responsáveis pela maioria das epidemias de arbovírus, não se pode deixar de destacar a introdução do vírus Chikungunya no ano de 2014 e a epidemia ocasionada por ele, que tomou grandes proporções em 2016. Classificado como artralgênico, o CHIKV é conhecido por deixar o paciente bastante debilitado por causa da severa artralgia proveniente da infecção (MARQUES *et al.*, 2017). Apresenta um ciclo de transmissão predominantemente urbano e o mosquito *Aedes* como principal vetor. O vírus Chikungunya faz parte do mesmo complexo

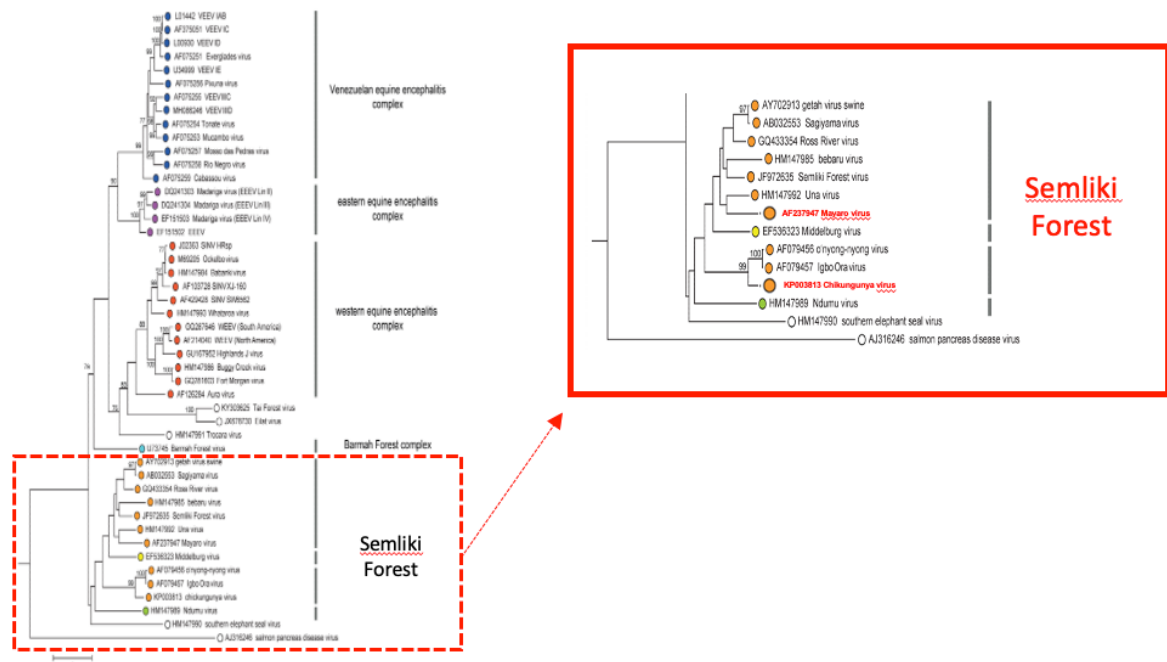
sorológico do vírus Mayaro, estes dois arbovírus pertencem a família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, e apresentam uma relação muito próxima tanto genética como clínica (SILVA; DERMODY, 2017). A infecção pelo MAYV também é responsável por severas artralguas, e apesar de ter um ciclo de transmissão originalmente rural com o mosquito *Culex* como vetor, já demonstrou potencial de transmissão urbana envolvendo o mosquito *Aedes* (MUNHÖZ; NAVARRO, 2012). Ainda não há relatos de grandes surtos do MAYV, mas na região amazônica os pequenos surtos são frequentes, tendo sido identificado também no centro-oeste e sudeste do Brasil (MS, 2016).

A estreita relação epidemiológica, genética e sorológica entre os arbovírus, pertencentes ao mesmo complexo antigênico, faz com que seja muito difícil distinguir essas infecções apenas clinicamente, como é o caso das infecções: CHIKV x MAYV. Desta forma, o diagnóstico laboratorial preciso é fundamental para a orientação do tratamento, assim como para otimizar os inquéritos epidemiológicos de cada doença. Atualmente, os kits de diagnóstico disponíveis no mercado não são capazes de diferenciar estes dois *Alphavirus*, sendo comum a observação de reações cruzadas entre essas infecções, o que pode estar levando a subnotificação e/ou notificação errônea das suas reais prevalências. O desenvolvimento e estabelecimento de um protocolo capaz de realizar o diagnóstico diferencial desses vírus, proposto neste trabalho, é, portanto, extremamente relevante para subsidiar inquéritos epidemiológicos e dar apoio aos sistemas de saúde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os vírus Chikungunya (CHIKV) e vírus Mayaro (MAYV) são arbovírus da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, no qual abrangem 29 membros que provocam doenças em humanos, roedores e equinos. De acordo com mecanismos como transcrição, taxa de mortalidade e apresentação da doença: CHIKV, MAYV, vírus Semliki Forest (SFV), vírus Sindbis (SINV), vírus Ross River (RRV), são conhecidos como artralgênicos; enquanto que vírus Encefalite Equina Venezuela (VEEV), vírus da Encefalite Equina Oeste (WEEV), vírus da Encefalite Equina Leste (EEEV), são conhecidos como encefalitogênicos (POWERS *et al.*, 2001).

Figura 2 – Filogenia dos *Alphavirus*



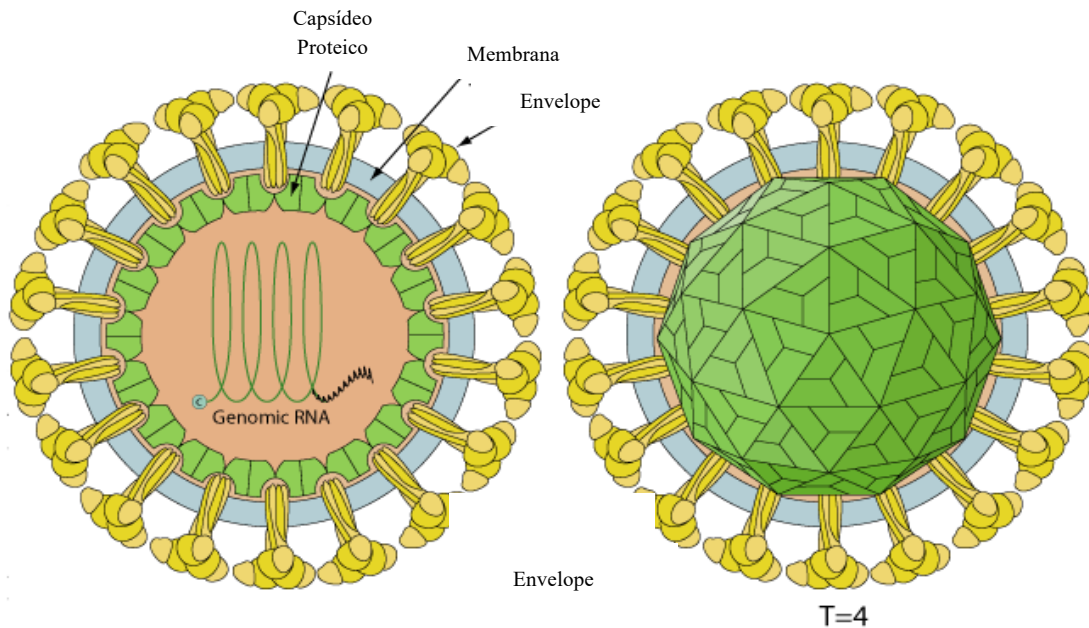
Nota: O CHIKV e o MAYV pertencem ao mesmo complexo sorológico e genético, complexo Semliki Forest, estando intimamente relacionados entre si.

Fonte: Adaptado de Munõz; Navarro (2012).

2.1 ESTRUTURA E GENOMA – ALPHAVIRUS: CHIKV E MAYV

Os *Alphavirus* são vírus envelopados, esféricos, medindo entre 60 a 70 nm de diâmetro. Possui capsídeo de simetria icosaédrica envolto por um envelope com cerca de 80 espículas na sua superfície (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

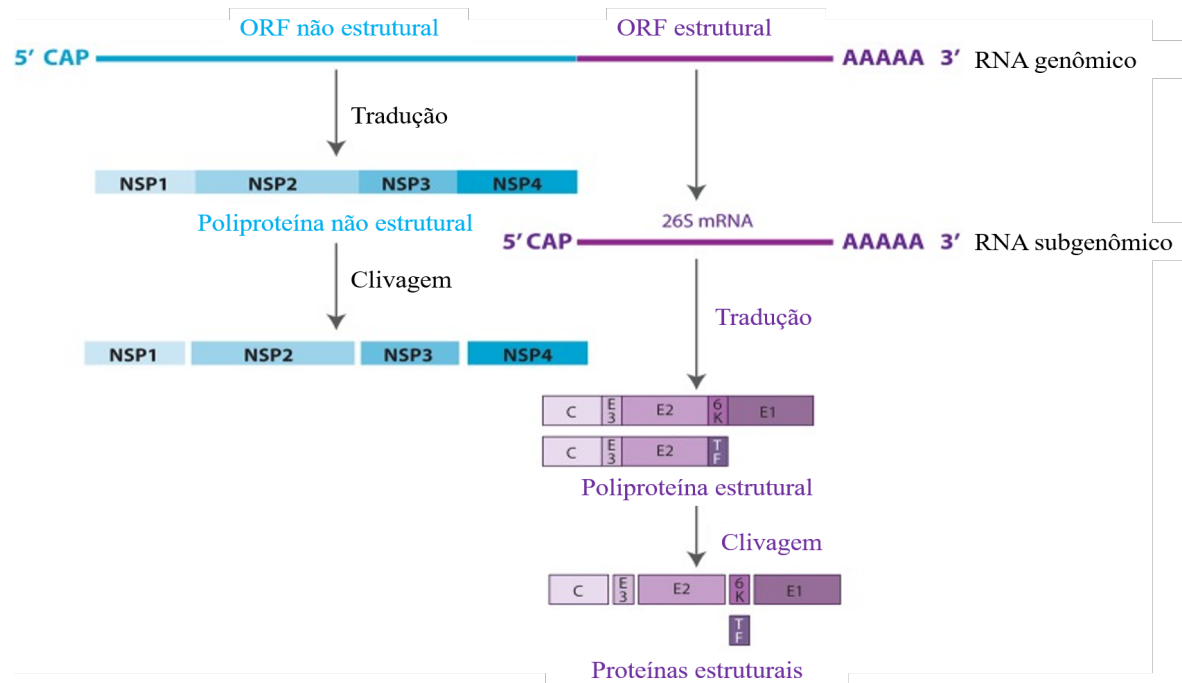
Figura 3 – Representação estrutural dos *Alphavirus*



Fonte: Adaptado de <https://viralzone.expasy.org/625>.

O genoma é de RNA fita simples, sentido positivo de aproximadamente 11.805 nucleotídeos, com uma extremidade *cap* 5' de 7-metilguanossina e uma cauda 3' poliadenilada e duas matrizes de leitura aberta (ORFs). A ORF 5' codifica uma poliproteína de quatro proteínas não-estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (STRAUSS; STRAUSS,1994). A nsP1 é responsável pelo ancoramento do complexo de replicação viral à membrana citoplasmática; a nsP2 está relacionada ao processamento de poliproteínas e atividade RNA helicase; a nsP3 compreende três domínios, um domínio macro N-terminal, um domínio central de ligação ao zinco e um domínio C-terminal hipervariável (HVD) e a nsP4 apresenta atividade de RNA-polimerase RNA-dependente (STRAUSS; STRAUSS,1994). Já a ORF 3', codifica uma poliproteína com cinco proteínas estruturais: capsídeo (C), glicoproteínas do envelope (E1, E2 e E3), proteína de 6 kDa (6K) e proteína *transframe* (TF). As proteínas estruturais formam a partícula viral e são expressas de forma tardia, a partir de um mRNA subgenômico, que é sintetizado durante a replicação viral. A proteína E2 medeia a ligação do vírus ao receptor de superfície celular, durante a entrada na célula hospedeira (STRAUSS; STRAUSS,1994).

Figura 4 – Organização genômica dos *Alphavirus Chikungunya* e *Mayaro*



Nota: Genoma composto por 4 proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4) e 5 proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K/TF).

Fonte: Adaptado de Acosta-Ampudia *et al.* (2018).

2.2 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA: VÍRUS CHIKUNGUNYA

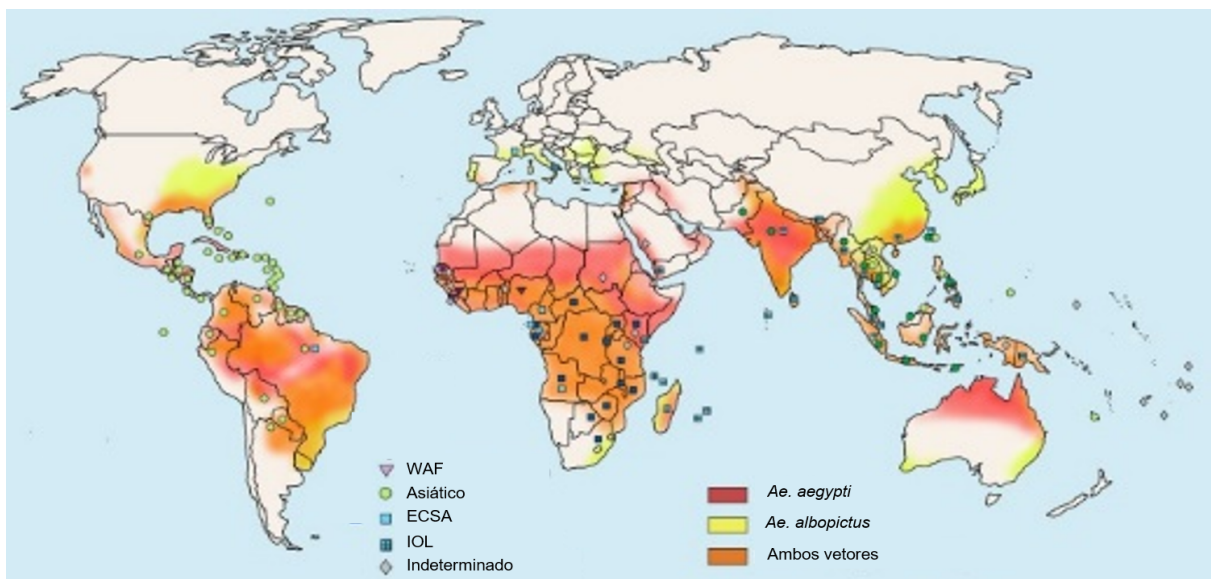
O nome "Chikungunya" deriva da língua maonde e significa literalmente "o que se dobra", descrevendo a aparência curvada dos pacientes acometidos com dor crônica nas articulações (ROBINSON, 1955). A Febre do Chikungunya é o nome que se dá a infecção ocasionada pelo CHIKV e foi descrita pela primeira vez em 1952, após o vírus ter sido isolado do soro de um paciente infectado durante um surto de doença com artralgia debilitante (SILVA; DERMODY, 2017), que se espalhou rapidamente em várias localidades ao sul da Tanzânia (ROBINSON, 1955; LUMSDEN, 1955). A partir de 2004, observou-se a emergência de CHIKV no Quênia (CHRETIEN *et al.*, 2007) e, conseqüentemente, disseminação de CHIKV pela África, Ásia, Ilhas do Oceano Pacífico e Índico (ROTH *et al.*, 2014) Europa (Itália e França) (MORO *et al.*, 2010; SIMON *et al.*, 2014). Nas Américas, a entrada do CHIKV ocorreu pelo Caribe, na Ilha de San Martin, em 2013 (CASSADOU *et al.*, 2014).

No Brasil, há relatos de casos importados de Febre de Chikungunya, desde 2010, entretanto, a confirmação de transmissão autóctone pelo Ministério da Saúde,

ocorreu em setembro 2014, com o registro quase que simultâneos de dois casos, um no Oiapoque, no estado do Amapá, seguido da ocorrência de CHIKV em Feira de Santana, Bahia (SVS/MS, 2015; NUNES *et al.*, 2015).

De acordo com a distribuição geográfica, o CHIKV é dividido em quatro genótipos e nomeados de acordo com a região em que foram identificados: o genótipo das regiões Central, Sul e Leste da África (*East-Central South African - ECSA*), o genótipo Asiático (*Asian genotype*), o da região Ocidental da África (*West African, WAF*), e o genótipo do Oceano Índico (*Indian Ocean Lineage, IOL*). Os genótipos ECSA e Asiático, são difundidos pelo mundo e responsáveis pelos isolados no Brasil: os isolados do Amapá (genótipo Asiático) e de Feira de Santana (genótipo ECSA) (NUNES *et al.*, 2015).

Figura 5 – Distribuição geográfica das epidemias de CHIKV e seus vetores

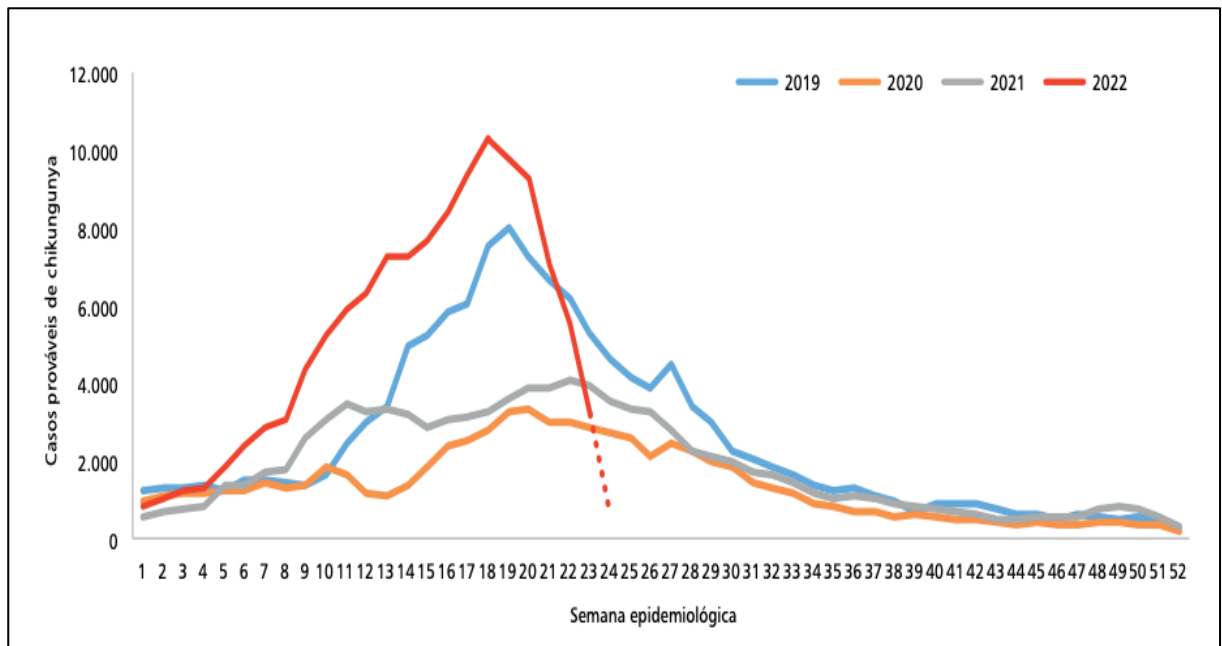


Fonte: Silva; Dermody (2017).

