

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M527p Mello, Renata Gois De

Padronização da RT-PCR duplex, multiplex e nested para detecção dos vírus zika, dengue e chikungunya / Renata Gois De Mello -- Dourados: UFGD, 2017.
44f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Fábio Juliano Negrão

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Arboviroses. 2. Diagnóstico. 3. Teste laboratorial. 4. Rt-PCR. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciência Biológicas e Ambientais
Curso de Biotecnologia-FCBA

RENATA GOIS DE MELLO

**PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR *DUPLEX*, *MULTIPLEX* e *NESTED* PARA
DETECÇÃO DO VÍRUS ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA**

DOURADOS

2017

RENATA GOIS DE MELLO

**PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR *DUPLEX*, *MULTIPLEX* e *NESTED