Em 2015, ano seguinte à introdução do CHIKV no Brasil, 13.236 casos foram confirmados, tendo um aumento considerável no número de casos nos anos seguintes (MARQUES *et al.*, 2017). O primeiro grande surto ocasionado pelo vírus Chikungunya ocorreu em 2016 na região Nordeste, neste mesmo ano, também houve uma explosão no número de infecções por DENV e ZIKV gerando ainda mais transtornos à população e serviços de saúde.

Até a Semana Epidemiológica 24 de 2022 (SE 24/2022), 122.075 casos prováveis de Chikungunya foram notificados, sendo 101.304 apenas na região Nordeste, onde há uma maior incidência (número de casos / 100 mil habitantes). Quanto aos óbitos, foram confirmados 23 óbitos decorrentes da infecção pelo CHIKV, e mais 50 estão sob investigação (MS, 2022).

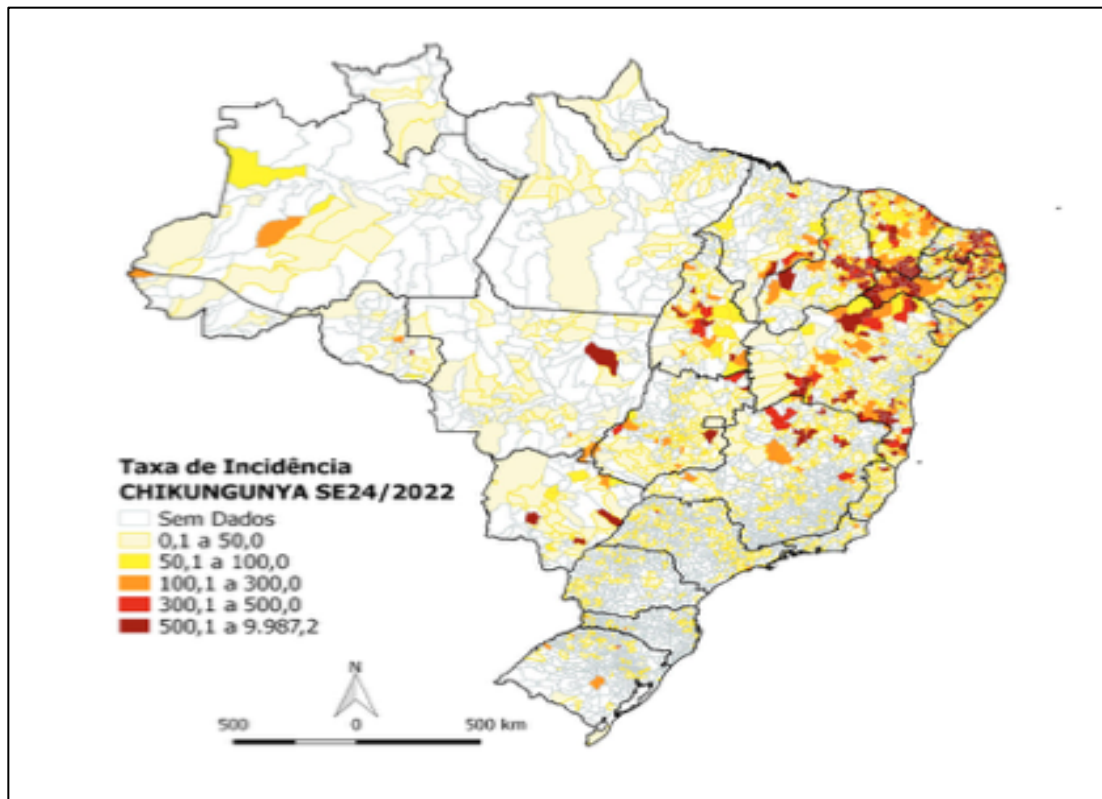
Figura 6 – Casos prováveis de Chikungunya de 2019 a 2022



Nota: No gráfico demonstrado é possível observar um aumento no número de casos prováveis de Chikungunya até a semana epidemiológica 24, quando comparado com o mesmo período nos anos de 2019, 2020 e 2021.

Fonte: SVS/MS (2022).

Figura 7 – Incidência de Chikungunya (nº de casos / 100 mil habitantes) por região em 2022



Fonte: SVS/MS (2022).

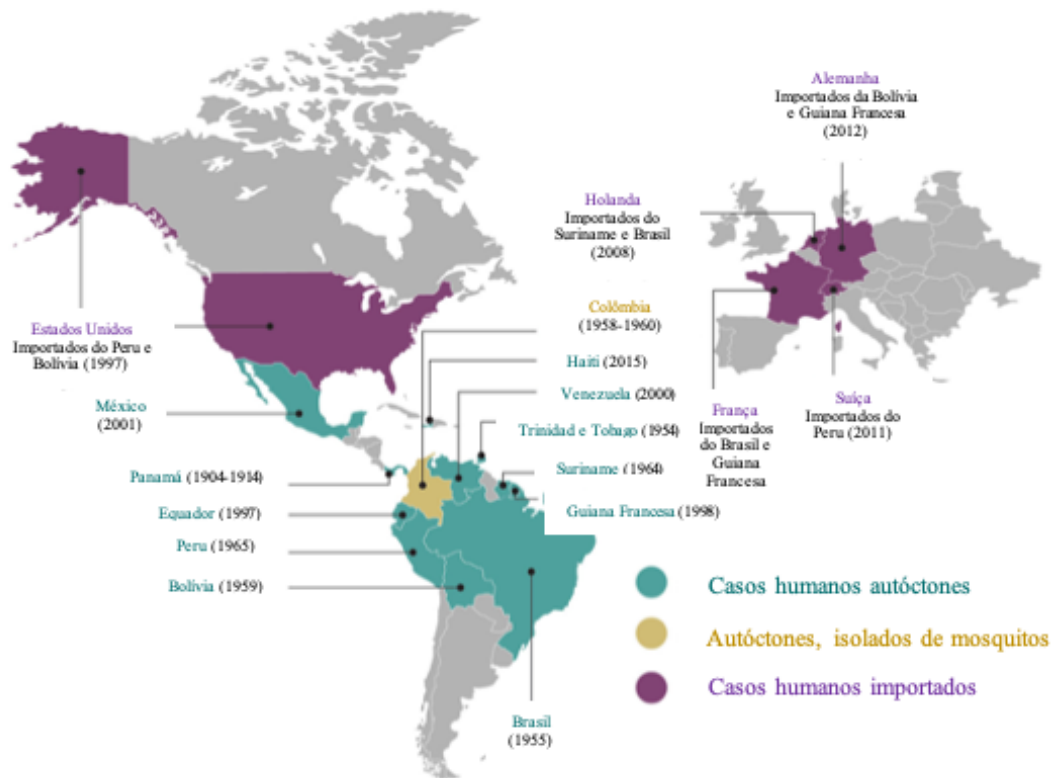
2.3 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA: VÍRUS MAYARO

O vírus Mayaro (MAYV) foi descrito pela primeira vez, em 1954, isolado de amostras de sangue de cinco casos humanos, em Trindade e Tobago (ANDERSON *et al.*, 1957). Desde então, MAYV foi identificado em países da América do Sul, América Central e Caribe (SCHAEFFER *et al.*, 1959; POWERS *et al.*, 2001; MOTA *et al.*, 2015), tendo destaque a ocorrência de 55 casos de Febre do Mayaro, em Belterra, no estado do Pará, entre os anos de 1978 e 1979 (LEDUC *et al.*, 1981; PINHEIRO *et al.*, 1981; POWERS *et al.*, 1981). No Pará, pequenos surtos de MAYV são registrados desde a sua introdução. O mais recente ocorreu em 2008 na Região Metropolitana de Belém (RMB), em um assentamento de trabalhadores rurais, próximo ao Parque Ecológico de Gunma no município de Santa Bárbara. Até a presente data, não havendo relatos de casos grave ou óbito por MAYV. (VASCONCELOS *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2009. No ano de 2021, 8 casos de Febre do Mayaro foram

confirmados no Estado do Pará, segundo dados da Secretaria de Estado de Saúde Pública (Sespa).

Os genótipos de MAYV apresentam proximidade filogenética com o vírus Una, sendo classificadas dentro do genótipo D (amplamente disperso - observado em Trindade e Tobago Brasil, Peru, Bolívia e Venezuela), genótipo L (limitado) encontrado no Haiti e Brasil, nos estados de São Paulo e Pará, e um terceiro genótipo menor, N (novo), referente a única sequência isolada do Peru em 2010 (MAVIAN *et al.*, 2017).

Figura 8 – Epidemiologia do vírus Mayaro no mundo



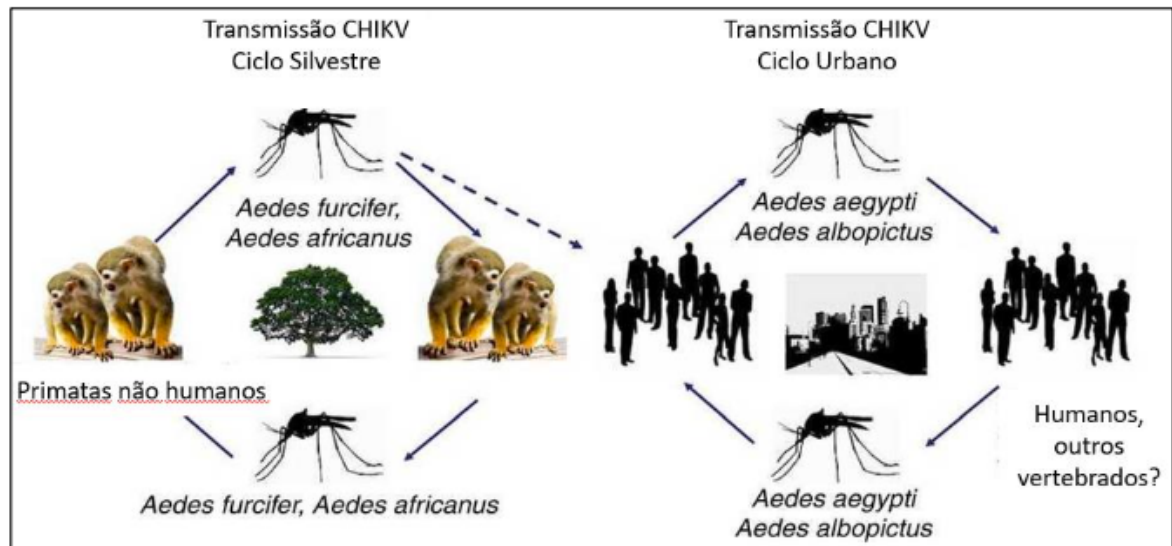
Fonte: Adaptado de Acosta-Ampudia *et al.* (2018).

2.4 VETOR E TRANSMISSÃO: CHIKV E MAYV

O CHIKV tem como principal vetor o mosquito *Aedes*, amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais (CDC, 2018). Em algumas regiões, como exemplo a África, apresenta mais de um ciclo de transmissão, como o ciclo enzoótico-rural, podendo apresentar também, primatas não-humanos como reservatório e outras espécies de mosquitos como vetores (*Aedes. Africanus* e *Aedes. Furcifer-taylor*)

porém, em países da Ásia e no Brasil, o ciclo de transmissão do vírus é predominantemente urbano e sua manutenção ocorre basicamente envolvendo a espécie *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, em um ciclo humano-mosquito-humano.

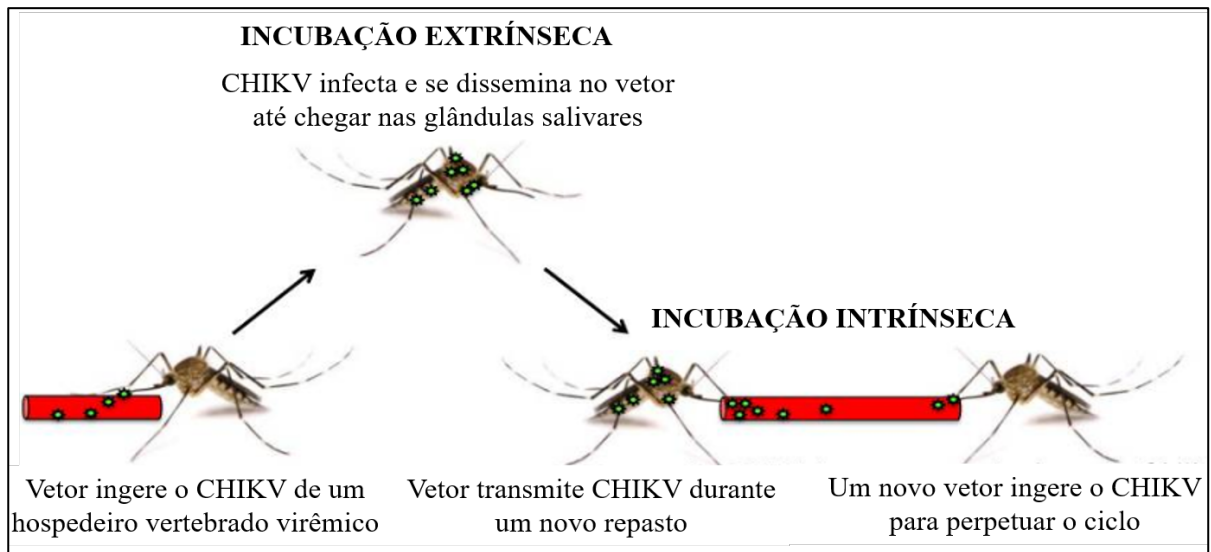
Figura 9 – Ciclo de transmissão CHIKV



Fonte: Adaptado de Madariaga; Ticona; Resurrecion (2016).

A principal forma de contaminação é através da picada do mosquito *Aedes* fêmea infectado. O ciclo de transmissão inicia quando o mosquito ingere o CHIKV de um hospedeiro infectado durante o repasto sanguíneo. A partir desse momento inicia o primeiro período de incubação (incubação extrínseca) que ocorre no vetor e dura em média 10 dias. O vírus infecta o intestino médio do vetor e se dissemina até infectar as glândulas salivares, podendo ser secretado na saliva. Durante nova alimentação do mosquito, o vírus é transmitido ao hospedeiro vertebrado através da saliva, dando início ao período de incubação intrínseca que ocorre no hospedeiro (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014). Alguns estudos mostram, mesmo que em raros casos (CDC, 2018), ser possível a transmissão materno-fetal durante o parto (SILVA; DERMODY, 2017).

Figura 10 – Ciclo de transmissão através de mosquito vetor

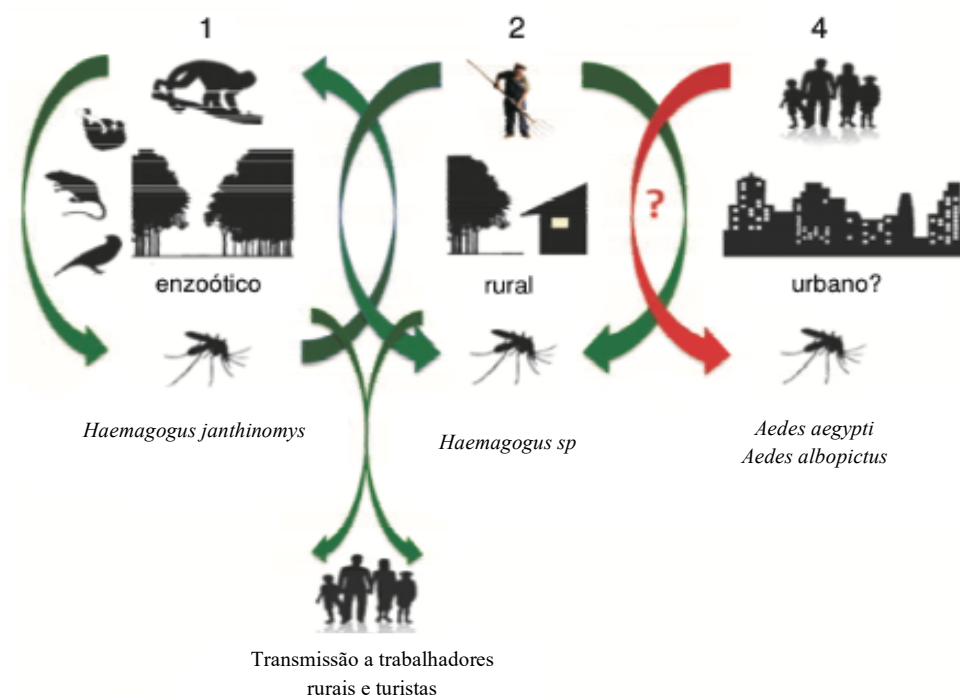


Fonte: Adaptado de Coffey; Failloux; Weaver (2014).

Já o MAYV, historicamente, é mantido na natureza num ciclo silvestre enzoótico envolvendo *Haemagogus janthinomys* e primatas não-humanos na floresta Amazônica do Brasil, Bolívia e Peru, bem como em áreas peri-urbanas e de florestas urbanas em centros de maior densidade populacional (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Uma grande característica dos mosquitos *Haemagogus* é que estes apresentam grande adaptabilidade alimentar e ambiental e possuem grande capacidade de vôo. Alguns estudos descobriram que estes vetores são capazes de percorrer quilômetros em busca de alimento, fato que demonstra a ampla área de atividade do mosquito, saindo da área silvestre e atingindo vilas rurais e aumentando a probabilidade de contato com humanos e animais domésticos (MUNHÖZ; NAVARRO, 2012).

Em áreas onde há baixa circulação de *Haemagogus* foi demonstrada a competência vetorial do *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus* em transmitir o vírus, levando a possibilidade de transmissão urbana. Os mosquitos do gênero *Aedes* são caracterizados por possuírem alto grau de antropofilia e por estarem dispersos em diversos países, responsáveis pela manutenção da transmissão urbana de vários arbovírus (MUNHÖZ; NAVARRO, 2012).

Figura 11 – Ciclo de transmissão MAYV



Fonte: Adaptado de Munhöz; Navarro, (2012).

Tanto a Febre Chikungunya (FCHIK), quanto a Febre do Mayaro (FMAY) tem características de doenças reemergentes, provocando surtos e epidemias de tempos em tempos, basta haver a circulação do vetor na região (NUNES *et al.*, 2015).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: CHIKV E MAYV

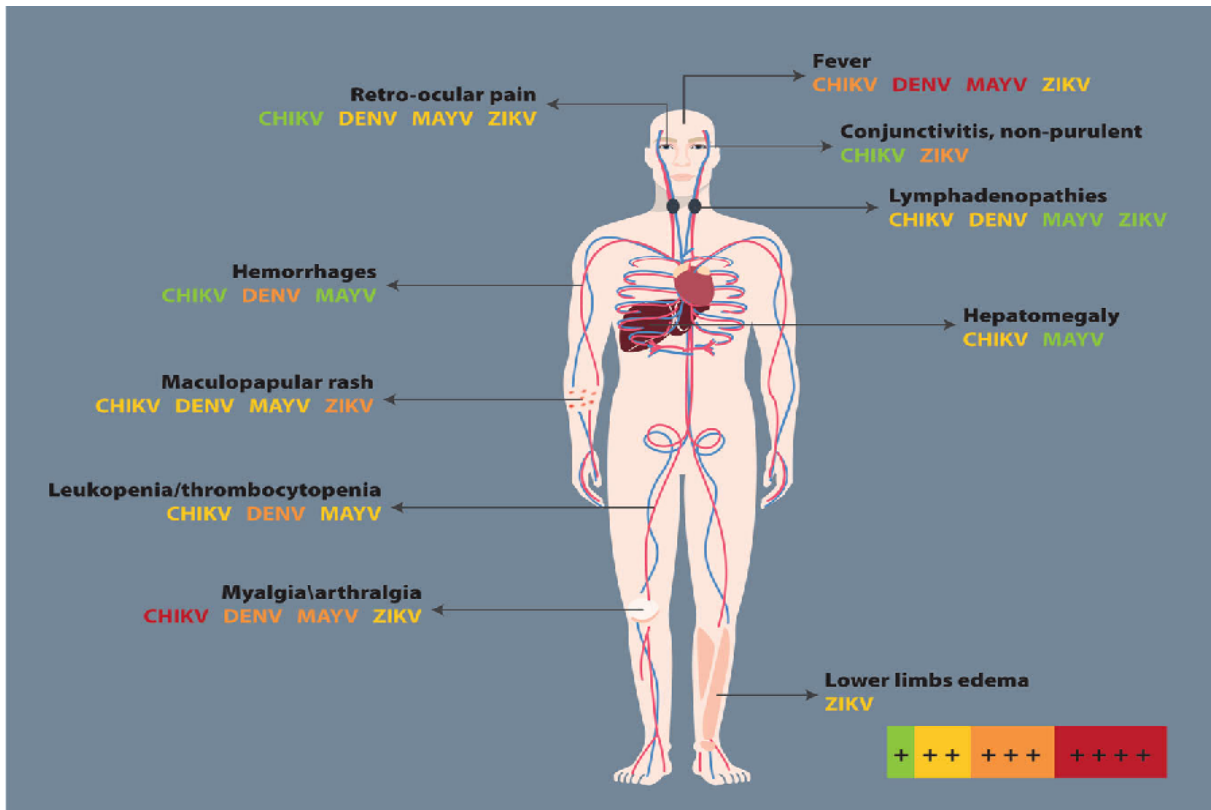
O período de incubação das duas infecções fica em torno de 3 a 7 dias (CDC, 2018). Na infecção pelo vírus Chikungunya, ao apresentar sintomas o paciente pode evoluir de 3 formas distintas: aguda, subaguda e crônica. A fase aguda da doença dura em média 7 a 14 dias e acomete entre 80 a 97% dos pacientes sintomáticos, nesta fase é comum o paciente apresentar febre alta ($>38^{\circ}\text{C}$) de início súbito, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema, náuseas, dor retro orbital, fotofobia e conjuntivite. Destes sintomas, a febre e a artralgia aparecem em quase 100% dos casos, mas a recuperação acontece dias após a infecção (MARQUES *et al.*, 2017; CDC, 2018). A fase subaguda é caracterizada pela persistência da artralgia em cerca de 50% dos pacientes, condição que dura em média 3 meses continuamente ou de forma

intermitente. Quando os sintomas perduram por mais de 3 meses já é considerada a fase crônica da doença, nesta fase a artralgia bastante debilitante acomete principalmente mãos, punhos, tornozelos e joelhos, geralmente de maneira simétrica, associados a rigidez matinal e edema articular. A recidiva das manifestações articulares é comum em 72% dos casos, podendo chegar a anos de duração (MARQUES *et al.*, 2017). Os casos graves e óbitos ocorrem com maior frequência em pacientes com comorbidades e faixa etária elevada (CALABRESE, 2008).

O MAYV pertence ao mesmo Complexo Sorológico e Antigênico do CHIKV e também apresenta características artralgênicas com potencial de cronificação. A infecção provocada pelo vírus Mayaro é conhecida como Febre do Mayaro e é acometida por severa e debilitante artralgia, sendo frequentemente confundida com a Febre Chikungunya (MARQUES *et al.*, 2017).

Em regiões onde há circulação de outros arbovírus, como DENV e ZIKV, é muito comum haver confusão no diagnóstico clínico, visto que os sintomas iniciais dessas infecções são bastante semelhantes (CDC, 2018). Mesmo a artralgia sendo mais evidente na Febre Chikungunya, não se pode descartar apenas clinicamente as outras infecções, mostrando-se necessário o diagnóstico diferencial, sobretudo para as áreas onde há risco de haver coinfeção durante as epidemias de arboviroses (MARQUES *et al.*, 2017).

Figura 12 – Principais manifestações clínicas das infecções ocasionadas pelos vírus CHIKV, MAYV, DENV e ZIKV



Nota: A intensidade dos sintomas está representada por diferentes cores – verde: baixa intensidade; amarelo: média intensidade; laranja: alta intensidade; vermelho: grave.
Fonte: Google Imagens.

2.6 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA INFECÇÃO POR CHIKV E MAYV

Ainda não há tratamento específico para estas arboviroses. O manejo clínico consiste em dar suporte ao paciente afim de amenizar os sintomas apresentados. Controle da dor, reidratação e repouso são algumas medidas adotadas principalmente nas infecções agudas, onde a clínica ainda é indistinguível, além do monitoramento constante para acompanhar a evolução da doença (SEJVAR *et al.*, 2014). É comum o uso de analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais para redução de febre associada a infecção e alívio das dores. Quando sintomas como artralgia e mialgia estão mais exacerbados, muitos pacientes lançam mão de fisioterapia moderada e tratamentos alternativos como acupuntura. Quando o paciente evolui para as formas graves, sobretudo as neuroinvasivas, é primordial um diagnóstico preciso para poder adotar a conduta adequada (SEJVAR *et al.*, 2014; CDC, 2019).

Diversos estudos estão sendo conduzidos em busca de uma vacina para prevenção ao CHIKV. Atualmente, encontra-se em fase 3 de testes clínicos, uma vacina de vírus vivo atenuado, desenvolvida pela Farmacêutica Valneva, com resultados promissores em testes de fase 1 e 2. Mas, até termos uma vacina segura e eficaz que previna ou amenize a infecção, a estratégia de combate mais eficiente engloba o controle de vetores e medidas de proteção pessoal, minimizando a exposição e fazendo uso de métodos de barreira como uso de repelentes e telas protetoras (MASCARENHAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

2.7 DIAGNÓSTICO

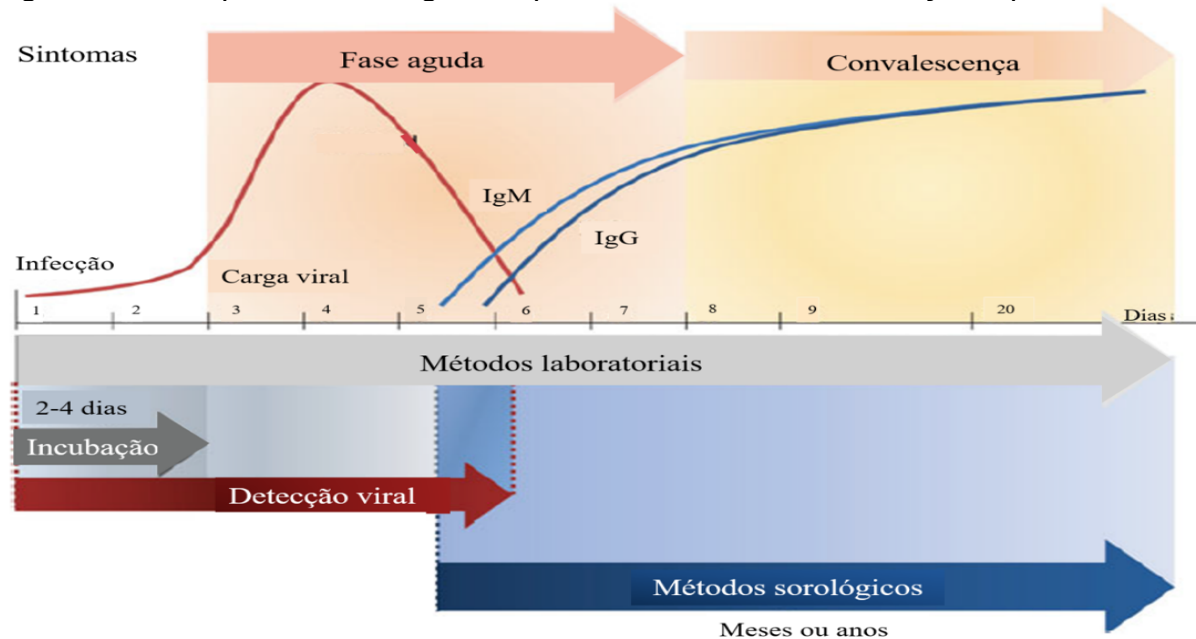
O diagnóstico clínico dessas infecções é um grande desafio, considerando a similaridade entre as manifestações clínicas de diversas arboviroses. Além dos sintomas apresentados, é importante saber da epidemiologia do agente etiológico, para se chegar a um diagnóstico preciso. Ainda assim, a maneira mais eficaz de diferenciar diversas infecções, principalmente quando há mais de um vírus circulando na região, é através de exames laboratoriais.

O diagnóstico laboratorial para esses *Alphavirus* (CHIKV e MAYV) de grande importância médica, têm procedimentos semelhantes. Nos primeiros cinco a sete dias após o início dos sintomas, período correspondente à fase virêmica, os testes envolvem o isolamento viral e a detecção de RNA viral através do diagnóstico molecular. Embora o isolamento viral seja bastante utilizado na pesquisa, não é uma técnica de rotina para diagnóstico nos laboratórios (SILVA *et al.*, 2018), sendo o diagnóstico molecular através da técnica de RT-qPCR a mais utilizada atualmente, devido a sua facilidade de execução, menor custo de reagentes e baixo risco de contaminação (CAGLIOTI *et al.*, 2013; MOTA *et al.*, 2015).

A técnica de RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real) é uma variação da PCR tradicional. Na RT-qPCR utilizam-se sondas fluorescentes que monitoram a amplificação do material genético durante toda a reação. É desse processo que se denomina de tempo real, visto que a amplificação e a quantificação ocorrem simultaneamente. É uma técnica rápida, específica e sensível que pode detectar mais de um patógeno em uma mesma reação (*multiplex qPCR*), basta haver diferentes corantes fluorescentes entre os reagentes (KUBISTA *et al.*, 2006).

Após o período de viremia, o diagnóstico consiste em detecção de anticorpos. Durante essa fase chamada convalescente, imunoglobulina M específicas são diagnosticadas pela técnica imunoenzimática de captura (MAC-ELISA), anticorpos totais detectados através da técnica de Inibição de Hemaglutinação (IH) e anticorpos neutralizantes que se mantém elevados por semanas após o início da doença, persistindo por meses. Uma vez que o CHIKV e MAYV pertencem ao mesmo grupo antigênico (Complexo Semiliki Florest), reações cruzadas podem ser observadas em testes sorológicos em pacientes que habitam regiões onde há a circulação de ambos os vírus. Nestes casos é indicado teste de neutralização para a diferenciação entre as espécies virais (AZEVEDO *et al.*, 2009; MOTA *et al.*, 2015).

Figura 13 – Resposta imunológica no período de viremia da doença e após a viremia



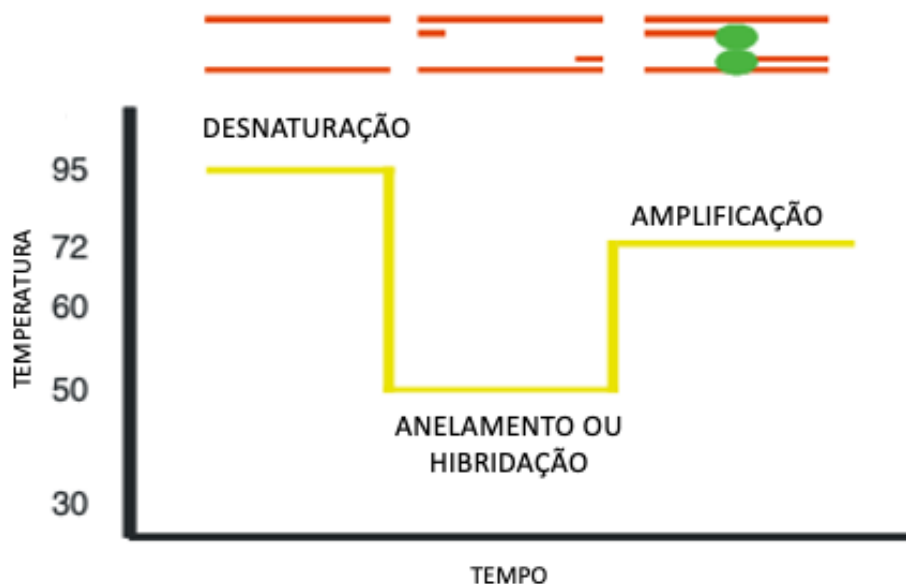
Fonte: Gaibani; Landini; Sambri, (2016).

2.7.1 RT-qPCR para diagnóstico de arbovírus

Os métodos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) são comumente utilizados em laboratórios clínicos e de pesquisa. Dentre as variações do método, a PCR convencional serviu como base para diversos outros e apesar de ser confiável e robusto, vem sendo substituído pelo RT-qPCR, que se tornou o método mais utilizado atualmente para diagnóstico (GULLETT; NOLTE, 2014).

A técnica consiste na transcrição reversa do RNA viral para uma molécula de DNA complementar (cDNA), submetida posteriormente a amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase). Esse processo inclui ciclos de diferentes temperaturas e acontece basicamente em três etapas: desnaturação (onde aplica-se alta temperatura para romper as pontes de hidrogênio e separar a dupla-fita de DNA), anelamento ou hibridação (etapa onde a temperatura é reduzida para que os primers se anelem) e amplificação (quando ocorre a amplificação e extensão propriamente dita). Essa etapa acontece com uma temperatura em torno de 72°C, ótima para o funcionamento da polimerase, embora muitos protocolos baseados em sondas *TaqMan* demonstrem um bom funcionamento da polimerase em temperaturas em torno de 60°C) (BROWN *et al.*, 1994; HAYASHI *et al.*, 2003; SANCHEZ-SECO *et al.*, 2006; KUBISTA *et al.*, 2006).

Figura 14 – Etapas da técnica de PCR

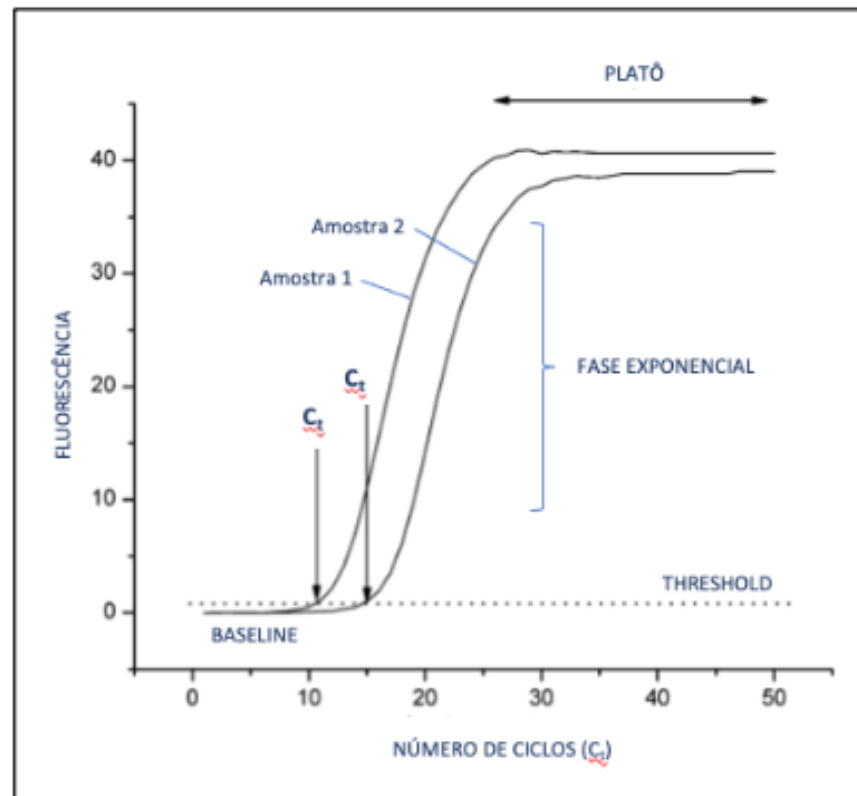


Fonte: Adaptado de Kubista *et al.* (2006).

O diferencial da técnica de RT-qPCR é a utilização de fluorescência para monitorar a amplificação do material genético em tempo real e quantificá-lo de forma automatizada (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Esse sinal fluorescente que é emitido decorre da utilização de sondas *TaqMan*®, marcadas com um fluoróforo na extremidade 5' e uma molécula sequestradora de fluorescência, *quencher*, na extremidade 3', o sinal é medido durante a fase exponencial de amplificação (BUSTIN

et al., 2009; GULLETT; NOLTE, 2014). A quantidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração do alvo na amostra original (GULLETT; NOLTE, 2014) e inversamente proporcional ao número de ciclos necessários para que a amostra atinja o limiar específico do sistema e seja considerada positiva. O número de ciclos necessários para atingir esse limite é chamado de C_t (*Cycle Threshold*). Desta forma, quanto maior a fluorescência emitida devido a alta concentração do alvo, menor será o número de ciclos necessários para o alvo ser detectado (menor será o C_t) (KUBISTA *et al.*, 2006).

Figura 15 - Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real



Nota: Baseline – corresponde à fase anterior a fase exponencial, onde a intensidade de sinal de produto amplificado ainda não ultrapassou a intensidade da fluorescência encontrada no meio linear; Fase exponencial – corresponde à fase de amplificação propriamente dita; Threshold – deve estar localizado na fase exponencial. É o nível arbitrário de fluorescência estabelecido acima do baseline; Platô – é a última fase, onde não há mais amplificação.

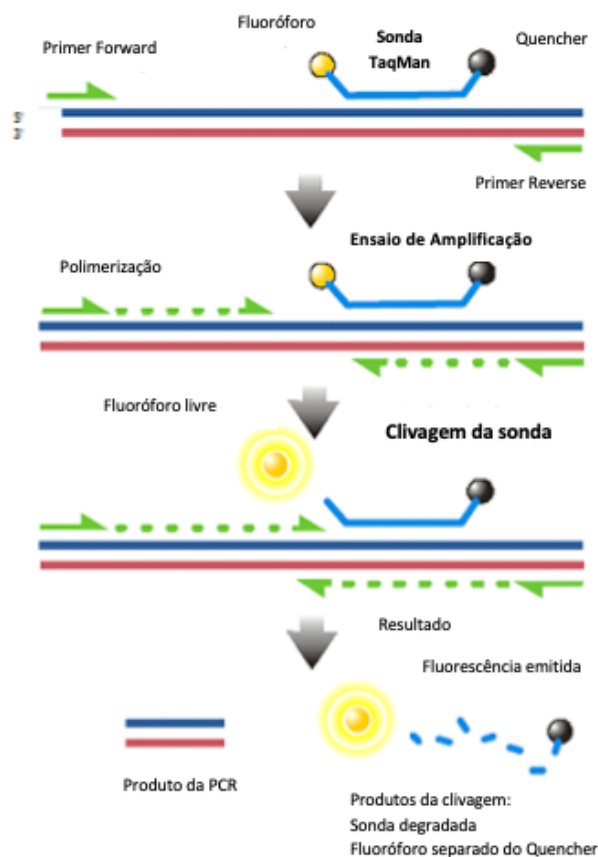
Fonte: Adaptado de Kubista *et al.* (2006).

A técnica de RT-qPCR e a utilização do sistema *TaqMan*® para diagnósticos, tornaram-se mais vantajosos devido principalmente a sua alta especificidade, rápida

geração de resultados, possibilidade de monitoramento contínuo do sinal fluorescente ao longo dos ciclos de amplificação (o que permite a análise dos dados durante todo o processo, não tendo mais necessidade de visualização do resultado posteriormente, através de eletroforese em gel de agarose no caso da PCR convencional), conversão do sinal fluorescente em valor numérico para cada amostra (quantificação da amostra), menor probabilidade de resultados falso-positivos, possibilidade de detecção simultânea de diferentes alvos em uma mesma reação (*multiplex*) e maior reprodutibilidade do ensaio (MACKAY; ARDEN; NITSCHEN, 2002; KLEIN, 2002).

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelo RT-qPCR, continua sendo essencial que os protocolos sejam verificados e atualizados constantemente quanto à sensibilidade e adequação as possíveis novas cepas de cada vírus. Esses vírus, por possuírem grande capacidade de adaptação, podem sofrer mutações nos alvos dos primers, dando origem a cepas emergentes que são indetectáveis para determinado ensaio, invalidando o protocolo (VÁZQUEZ *et al.*, 2016).

Figura 16 – Representação esquemática das sondas *TaqMan*



3 JUSTIFICATIVA

Após a introdução dos genótipos Asiático e ECSA do CHIKV no Brasil, a epidemia registrada em 2016 demonstrou um número considerável de casos graves e óbitos, sobretudo na região Nordeste do país, e um novo aumento no número de casos de CHIKV nesta mesma região vem sendo relatado atualmente. Por outro lado, o surto de Febre do Mayaro em Goiás em 2015 (MS, 2016) demonstrou capacidade de expansão do vírus em áreas mais populosas, afastado da região da floresta Amazônica, até ser identificada, em maio de 2019, por pesquisadores da UFRJ e USP, a circulação do MAYV na região sudeste (Notas publicadas em ufrj.br/noticia; saude.estadao.com.br). Sendo assim, dada a similaridade da sintomatologia da Febre do Mayaro com a Febre do Chikungunya é necessário realizar uma investigação epidemiológica na região Nordeste para o MAYV, bem como a implementação de teste de diagnóstico molecular capaz de diferenciá-los.

Frequentemente, a similaridade clínica e antigênica entre arbovírus pertencentes ao mesmo complexo sorológico compromete o diagnóstico devido a reações cruzadas, e infecções clínicas agudas são difíceis de serem distinguidas sem um diagnóstico diferencial preciso. Desta forma, abordagens moleculares continuam sendo ferramentas importantes para o monitoramento de arbovírus e inquéritos epidemiológicos, assim como a notificação e investigação desses eventos epizooticos tornam-se fundamentais para detecção desses vírus antes de surtos de grande magnitude (HEINEN *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2019).

Este projeto visa fortalecer o diagnóstico laboratorial desses arbovírus, através da parceria entre o Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) e a Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas (SAARB/IEC). Com base na expertise das referidas instituições, pretendemos estabelecer duas reações de RT-qPCR multiplex para a detecção diferencial do CHIKV x MAYV e contribuir diretamente com à Coordenação Geral de Laboratório (CGLab) da Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (SVS/MS) e com o SUS, disponibilizando o protocolo de RT-qPCR multiplex para o diagnóstico diferencial desses arbovírus no Sistema Único de Saúde (SUS).

4 PERGUNTA CONDUTORA

O estabelecimento de um protocolo de RT-qPCR multiplex capaz de diferenciar as infecções ativas por CHIKV x MAYV, poderia auxiliar no diagnóstico preciso desses agentes etiológicos nos serviços de saúde e dar subsídios para inquéritos epidemiológicos?

5 HIPÓTESE

O protocolo de RT- qPCR multiplex é capaz de diferenciar as infecções ativas por CHIKV e MAYV, mantendo o mesmo desempenho que os “singleplex”.

6 OBJETIVOS

6.1 GERAL

- Estabelecer uma reação de RT-qPCR multiplex para o diagnóstico diferencial dos *alphavirus* CHIKV e MAYV.

6.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar as condições ideais da reação RT-qPCR duplex para o diagnóstico simultâneo dos *alphavirus* CHIKV e MAYV;
- Determinar a faixa dinâmica linear de detecção, limite de detecção do ensaio e limite de quantificação do ensaio do protocolo de RT-qPCR duplex para CHIKV e MAYV (Sensibilidade Analítica);
- Verificar o desempenho da reação de RT-qPCR quanto a detecção de outros *alphavirus* (Especificidade Analítica);
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade clínica da reação de RT-qPCR multiplex.

7 METODOLOGIA

7.1 DESIGN DE INICIADORES E SONDA

Para o CHIKV foram utilizados iniciadores e sondas já estabelecidos em protocolo singleplex na rotina da SAARB/IEC, de acordo com referências descritas no quadro 01.

Já para MAYV o desenho de iniciadores e sondas foi realizado pelo grupo com base no alinhamento de sequências do genoma do vírus, utilizando o programa Geneious pro R11 v. 11.0.3, (Biomatters Ltda. Auckland, Nova Zelândia). Foi feita avaliação da região mais conservada do vírus e gerada uma sequência consenso. Esta sequência consenso foi utilizada como base para o desenho dos pares de iniciadores e da sonda, específicos, que serão utilizados na reação de RT-qPCR no formato TaqMan®. As sondas de MAYV foram marcadas com o fluoróforo HEX como *reporter* e o com o quencher duplo ZEN/IABkFQ. Os iniciadores e sonda foram desenhados utilizando uma versão modificada do programa Primer3 v. 2.3.7 (UNTERGASSER *et al.*, 2012) disponível no pacote do programa Geneious. Todos os iniciadores e sondas foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville IA EUA).

Quadro 1 – Iniciadores e sondas utilizados na RT-qPCR para CHIKV x MAYV

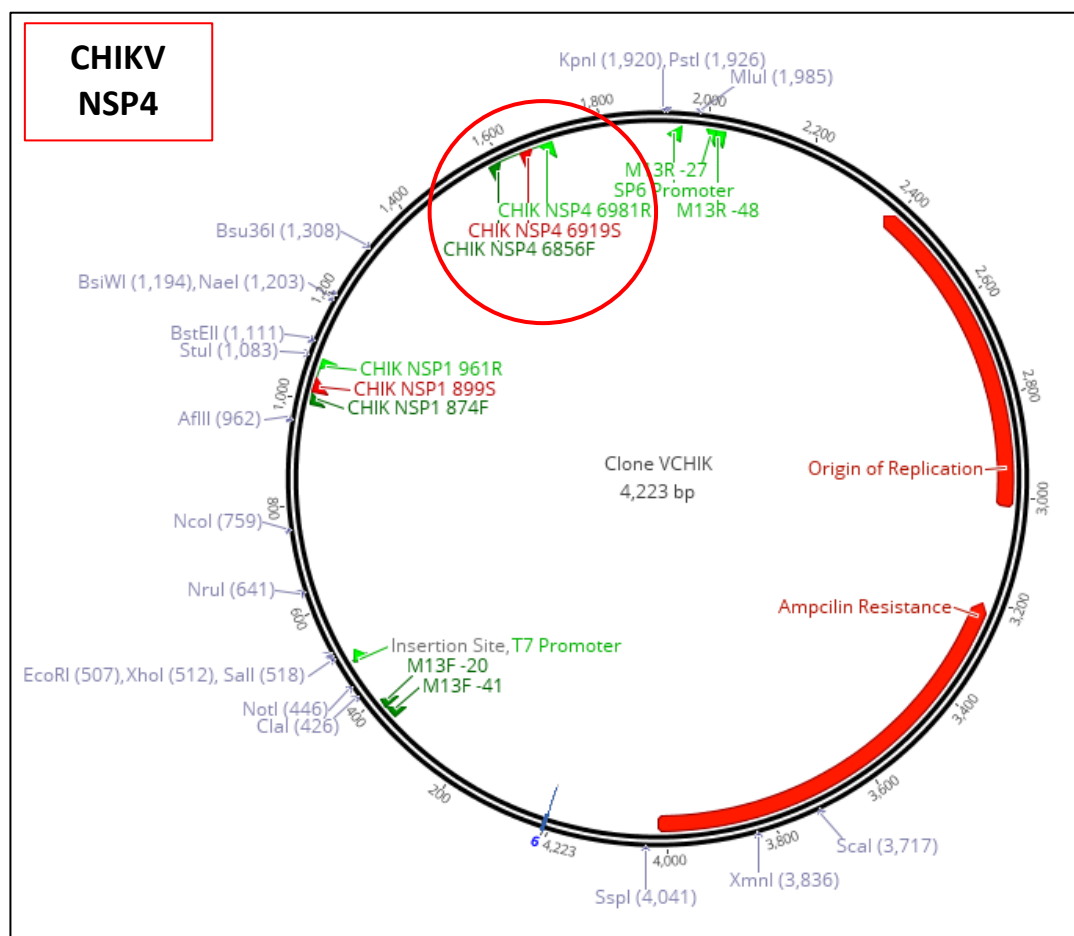
	Sequência	Posição	Referências
CHIKV 6856	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA	6856–6879	Lanciotti <i>et al.</i> , 2007.
CHIKV 6981	TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC	6981–6956	
CHIKV 6919-FAM	FAM -AGG TAC GCG /ZEN/ CTT CAA GTT CGG CG- IABkFQ	6919–6941	
MAYV NSP1 884F	CTG AAA GGA CGA CAA TCA TAT ACG TG	872-897	Desenhados para esse estudo.
MAYV NSP1 972R	CCT GGG CTC ATC GTT ATC TTC TT	938-960	
MAYV NSP1 945cP	HEX -ACG TAG CCC /ZEN/ TCA CAT GAC ACT ATT GTA TC- IABkFQ	905-933	

Fonte: A autora.

7.2 PRODUÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO SINTÉTICO: CHIKV

O plasmídeo contendo as sequências nucleotídicas correspondentes às regiões alvo dos iniciadores e sondas do vírus Chikungunya, de acordo com Lanciotti *et al.* (2007), foi comercialmente sintetizado pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville IA EUA) e já é utilizado em protocolos singleplex para diagnóstico de CHIKV, na rotina no laboratório de biologia molecular do IEC.

Figura 17 – Desenho do plasmídeo contendo as sequências de iniciadores e sondas do vírus Chikungunya



Nota: Plasmídeo sintetizado pela IDT, contendo a região NSP4 do alvo e as sequências de primers e sondas para o CHIKV.

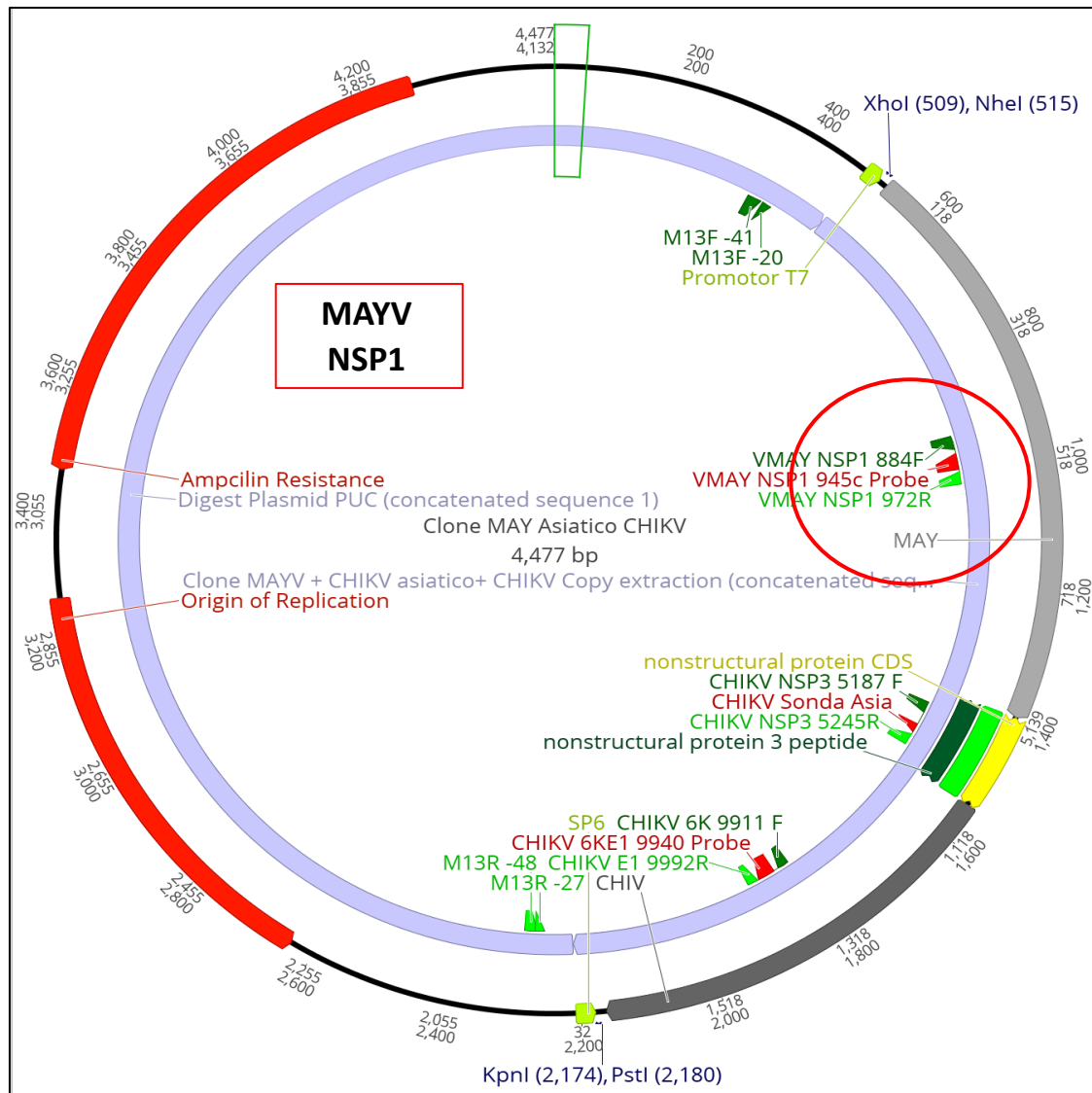
Fonte: Lanciotti *et al.* (2007).

7.3 PRODUÇÃO E CLONAGEM DO FRAGMENTO GÊNICO SINTÉTICO: MAYV

O plasmídeo contendo as sequências nucleotídicas correspondentes às regiões alvo dos iniciadores e sondas do vírus Mayaro para RT-qPCR, foi comercialmente

sintetizado pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville IA EUA), para ser utilizado na padronização deste protocolo.

Figura 18 – Desenho do plasmídeo contendo as seqüências de iniciadores e sondas do vírus Mayaro



Nota: Plasmídeo contendo a região NSP1 do alvo e as seqüências de primers e sondas para o MAYV.
Fonte: Desenhado pelo grupo de pesquisa.

Figura 19 – Apresentação linear do plasmídeo do vírus Mayaro

```

TCGCGCGTTCGGTGATGACGGTGA AAAACCTCTGACACATGCAGTCCCGGAGACGGTACACAGTGTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGC
GCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCCAAAATGCCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
AAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCCGGCCATCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG
GATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA AAACGACGCCAGTCAACCGGATGACGATGGATAGCGATTATCGA
TGAGCTGACCCGATCGCCGCCCGCGAGGGTTGCGTTTGAGACGGGCGACAGATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGACTCGAGGCTAGCTACATGCAGGACTCCA
GCAGAGGTGGCAGTCTATCAGGATGCTATGCAGTTCATGCACCAGCTTCCTTGTACTTCCAGGCGATGAAAGGAGTACGCACAGCGTACTGGATTGGGTTCCGACAC
TACCCCATTTATGTTTCGATACAATGGCCGGGGCTTATCCAACATATGCAACCAACTGGGCCGACGAACAGGTGCTGAAAGCCAGGAACATAGGACTATGCTCCGCGG
CACTGACTGAGGGACACCTTGGCAAGCTATCAATAATGAGGAAGAAGAGAATGAAACCGAGTGACCAGATAATGTTCTCGGTAGGCTCCACATTGTATACGGAAGC
CGACTCTGCTAAAGAGTTGGCATTACCGTCAGTGTCCATCTGAAAGGACGACAATCATACGTCGCGGTGATACAATAGTGTATGTGAGGGCTACGTTGT
TAAGAAAGATAACGATGAGCCAGGGTATTCGGAAAAACGTCAGGGTACGCCCTCACACATCACGCAAGAGGATTTCTGGTGTGTA AAACCACTGACACTATCGCAG
GAGAACGAGTTTCGTTCCCGTTTGCACGATGTGCCATCGACGATCTGTGACCAATGACAGGCATCCTGGCGACTGAGGTACGCCCGGAGGATGCGCAAAAATTG
CTGTGCGGATTA AACCAGAGGATCGTCGTAATGGGAGGACCAGAGAAAACATAATAACAATGAAGA ACTATCTGCTCCAGTGGTACTGCCCCTCCGTCAGAC
CTGGATGTGACGCCCCAGCC TAGAACCGCCCTAGACGACGGGGCGATAACATACGACCGGAAACCTTGC GGCCGTGTCTGACTGGGTAATGAGCACCGTACCAT
CGCGCGCCTAGAAAGAGGAGCTGCATTAGAACAGCTAAAGCGGCCACATACCAGGAGCCGCGGTATACCTGTGGAACGAGCAGCAGCCTTTATTTTGGATGCAA
GCCCTTATTCGCTGGCAGCCCTGATTGTCCTATGTA ACTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGTTGTA AAATGTTGACTTTTTTAGCCCTACTGAGCGCTCGGTGCCA
CACTGTGAGCGGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAACAGACCGGGCTACAGCCCCATGGTATTGGAGATGG
AGCTTCTGTCTGCACCTTGAACCAACGCTATCGCTTGATTACATACGTCGAGTATA AAACCGTTATCCCGTCTCCGTAAGTGTGCGGTACAGCAGAG
TGTAAGGACAAGAGCCTACCTGATTACAGCTGAAGGTCTTACC CGCGCTTACCATTATGTTGGGGCGGCGCTACTGCTTCTGCGACACCGAAAATACGCAATT
GAGCGAAGCACAGGTACCTGCAGTTGAGTATCTATAGTGCACCTAAATATCAGTTC TGACCAGCGAGCTGTGCTGCGACTCGTGGCGTAATCATGGTCATAGC
TGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCATAGTGA GTAGCTAACTCACATTA
ATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGGTTGCGTATTGGCGCTC
TTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTGCTGCGGTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGCAAGAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAC
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCGACAGGACTATAAAGATACCAGCGTTTCCCTTGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCGACCCCTGTC
GCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTFCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTGCTCCAGCTGG
GCTGTGTGCAGCAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGCTTGTAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGC
TCTGTGAAAGCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACACCAGCGTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGC
GCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGTCTGAGCTCAGTGGAAACGAAAACACTACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA
AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAATTAAGTATATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
ACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATAGTTGCTGACTCCCGCTGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCGCAGTGTGCAA
TGATACCGCAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATC
CAGTCTATTAATGTTGCGCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGGTT
TGATATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTAGTCTCCTCGGCTCCGATCGTTGTCA
GAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGGTACTCA
ACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCACCGAGTTGCTCTTGC CGCGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGA ACTTTAAAAGTGTCTATCAT
TGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACC GCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTT
TCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTACCTTTTCAATAT
TATTGAAGCATTTATCAGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCCGCACATTTCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGCTCAAGAAACCATTTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACAGGCCCTTTCGTC

```

Legenda: marcação em laranja – inserto do MAYV (corresponde a sequência consenso da região NSP1 do genoma MAYV, utilizada como base para desenho de primers e sondas); marcação em amarelo – enzimas de restrição NheI, utilizada na prova de digestão para liberação do inserto; marcação em vermelho – primer F; marcações em rosa – sonda marcada com o fluoróforo ZEN/IABkFQ como *quencher* duplo (rosa claro) e HEX como *reporter* (rosa escuro); marcação em azul – primer R; marcação em ciano – enzima KpnI, utilizada na prova de digestão para liberação do inserto e para linearização do plasmídeo.

Fonte: A autora.

Nota: programa ApE de edição de DNA.

As enzimas utilizadas foram selecionadas no momento em que o plasmídeo foi desenhado levando em consideração 3 critérios: 1 – disponibilidade na instituição; 2 – menor custo; 3 – não clivar o inserto, para não ocorrer perda no momento da transcrição.

O plasmídeo do MAYV foi então utilizado na transformação de bactérias quimiocompetentes para clonagem segundo protocolo estabelecido no Laboratório de Clonagem e Expressão de Proteínas (LCEP) da SAARB/IEC/MS. Um volume de 1 μ L de plasmídeo foi misturado a 50 μ L das células bacterianas *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Waltham MA EUA) e 25 μ L de tampão de transformação (cloreto de magnésio 5mM, tris-HCl 5mM, pH 7,4), mantidos em gelo por 30 min e, em seguida, submetido a choque térmico em banho-maria a 42°C por 20 segundos. Depois, as células foram semeadas em meio LB ágar com ampicilina (50 μ g/mL) e XGAL e incubadas em estufa microbiológica a 37°C por aproximadamente 24 horas. Após a incubação, quatro colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com ampicilina e incubadas novamente em estufa a 37°C sob agitação de 150 RPM por no máximo 16 horas, período após o qual foram submetidas ao procedimento de extração do DNA plasmidial.

O plasmídeo referente ao CHIKV, por já ser utilizado na rotina do laboratório, já havia sido preparado previamente (seguindo protocolos estabelecidos na instituição), e o transcrito já estava pronto para ser utilizado na etapa de padronização do protocolo duplex. Não houve necessidade de realizar as etapas de extração do DNA Plasmidial e Transcrição *in vitro* com o plasmídeo do CHIKV. As melhores concentrações de primers e sondas também já estavam definidas.

7.4 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL: MAYV

O DNA Plasmidial referente aos *Alphavirus* MAYV foi extraído com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. Quatro clones foram selecionados e o DNA plasmidial foi quantificado através do fluorímetro digital Qubit 4.0 (Invitrogen) com kit Qubit DNA BR Assay (Invitrogen).

Em seguida, para confirmar a presença do inserto, foi realizada digestão de aproximadamente 1 μ g de DNA plasmidial de cada clone utilizando 10U das enzimas de restrição NheI-HF e KpnI-HF (New England Biolabs, Ipswich MA EUA) para o MAYV. As reações foram incubadas a 37°C por 1h. Após a digestão, o tamanho dos fragmentos obtidos correspondente aos insertos foi visualizado em comparação com o padrão de peso molecular de 1 kb (New England Biolabs, Ipswich MA EUA), por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones que apresentaram tamanhos

de fragmentos de inserto de 1517pb (MAYV) foram selecionadas para a etapa de transcrição *in vitro*.

7.4.1 Transcrição *in vitro* (Promotor T7)

O plasmídeo foi então linearizado e submetido ao processo de transcrição *in vitro*, utilizando o kit Megascript T7 (Ambion). O produto da reação de transcrição foi purificado e concentrado com o auxílio do kit MegaClear (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante, depois quantificado utilizando o kit Qubit RNA BR Assay (Invitrogen) e analisado no fluorímetro digital Qubit 4.0 (Invitrogen) e posteriormente armazenado a -70°C até a sua utilização.

Foi selecionado para a transcrição o clone que possuía a concentração de DNA mais adequada.

7.4.1.1 Digestão

Para a utilização do fragmento gênico sintético, foi necessário transcrever o DNA em cópias de RNA de sentido positivo, para isso, o plasmídeo foi linearizado através de digestão enzimática. Foi utilizada a enzima de restrição KpnI-HF (New England Biolabs, Ipswich MA EUA), para abertura do plasmídeo na posição posterior ao inserto em relação ao promotor T7, segundo instruções do fabricante da enzima. As reações foram incubadas a 37°C por 1 hora.

7.4.1.2 Purificação

Os produtos da digestão foram purificados com 5 µl de EDTA a 0,5M, 10 µl Acetato de amônio a 5M e 200 µl de etanol absoluto e a reação foi incubada a -20°C por 15 minutos. O DNA foi peletizado através de centrifugação à velocidade máxima por 15 minutos a 4°C e ressuspenso em água livre de RNase e DNase.

As concentrações dos ácidos nucléicos obtidos foram quantificadas em ng/µL, no Qubit 4.0 utilizando o kit Qubit DNA BR Assay (Invitrogen) para DNA.

7.4.1.3 Reação de Transcrição

A transcrição do DNA para RNA sintético foi realizada com o kit Megascript kit Megascript T7 (Ambion), segundo recomendações do fabricante. A reação foi

submetida a incubação a 37°C por 2h. A partir de 1000 ng/ μ L de RNA sintético, os produtos da purificação foram tratados com DNase turbo disponível no kit por 15 minutos a 37°C.

O produto da reação de transcrição foi purificado e concentrado com o auxílio do kit *Megaclear* (Applied Biosystems), segundo instruções do fabricante e armazenado a -70°C para as etapas de padronização da RT-qPCR.

7.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE REAÇÃO

O RNA transcrito *in vitro* do MAYV foi utilizado para otimizar as melhores concentrações de primers e sondas para o protocolo duplex. Foi utilizado o programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e os seguintes parâmetros de ciclagem: 50°C por 30min para transcrição reversa, 95°C por 2min para desnaturação inicial, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min, reação de 25 μ L em ensaio triplicata.

Primeiro foi realizada a preparação dos primers e sondas. Foram eluidos com tampão salino Tris-EDTA (TE) de acordo com recomendações do fabricante. O Primer Forward sintetizado em uma concentração de 62.4nM foi eluido em 624 μ L de TE, o Primer Reverse de 92.6nM eluido em 926 μ L de TE e a Sonda de 14.5nM eluida em 145 μ L TE. Após a eluição, foram agitados em vórtex e incubados na geladeira por 1h antes de realizar as diluições necessárias.

Para padronização da melhor concentração de primers para o MAYV, foi utilizada a sonda na concentração de 250nM, concentração já utilizada na rotina da instituição. Para essa padronização foram utilizadas 4 concentrações de uso já estabelecidas no protocolo do Laboratório de Biologia Molecular da SAARB/IEC: 10 μ M, 25 μ M, 35 μ M e 50 μ M, diluídas para chegarem as respectivas concentrações finais: 200nM, 500nM, 700nM e 1000nM, que foram utilizadas na padronização. Posteriormente foi selecionada a concentração que obteve o menor valor de Ct e maior ΔR_n , além de não apresentar amplificação nos controles negativos.

O primer selecionado por apresentar a concentração com o melhor desempenho, foi utilizado na placa de diluição das sondas. A placa foi montada seguindo o mesmo padrão: 4 concentrações de uso já estabelecidas no protocolo do

Laboratório de Biologia Molecular da SAARB/IEC: 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M e 12,5 μ M, diluídas para as concentrações finais de 100nM, 150nM, 200nM e 250nM, respectivamente.

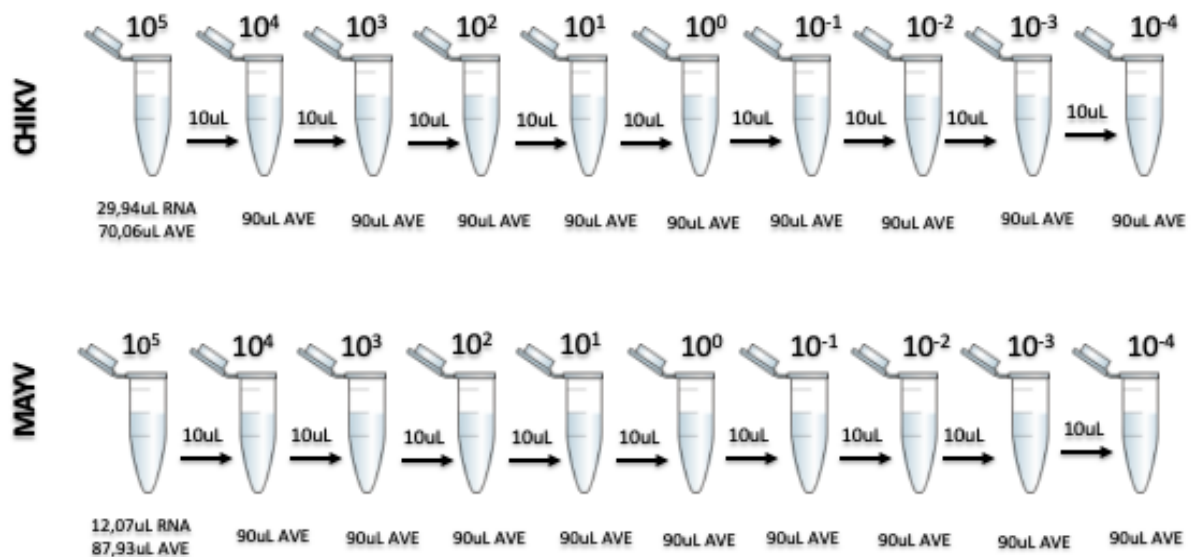
7.5.1 Avaliação dos limites de detecção, quantificação e faixa dinâmica linear

A partir desta etapa, os dois alvos (CHIKV e MAYV) passaram a ser analisados juntos. Foram feitas as avaliações do limite de detecção (LD) do protocolo de RT-qPCR duplex, utilizando o RNA proveniente de cultivo de células vero, dos dois alvos. A extração dos RNAs foi realizada com o kit de Extração de RNA viral QIAamp Kit, a partir de 140 μ L da amostra de cada alvo, seguindo recomendações do fabricante e de acordo com POP de cultivo de células da SAARB/IEC/MS, rendendo 6 alíquotas de 30 μ L para o CHIKV e 6 alíquotas de 30 μ L para o MAYV. Após extração, uma alíquota de 30 μ L de cada alvo foi quantificada por PCR Digital. As outras alíquotas foram armazenadas a -70°C até o uso.

Para estabelecer o limite de detecção do protocolo, foram realizadas diluições seriadas, na base 10, com concentrações variando de 10⁵ até 10⁻⁴. Foi utilizado o volume de 29,94 μ L do RNA já quantificado do CHIKV, para uma reação de 100 μ L, para a partir disso serem realizadas as diluições. Para o MAYV, foi utilizado 12,07 μ L do RNA, também para uma reação de 100 μ L, como demonstrado na figura 19.

A construção da placa para a curva de limite de detecção foi realizada com 10 pontos e 8 replicatas, utilizando 5 μ L de cada diluição. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e os seguintes parâmetros de ciclagem: 50°C por 30min para transcrição reversa, 95°C por 2min para desnaturação inicial, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min, reação de 25 μ L.

Figura 20 – Diluições para avaliação do limite de detecção do protocolo duplex de RT-qPCR



Fonte: A autora.

A menor concentração de RNA viral (em cópias/ μ L) em que o protocolo foi capaz de detectar com confiabilidade estatística suficiente (IC=95%), foi definido como LD. O intervalo de diluições no qual ensaio apresentou os melhores valores de R^2 e de eficiência, foi definido como faixa dinâmica linear (FDL) e a última diluição da FDL definido como o limite de quantificação (LQ).

7.5.2 Curva Padrão

Para avaliar a eficiência do protocolo, coeficiente de linearidade (R^2) e *slope*, foi construída uma curva padrão para cada alvo, utilizando os RNAs transcritos e quantificados no Qubit 4.0 utilizando o kit Qubit RNA BR Assay (Invitrogen). Após quantificação, onde o valor é dado a massa em ng/ μ L, foi realizada a conversão para cópias/ μ L com o auxílio do NEBioCalculator.neb.com (New England BioLabs - versão 1.15.0), utilizando a massa e o tamanho do fragmento de cada alvo.

As curvas foram construídas através de diluições seriadas de fator 10, variando entre 10^9 e 10^0 cópias de RNA/ μ L. Foi utilizado 0,2 μ L do transcrito do CHIKV em 199,8 μ L de AVE e 3 μ L do transcrito do MAYV em 197 μ L de AVE. O volume de 5 μ L

dessas diluições foram aplicadas na reação em ensaio duplicata de RT-qPCR, onde o volume final foi de 25 μ L.

A Faixa Dinâmica Linear (FDL), que corresponde ao intervalo onde o protocolo obteve melhor eficiência, está representada no gráfico de amplificação de cada alvo. Para cada diluição apresentada, um Ct e a concentração em moléculas de RNA estão descritos. As concentrações ótimas de primers e sondas padronizadas anteriormente para o vírus Mayaro foram utilizadas. Para o vírus Chikungunya foram utilizadas as concentrações de primers e sondas estabelecidas no Laboratório de Biologia Molecular da Seção de Arbovirologia do Instituto Evandro Chagas – IEC/PA.

Como parâmetro para avaliação do duplex do CHIKV, foi utilizado o protocolo singleplex do CHIKV, estabelecido na rotina da SAARB/IEC, já para avaliar o duplex do MAYV, foi comparado com o próprio protocolo testado no formato singleplex para MAYV.

As curvas padrão realizadas, tiveram por objetivo realizar uma comparação entre o ensaio de CHIKV singleplex e o ensaio de CHIKV duplex, assim como, comparar o ensaio de MAYV singleplex e o ensaio de MAYV duplex. Foram analisados os parâmetros de Ct, R², eficiência, faixa dinâmica linear, limite de detecção e limite de quantificação, parâmetros que são utilizados para medir a eficácia de protocolos estabelecidos para diagnóstico. Para a comparação ser efetiva, foi selecionada uma faixa dinâmica linear (FDL) que fosse comum aos dois ensaios.

8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

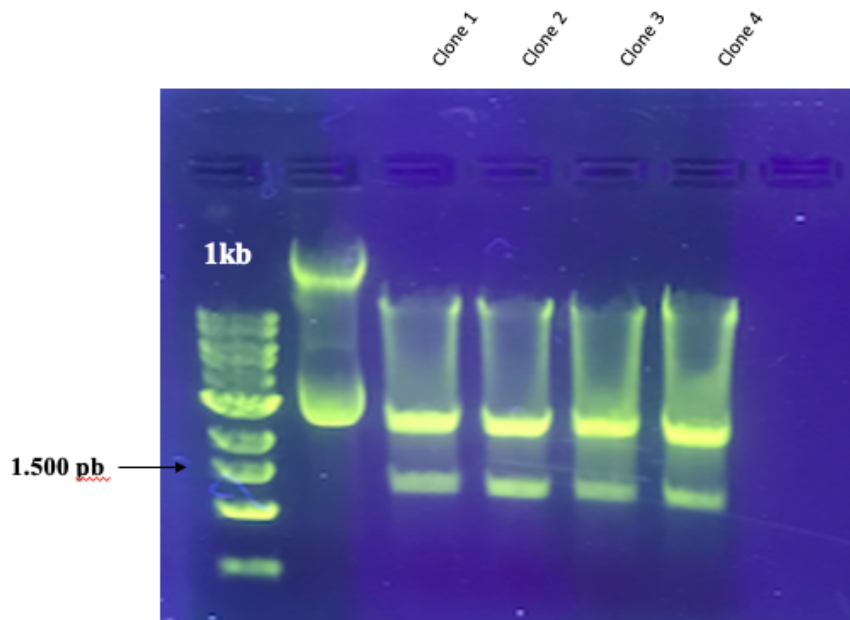
Todas as etapas do projeto foram realizadas através de manipulação de clone sintético e extração de RNA *in vitro*. Não houve manipulação de amostras biológicas, portanto, não foi necessário aprovação ética.

9 RESULTADOS

9.1. DIGESTÃO PLASMIDIAL

Foi realizada digestão plasmidial de 4 clones do MAYV, utilizando as enzimas *NheI* - HF e *KpnI* - HF, e os fragmentos foram comparados com o padrão de peso molecular de 1kb. Os 4 clones apresentaram os tamanhos dos fragmentos esperados de 1517pb.

Figura 21 – Eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação do tamanho do inserto de MAYV, após digestão enzimática



Nota: Após digestão, os 4 selecionados apresentaram os tamanhos dos fragmentos esperados, 1517pb.

Fonte: A autora.

9.2 TRANSCRIÇÃO *IN VITRO*

Após digestão enzimática os 4 clones foram quantificados. O clone 4 do MAYV apresentou a concentração mais adequada e foi o clone selecionado para transcrição. Por apresentar a concentração mais próxima de 1000 ng/uL (necessária, de acordo com o protocolo de transcrição utilizado) não seria preciso realizar diluições para o uso.

Quadro 2 - Concentrações dos clones do MAYV após digestão enzimática

MAYV	
Clone 1	1.300 ng/uL
Clone 2	1.280 ng/uL
Clone 3	1.960 ng/uL
Clone 4	1.040 ng/uL

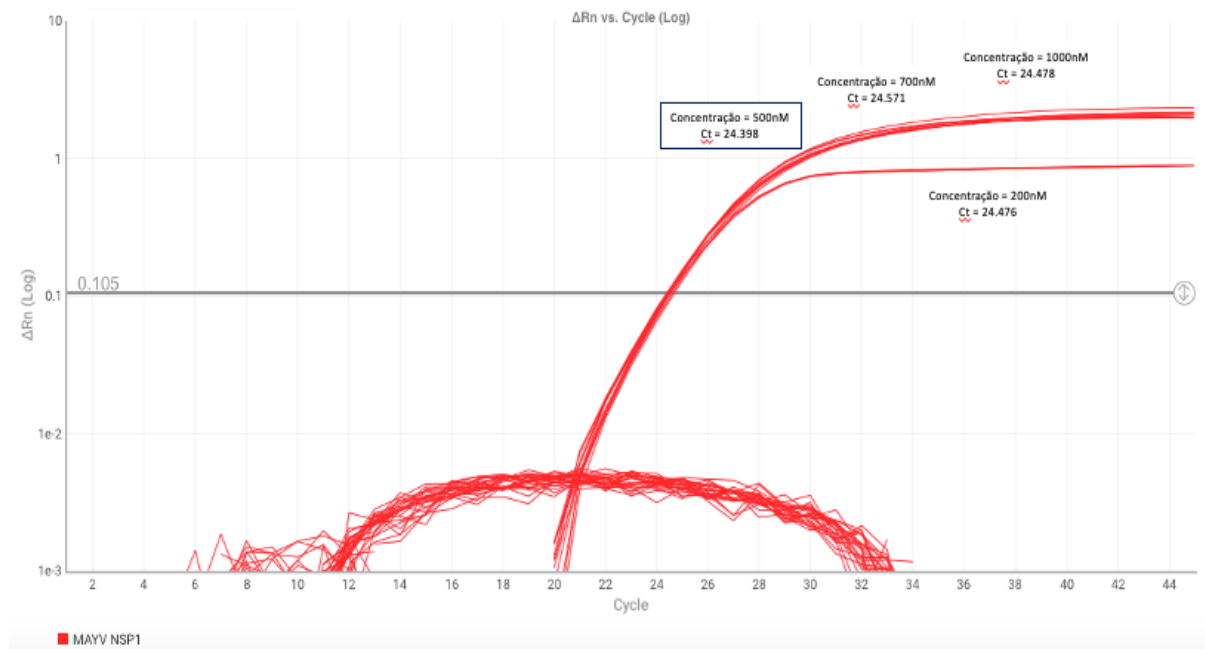
Fonte: A autora.

9.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DA REAÇÃO

9.3.1 Concentrações ideais de iniciadores – MAYV

A curva de amplificação para avaliar a melhor concentração de primers obteve desempenho semelhante em todas as concentrações utilizadas. Os valores de Ct ficaram bem próximos em todas as concentrações: 200nM = 24.476, 500nM = 24.398, 700nM = 24.571 e 1000nM = 24.478. Os primers de 500, 700 e 1000nM apresentaram valores mais altos de ΔRn , demonstrando superioridade quando comparadas com a concentração de 200nM. A concentração de escolha para a padronização do protocolo foi o primer de 500nM, visto que apresentou o menor valor de Ct, ΔRn elevado, além de não ter tido amplificação nos controles negativos. Também representa um menor custo, por ser menos concentrado quando comparado aos primers de 700nM e 1000nM.

Figura 22 – Gráfico de amplificação da padronização das condições ideais de iniciadores



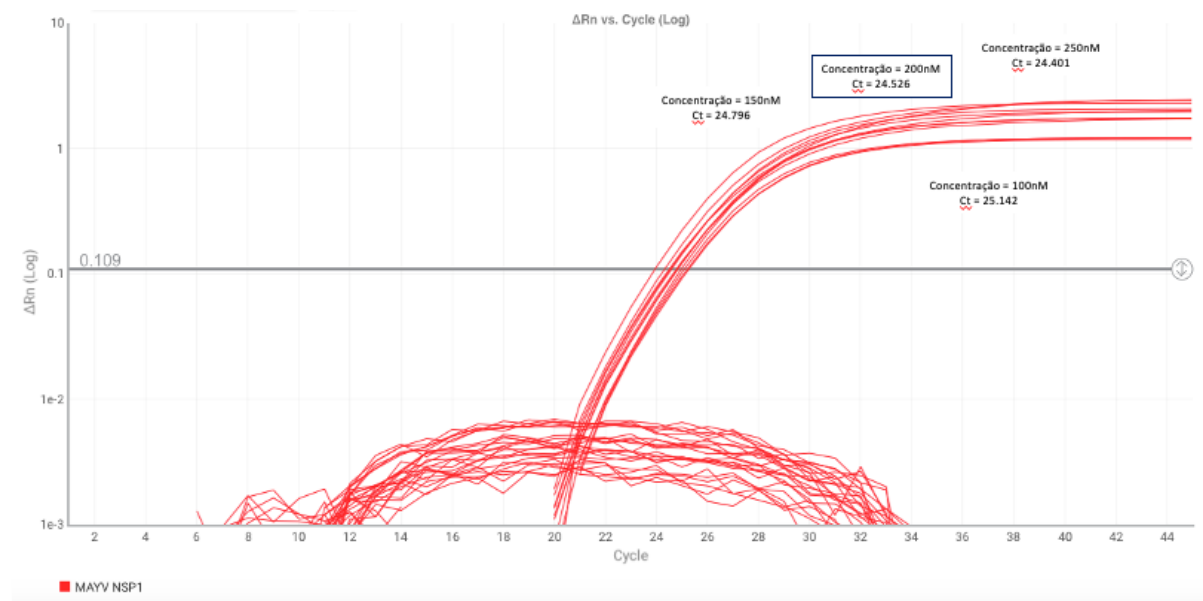
Nota: As concentrações de 500nM, 700nM e 1000nM apresentaram desempenho bem semelhantes. Em nenhuma concentração houve amplificação nos controles negativos. Foi escolhido o primer de 500nM por ter apresentado menor valor de Ct e maior ΔR_n , além do custo mais reduzido, por ser menos concentrado quando comparado ao primers de 700nM e 1000nM.

Fonte: A autora.

9.3.2 Concentrações ideais de sondas – MAYV

A curva de amplificação para avaliar a melhor concentração de sonda já foi realizada utilizando o primer de 500nM escolhido em etapa anterior. Todas as concentrações de sonda utilizadas apresentaram desempenho semelhantes, onde os valores de Ct ficaram bem próximos em todas as concentrações: 100nM = 25.142, 150nM = 24.796, 200nM = 24.526 e 250nM = 24.401. As concentrações de 150, 200 e 250nM apresentaram valores mais altos de ΔR_n , demonstrando superioridade quando comparadas com a concentração de 100nM. A concentração de escolha para a padronização do protocolo foi a sonda de 200nM, visto que apresentou baixo valor de Ct, ΔR_n elevado, além de não ter tido amplificação nos controles negativos. Também foi levado em consideração o fato de que 200nM é a concentração de escolha dos protocolos do laboratório de biologia molecular da SAARB/IEC, mantendo um “padrão” entre os protocolos desenvolvidos.

Figura 23 – Gráfico de amplificação da padronização das condições ideais de sondas



Nota: O valor de Ct foi semelhante para todas as concentrações de sondas. Foi selecionada a sonda de 200nM por ter apresentado um bom desempenho com alto ΔRn , além de ser a concentração de escolha dos protocolos da instituição SAARB/IEC. Não houve amplificação nos controles negativos em nenhuma das concentrações.

Fonte: A autora.

9.3.3 Sensibilidade e Especificidade Analítica

9.3.3.1 Limite de Detecção

Para avaliar o limite de detecção do protocolo duplex, foi utilizado RNA viral do CHIKV e RNA viral do MAYV, extraídos de cultura de células infectadas com o vírus. Após extração foram quantificados para poder realizar as diluições da placa de acordo com cada concentração (quadro 3). O limite de detecção do CHIKV e MAYV foram analisados individualmente.

Quadro 3 – Concentrações dos RNAs do CHIKV e MAYV, após quantificação por PCR Digital

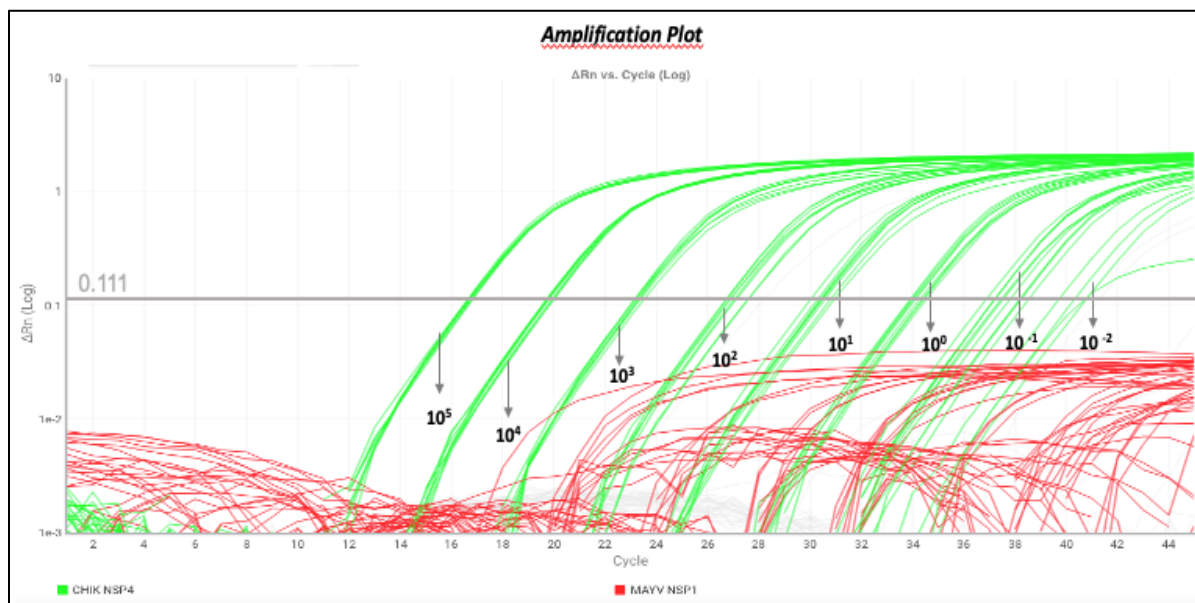
RNA CHIKV	RNA MAYV
$3,34 \times 10^5$ cópias de RNA/ μ L	$8,28 \times 10^5$ cópias de RNA/ μ L

Fonte: A autora.

9.3.3.1.1 *chikv*

Na curva padrão realizada para avaliar o limite de detecção e a sensibilidade do protocolo duplex na detecção do CHIKV, primeiro foi selecionado o intervalo onde o protocolo obteve melhor eficiência, intervalo que representa a faixa dinâmica linear do ensaio (FDL). A FDL está representada no gráfico de amplificação (*Amplification Plot*) pelo intervalo de 10^5 a 10^{-2} , com elevado ΔRn e uma variação de Ct de 16.6 a 38.1 (figura 22). O protocolo, nesse intervalo, demonstrou uma eficiência de 90%, *slope* de -3.577 e $R^2 = 0.967$ (figura 23), com capacidade de detectar em média 3 cópias de RNA/ μ L (Limite de Detecção – LD). Na concentração de 10^{-2} as amostras começam a negativar, sendo este fator de diluição considerado o Limite de Quantificação (LQ) do protocolo.

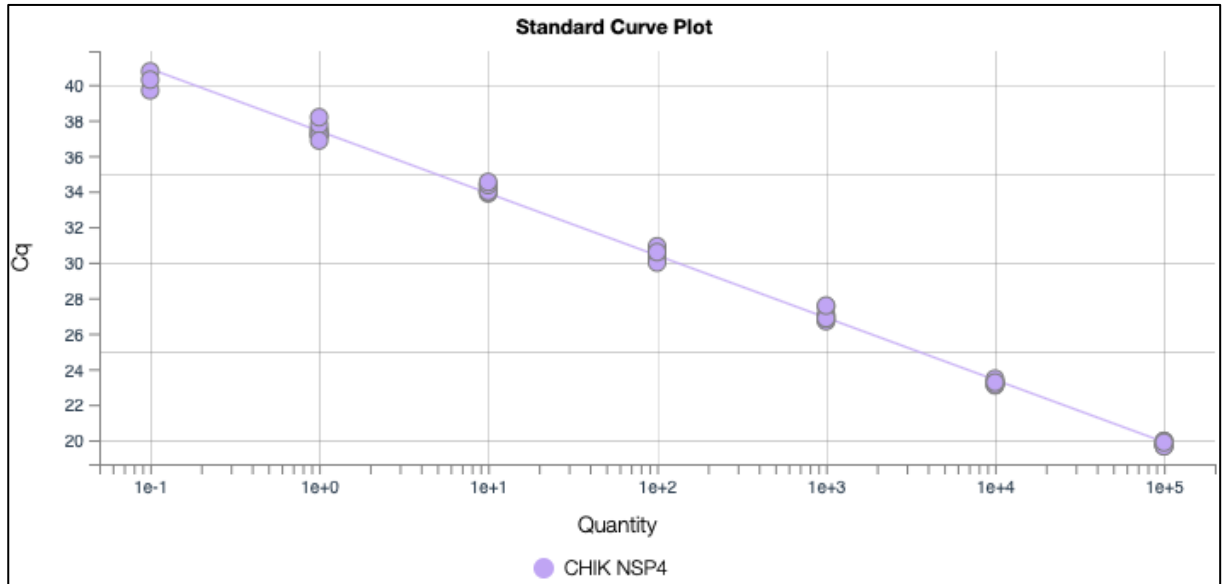
Figura 24 – Curva de Amplificação do limite de detecção do protocolo de RT-qPCR para vírus Chikungunya



Nota: Para avaliação do limite de detecção, foi considerado o intervalo de 10^5 a 10^{-2} , onde houve detecção do alvo em todas as replicatas, com boa performance. Legenda: em verde – alvo CHIK; em vermelho – alvo MAY.

Fonte: A autora.

Figura 25 – Limite de detecção do sistema RT-qPCR para a detecção do CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)



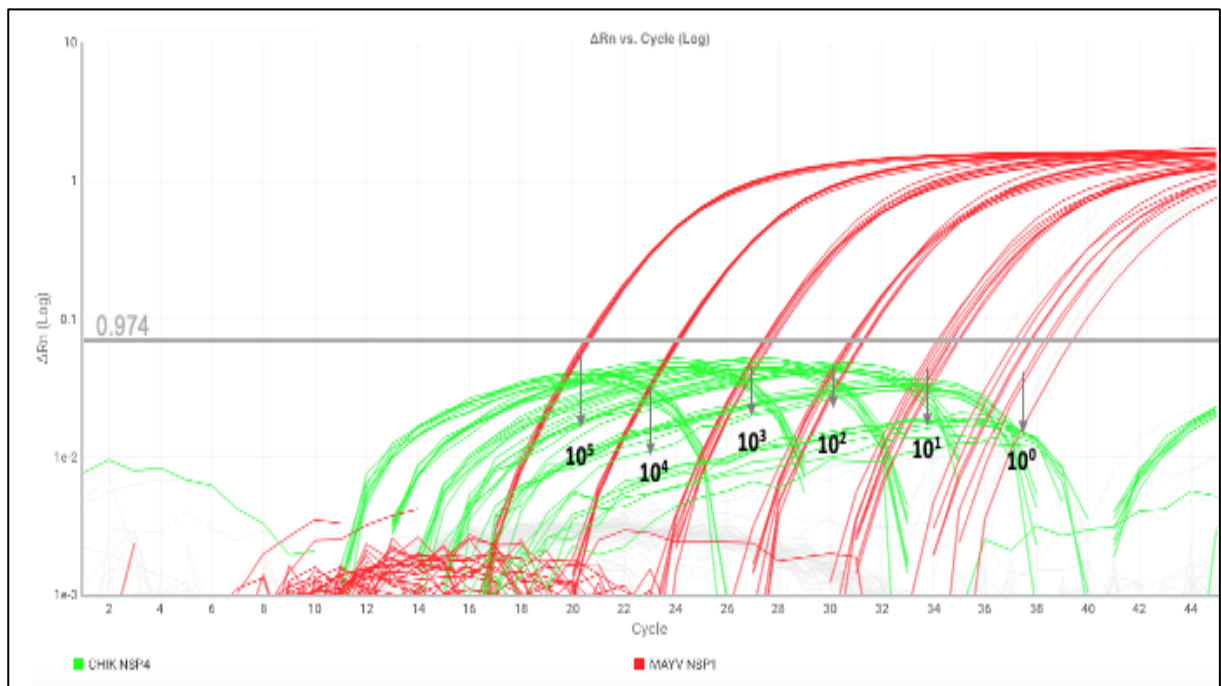
Nota: A curva padrão do limite de detecção do protocolo para o vírus Chikungunya apresentou uma eficiência de 90%, com $R^2 = 0.967$ e slope = -3.577.

Fonte: A autora.

9.3.3.1.2 mayv

A FDL do ensaio para detecção do MAYV, representada no gráfico de amplificação (*Amplification Plot*) (figura 24), foi determinada pelo intervalo de 10^5 a 10^0 , com elevado ΔR_n e uma variação de C_t de 19.9 a 36.6. O limite de detecção do protocolo para MAYV, ficou em torno de 38 cópias de RNA/ μ L. Após o fator de diluição 10^0 as amostras começaram a negativar, sendo 10^0 considerado o Limite de Quantificação (LQ) do ensaio.

Figura 26 - Limite de detecção do protocolo de RT-qPCR para detecção do vírus Mayaro



Nota: Para avaliação do limite de detecção do MAYV, foi considerado o intervalo de 10^5 a 10^0 , onde houve detecção do alvo em toda a respectiva diluição.

Legenda: Em vermelho: alvo MAY. Em verde: alvo CHIK.

Fonte: A autora.

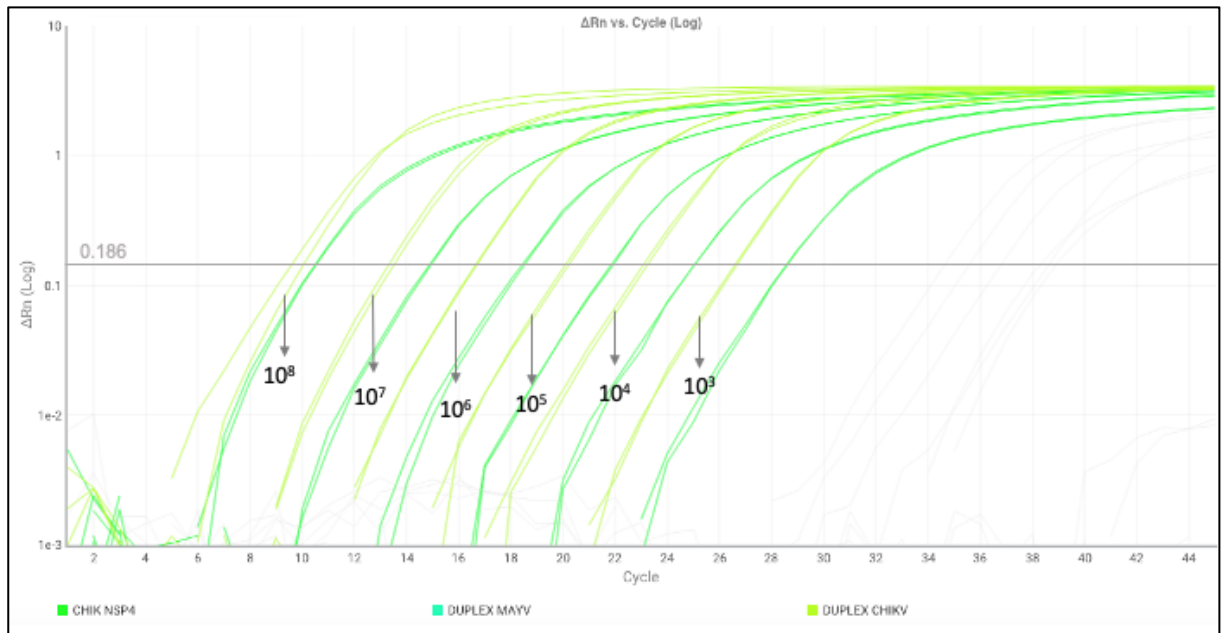
9.3.3.2 Curva Padrão

A curva padrão para avaliar a eficiência do ensaio duplex, foi realizada a partir do transcrito produzido. A placa para construção da curva padrão foi feita em um ensaio duplicata, através de diluições seriadas de fator 10, variando de 10^9 a 10^0 cópias/ μ L.

9.3.3.2.1 *chikv* – curva de amplificação (amplification plot)

A curva padrão realiza a comparação entre o desempenho do protocolo singleplex e do protocolo duplex. As amplificações (figura 25), representam o intervalo com as melhores eficiências dos protocolos singleplex e duplex do vírus Chikungunya, FDL = 10^8 a 10^3 . Fora desse intervalo, amplificações inespecíficas podem ser observadas. Para o ensaio singleplex, representado em verde escuro, o C_t variou entre 8.01 na concentração de 10^8 e 25.79 na concentração de 10^3 . Para o ensaio duplex, representado em verde claro, o C_t variou entre 10.415 na concentração de 10^8 e 26.971 na concentração de 10^3 .

Figura 27 – *Amplification Plot* do RT-qPCR para o CHIKV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

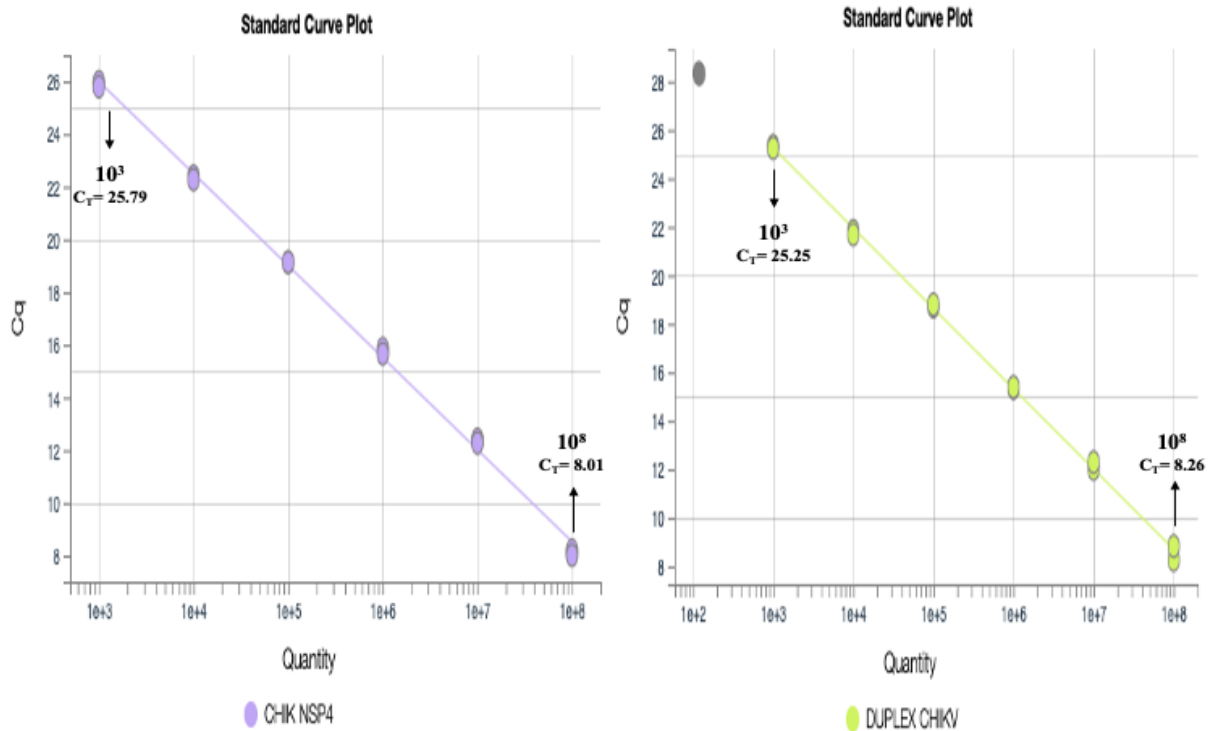


Fonte: A autora.

9.3.3.2.2 *chikv* – curva padrão (standard curve)

A curva padrão demonstrou equivalência entre o desempenho do protocolo simples e do protocolo duplex. O ensaio singleplex para o CHIKV, já utilizado na rotina de diagnóstico da SAARB/IEC/MS, apresentou uma eficiência de 93%, com $R^2 = 0.998$ e $slope = -3.497$. Para que o protocolo desenvolvido fosse considerado eficiente, precisaria ter parâmetros semelhantes ou superiores ao protocolo que já é utilizado. Ao realizar a comparação entre os protocolos dos dois tipos, é possível constatar que o duplex apresentou uma ótima performance para detecção do CHIKV, com parâmetros superiores ao singleplex, alcançando $slope$ de -3.348 , $R^2 = 0.999$ e uma eficiência de 98%.

Figura 28 – Comparação da performance do ensaio singleplex e duplex do CHIKV



Fonte: A autora.

Quadro 4 - Parâmetros obtidos na curva padrão do CHIKV (C_t = limiar de ciclo; R^2 = coeficiente de linearidade; Eff% = eficiência; FDL = faixa dinâmica linear; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação)

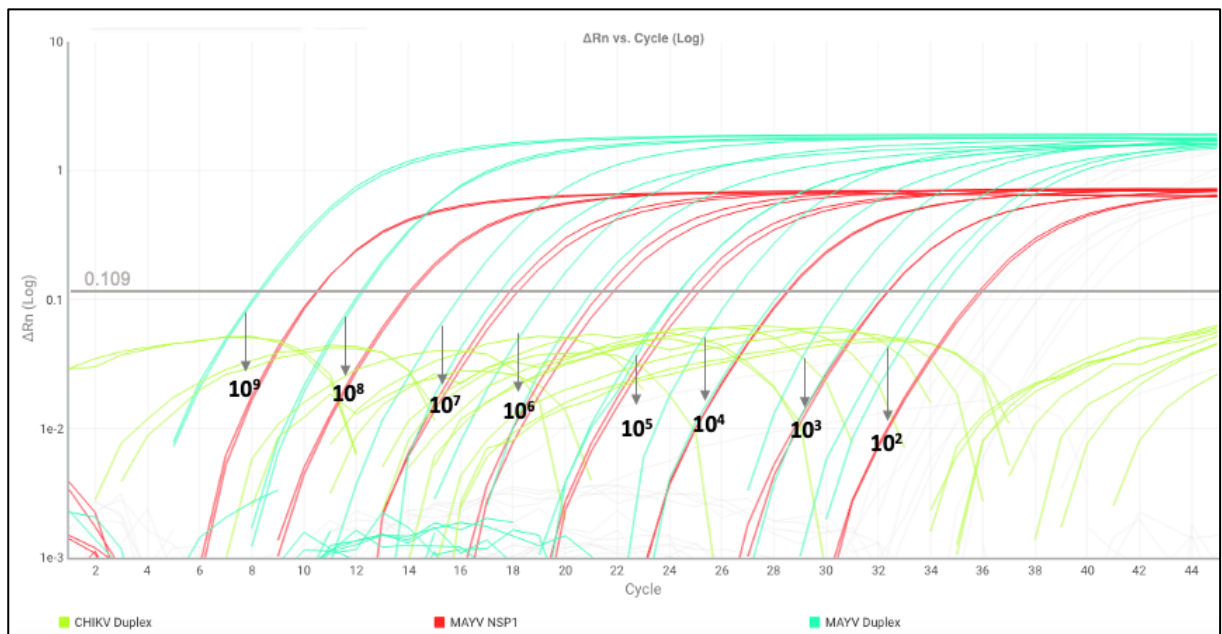
PARÂMETROS	Singleplex CHIKV	Duplex CHIKV
C_t	< 26	< 26
Slope	- 3.497	- 3.348
Y-inter	36.513	35.375
R^2	0.998	0.999
Eff%	93.186	98.923
FDL	10^8 a 10^3 cópias / uL	10^8 a 10^3 cópias / uL
LD	10^3 cópias / uL	10^3 cópias / uL
LQ	10^3 cópias / uL	10^3 cópias / uL

Fonte: A autora.

9.3.3.2.3 mayv – curva de amplificação (amplification plot)

A curva padrão realiza a comparação entre o desempenho do protocolo singleplex e do protocolo duplex. As amplificações (figura 26), representam o intervalo com as melhores eficiências dos protocolos singleplex e duplex do vírus Mayaro, $FDL = 10^9$ a 10^2 . Para o ensaio singleplex, representado em vermelho, o C_t variou entre 8.54 na concentração de 10^9 e 36.6 na concentração de 10^2 . Para o ensaio duplex, representado em azul, o C_t variou entre 6.57 na concentração de 10^9 e 32.7 na concentração de 10^2 .

Figura 29 – *Amplification Plot* do RT-qPCR para o MAYV. Programa 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

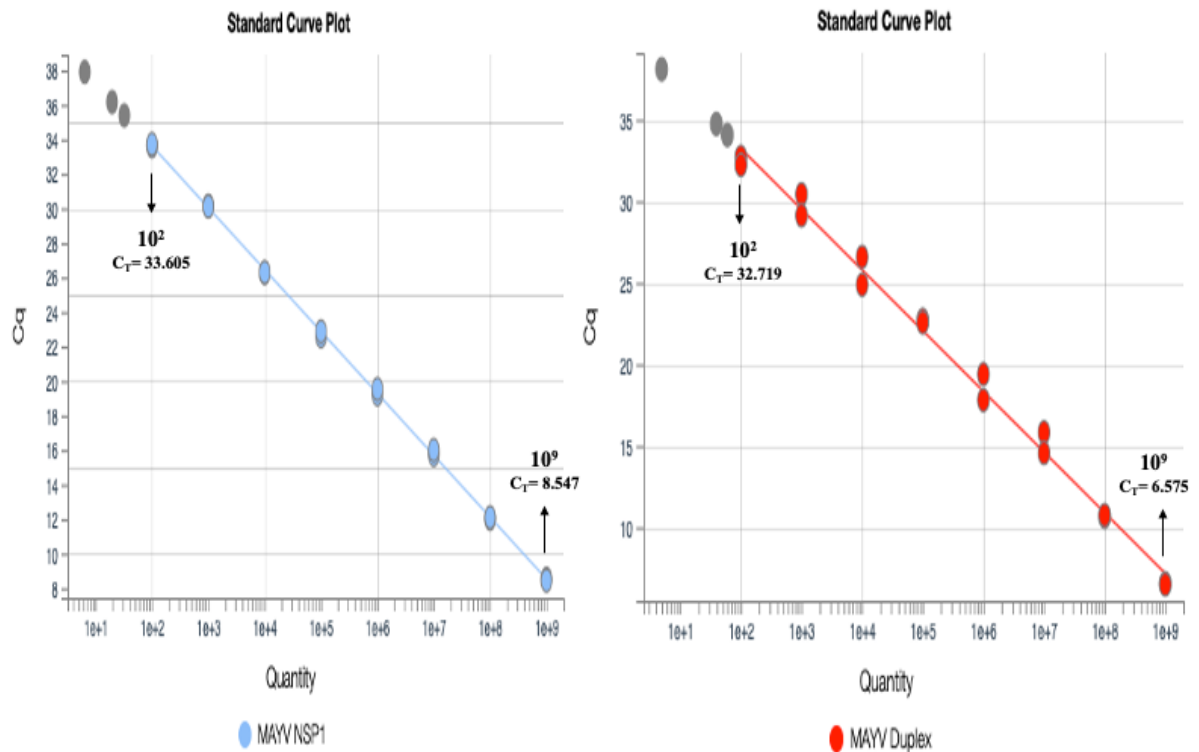


Fonte: A autora.

9.3.3.2.4 mayv – curva padrão (standard curve)

A reação simples para o MAYV apresentou uma eficiência de 90%, com $R^2 = 1$ e $slope = -3.586$, já o duplex apresentou uma performance para detecção do MAYV, com parâmetros um pouco a baixo do singleplex, alcançando slope de -3.721 , $R^2 = 0.993$ e uma eficiência de 85%.

Figura 30 - Comparação da performance do ensaio singleplex e duplex do MAYV



Fonte: A autora.

Quadro 5 - Parâmetros obtidos na curva padrão do MAYV (C_t = limiar de ciclo; R^2 = coeficiente de linearidade; Eff% = eficiência; FDL = faixa dinâmica linear; LD = limite de detecção; LQ = limite de quantificação)

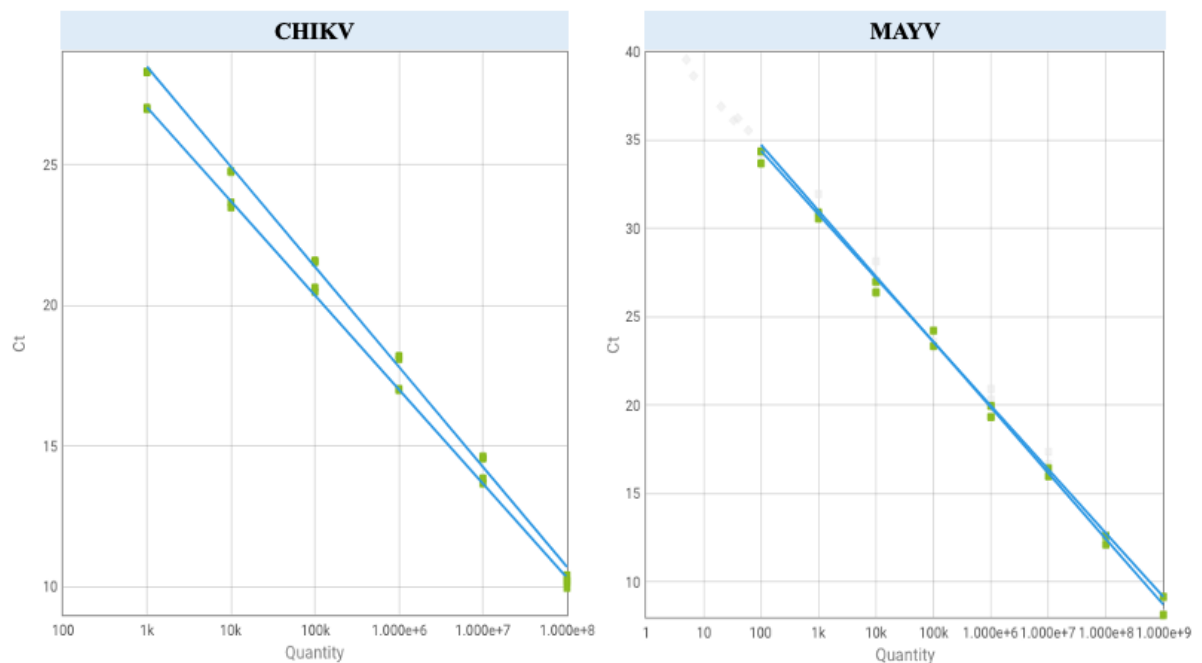
PARÂMETROS	Singleplex MAYV	Duplex MAYV
C_t	< 34	< 33
Slope	- 3.586	- 3.721
Y-inter	40.8	40.67
R^2	1.000	0.993
Eff%	90.065	85.668
FDL	10 ⁹ a 10 ² cópias / uL	10 ⁹ a 10 ² cópias / uL
LD	10 ² cópias / uL	10 ² cópias / uL
LQ	10 ² cópias / uL	10 ² cópias / uL

Fonte: A autora.

9.3.3.2.5 comparação: singleplex x duplex (chikv e mayv)

Analisando as curvas padrão em um mesmo gráfico, é possível observar que o desempenho da reação simples (singleplex) e da reação duplex, foram equivalentes para os dois alvos, havendo sobreposição em alguns pontos. Isso demonstra que não há perda na eficiência do ensaio, ao analisar os dois alvos em uma mesma reação e que os resultados da padronização do duplex são promissores.

Figura 31 - Comparação: Singleplex X Duplex (CHIKV e MAYV)



Fonte: A autora.

10 DISCUSSÃO

O vírus Chikungunya é um *Alphavirus* de grande importância clínica devido a sua intensa sintomatologia, capaz de ocasionar artralgia severa e debilitante nos indivíduos portadores da infecção, impactando na qualidade de vida e gerando impactos econômicos na sociedade. Desde a sua introdução no Brasil e comprovação de transmissão autóctone em 2014, a Febre do Chikungunya é considerada uma ameaça reemergente, provocando surtos esporádicos em diversas regiões, sendo, a região Nordeste a mais acometida pelas infecções (MARQUES *et al.*, 2017).

Por apresentar estreita relação sorológica e genética com outros *Alphavirus* pertencentes a mesma família, o diagnóstico diferencial e preciso continua sendo um desafio, levando em consideração o alto índice de reações cruzadas entre esses. O vírus Mayaro é um exemplo. Também descrito como artralgênico, apresenta uma manifestação clínica extremamente semelhante à infecção ocasionada pelo CHIKV, pode-se dizer até que são indistinguíveis clinicamente (SILVA; DERMODY, 2017).

O MAYV, apesar de historicamente apresentar um ciclo evolutivo silvestre, com grande circulação na região Amazônica, já foi detectado fora dessa região, provando a facilidade de adaptação desse *Alphavirus* em ambiente urbano (MUNHÖZ; NAVARRO, 2012). A capacidade de disseminação desse agente infeccioso, somada a similaridade clínica com a infecção por CHIKV, demonstra a necessidade de realizar uma investigação para o vírus Mayaro fora da região amazônica. Para essa investigação ser mais eficiente, é primordial ter disponível, protocolos que possam diferenciar as infecções ocasionadas por esses vírus tão semelhantes.

O método mais utilizado atualmente para o diagnóstico de arbovírus é a técnica de diagnóstico molecular através RT-qPCR, onde é possível identificar o agente infeccioso ainda na fase virêmica (GULLETT; NOLTE, 2014). Esta técnica apresenta diversas vantagens e variações, capazes de identificar mais de um patógeno na mesma reação, como é o caso dos protocolos multiplex. Os protocolos multiplex trazem diversos benefícios para a rotina de laboratórios de diagnóstico, podendo-se destacar: baixo custo e economia de reagentes, precisão e acurácia nos resultados, baixa possibilidade de reações cruzadas e possibilidade de detectar coinfeções,

conservação de amostras e maior rendimento (sendo possível utilizar volumes menores da amostra) (MACKAY; ARDEN; NITSCHEN, 2002; KLEIN, 2002).

Para o desenvolvimento de um protocolo multiplex é preciso levar em consideração alguns fatores: epidemiologia do agente etiológico e similaridade clínica entre as infecções. Para os *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro, ainda há a similaridade genética, por pertencerem ao mesmo gênero e família, sendo extremamente necessário haver essa diferenciação entre eles.

Estudos realizados anteriormente, apresentam reações multiplex de RT-qPCR, envolvendo o CHIKV e envolvendo o MAYV, porém, em comparação com outros arbovírus, como o DENV e o OROV. Ainda não há um protocolo estabelecido que realize o diagnóstico molecular, diferencial, entre o CHIKV e MAYV, juntos em uma mesma reação. O presente estudo teve como objetivo, padronizar as condições ideais para estabelecer um protocolo de RT-qPCR que fosse capaz de diferenciar as infecções ocasionadas pelos vírus Chikungunya e Mayaro, em uma única reação.

Essa padronização é realizada basicamente em 3 fases: 1 – análise de bioinformática e estabelecimento das regiões alvo; 2 – fase analítica, utilizando alvo sintético; 3 – fase clínica, onde o protocolo é avaliado frente a amostras reais. Nesse trabalho fomos capazes de avançar até a fase 2 da padronização.

A etapa analítica da padronização iniciou com as análises das condições ideais de iniciadores e sondas. As concentrações escolhidas levaram em consideração 3 pontos: apresentar menor valor de C_t , maior ΔR_n e menor custo, este último sendo possível devido à similaridade no desempenho das melhores concentrações. Nas etapas seguintes, curvas padrão foram construídas para cada alvo, com diluições seriadas do RNA transcrito. Dessa forma, foram estabelecidos o limite de detecção, limite de quantificação, e eficiência do ensaio. O protocolo duplex desenvolvido foi testado para o CHIKV e comparado, em sua etapa analítica, com o protocolo simples que já é utilizado na rotina de diagnóstico do Instituto Evandro Chagas. Para o MAYV, onde as sequências alvo e o plasmídeo foram desenhados especificamente para este estudo, a comparação foi realizada ao utilizar o mesmo plasmídeo em duas condições diferentes: singleplex e duplex.

Para um novo protocolo ser considerado eficiente, é necessário ter parâmetros de excelência semelhantes ou superiores aos parâmetros de protocolos já estabelecidos, assim, foram levados em consideração, protocolos desenvolvidos em estudos prévios. Segundo Bustin *et al.* (2009), para um protocolo ser considerado de qualidade, precisa atingir os seguintes parâmetros: Eff% entre 95 e 105%, coeficiente de linearidade (R^2) próximo de 1 e *slope* em torno de -3.32. Parâmetros influenciados pelas concentrações do ensaio, onde o valor de C_t e o ΔR_n interferem diretamente no desempenho.

Em ensaios multiplex que apresentaram o CHIKV como alvo é possível observar que a sensibilidade dos ensaios variou entre 10 a 20 cópias de RNA/ μ L. O protocolo desenvolvido por Pongsiri *et al.* (2012), que teve CHIKV e DENV como alvos, apresentou uma sensibilidade em torno de 10 cópias de RNA/ μ L. O protocolo desenvolvido por Simmons *et al.* (2016), que também apresentou CHIKV e DENV como alvo, foi capaz de detectar 12 cópias de RNA/ μ L. Já no estudo de Carletti *et al.* (2007), realizado apenas com CHIKV, para avaliar detecção e quantificação, obteve sensibilidade de 20 cópias de RNA/ μ L. Ambos utilizando DNA plasmidial para construção da curva padrão, como foi utilizado nesse trabalho. O ensaio duplex para detecção do CHIKV desenvolvido pelo nosso grupo mostrou-se bastante sensível, sendo capaz de detectar em média 3 cópias de RNA/ μ L e apresentou resultados lineares para 6 logs de diluição com uma curva padrão com eficiência de 98%, $R^2 = 0,999$ e um *slope* de -3.348, demonstrando um desempenho superior quando comparado com o singleplex, cuja eficiência ficou em torno de 91%.

Para o MAYV a literatura é um pouco mais escassa, em termos de protocolos estabelecidos. Em Naveca *et al.* (2017), foi padronizado um protocolo duplex para detecção simultânea dos vírus Mayaro e Oropouche, onde o limite de detecção do protocolo variou entre 2 a 20 cópias por reação para detecção do MAYV, com valor médio de C_t de 34.9 – 38.3, demonstrando sensibilidade equivalente quando comparado com o protocolo simples. No nosso protocolo o limite de detecção ficou em torno de 38 cópias/ μ L, com uma média de C_t de 34.3. A curva padrão apresentou resultados para 8 logs de diluição, porém, os parâmetros de excelência não foram os ideais. O duplex para MAYV alcançou uma eficiência de 85%, com $R^2 = 0,993$ e um

slope de -3.721. Já na reação simples, alcançou Eff% = 90%, $R^2 = 1$ e um *slope* de -3.586.

Apesar do desempenho do protocolo desenvolvido neste projeto não ter sido tão satisfatório no formato duplex, na detecção do MAYV, apresentando uma eficiência de 85% quando o ideal é acima de 95%, os parâmetros do protocolo simples e do protocolo duplex foram muito semelhantes, demonstrando que o seu uso pode ser bastante vantajoso na rotina de diagnóstico.

11 CONCLUSÃO

O ensaio duplex para o diagnóstico diferencial do CHIKV X MAYV, desenvolvido pelo grupo em parceria entre o departamento de virologia do IAM (LaViTE) e a SAARB/IEC, demonstrou uma boa performance para o diagnóstico do CHIKV ao ser comparado com o ensaio simples de CHIKV já estabelecido na rotina. O limite de detecção do protocolo apresentou resultados similares aos encontrados na literatura, com parâmetros de eficiência superiores ao protocolo simples para detecção do CHIKV, sendo sensível, rápido e prático.

Para detecção do MAYV, apesar de o protocolo não ter atingido uma eficiência aceitável dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos na literatura, o desempenho do ensaio singleplex e duplex, ficaram bem próximos. Contudo, ajustes precisam ser realizados, buscando uma melhor performance.

Para que o protocolo duplex seja estabelecido na rotina de diagnóstico do laboratório, é necessário ainda que seja comprovada a superioridade do ensaio em demais etapas, como a especificidade frente a outros arbovírus (ou seja, saber se o protocolo desenvolvido não detecta outros vírus, mesmo que geneticamente semelhantes) e também na etapa clínica, onde será avaliado o seu desempenho com amostras reais, para então validar o ensaio duplex e implementá-lo.

Nas etapas que foram realizadas nesse projeto, o protocolo duplex mostrou-se mais promissor na detecção e quantificação do CHIKV, do que MAYV.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-AMPUDIA, Y. *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 4 dez. 2018.
- AITICHOU, M. *et al.* Identification of Dobrava, Hantaan, Seoul, and Puumala viruses by one-step realtime RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 21-26. 2005.
- Aitken THG, Anderson CR (1959) Virus transmission studies with Trinidadian mosquitoes II. Further observations. *Am J Trop Med Hyg* 8: 41–45.
- ANDERSON, C. R. *et al.* Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957.
- ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet**, v. 16, 2016.
- AZEVEDO, R. S. *et al.* Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Disease**, v. 15, n. 11, p. 1830-2, 2009.
- BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAGLIOTI, C. *et al.* Chikungunya virus infection: an overview, **New Microbiologica**, v. 36, p. 211-227, 2013.
- CALABRESE, L. H. Emerging viral infections and arthritis: the role of the rheumatologist. **Nature Clinical Practice Rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 2-3, 2008.
- 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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 3, p. 521–524, 2007.
- CASSADOU, S. *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 13, 2014.
- CECILIA, D. *et al.* Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. **Archives of virology**, v. 160, n. 1, p. 323-7, 2015.
- 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**, v.77, n. 2, p. 133-7, 2013.
- CHRETIEN, J. P. *et al.* Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 405–407, 2007.

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

DASH, P.K. *et al.* Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of VFA infection in *Aedes aegypti*. **Virology Journal**, v. 22, n.9, p.1.Jan, 2012.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: Desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, 2017.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Review article: Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540 – 544, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

GAUNT, M. W. *et al.* Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1867 – 1876, 2001.

GULLETT, J. C.; NOLTE, F. S. Quantitative Nucleic Acid Amplification Methods for Viral Infections. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, 2015.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **J Infect Dis**, v. 15, n. 214 (suppl 5), p. 471-S474, 2016.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 2-3, p. 95-125, 2006.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, 2007.

LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P.; ROSA, A. P. T. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. II. Epidemiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p.3, p. 682-8, 1981.

LICIA-CAMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 36, 2016.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, diagnosis and vaccine development.* Elsevier Academic Press: California; vol. 59, p. 235-289. 2003.

- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C.; Características gerais e epidemiologia dos arbovirus emergentes no Brasil: Artigo de Revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55 – 64. 2014.
- LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.
- MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Braz J infect dis**, v. 20, n. 1, p. 91–98, 2016.
- MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 8, 2015.
- MAVIAN, C. *et al.* Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 8718, 2017.
- MEDEIROS, D. B. A; VASCONCELOS, P. F. C. Is the brazilian diverse environment is a crib for the emergence and maintenance of exotic arboviruses? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 3, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica (SE) 36 e febre de chikungunya até a SE 37 de 2014. **Boletim Epidemiológico**, vol. 45, n. 21, p. 1-6, 2014.
- MIRANDA-FILHO, D. B. *et al.* Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **American Journal of Public Health Special Section: Zika**, v. 106, n. 4, 2016.
- MOTA, M. T. O. *et al.* Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109-1122, 2015.
- MORO, M. L. *et al.* Chikungunya virus in North-Eastern Italy: a seroprevalence survey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 3, p. 508–11, 2010.
- NAVECA, F. G. *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510 – 513, 2017.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n.102, p. 1-11, 2015.
- PINHEIRO, F. P. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 674–681, 1981.
- PONGSIRI, P. *et al.* Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus Asian Pacific. **Journal of Tropical Medicine**, p. 342-346, 2012.

POWERS, A. *et al.* An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 3, p. 689-98, 1981.

POWERS, A. M. *et al.* Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.

QUEIROZ, A. L. N. *et al.* The usefulness of a Duplex RT-qPCR during the recent yellow fever Brazilian epidemic: surveillance of vaccine adverse events, epizootics and vectors. **Pathogens**, v. 10, 2021.

RAMIREZ, A. L. *et al.* Searching for the proverbial needle in a haystack: advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. **Parasites & Vectors** (2018) 11:320.

ROBINSON, M. C. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53 I. Clinical Features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 41 pii: 20929, 2014.

SCHAEFFER, M. *et al.* Epidemic jungle fevers among okinawan colonists in the Bolivian rain forest. I. Epidemiology. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 3, p. 372–396, 1959.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. Boletim Epidemiológico. v. 46. N. 44, p. 1-9, 2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. Boletim Epidemiológico. v. 47, n. 38, p. 1-10, 2016.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, v. 48, p. 1-13, 2017.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Ministério da Saúde. Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 6 de 2018, v. 49, p. 1-13, 2018.

SEJVAR, J. J. Clinical Manifestations and Outcomes of West Nile Virus Infection. **Viruses Journal**, v. 6, p. 606 – 623. 2014.

SIMON, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). Nov 2014. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, p. 243–63, 2015.

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. **J Clin Microbiol**, v. 54, n. 7, p. 1766-73, 2016.

STRAUSS J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: Gene expression, replication and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, p. 491–562, 1994.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Arboviruses pathogenic for man in Brazil. **An overview of arbovirology in Brazil and neighboring countries**. Instituto Evandro Chagas, Belém, p. 72-79, 1998.

WEAVER, S. C., REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328 – 345, 2010.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1062, 2018.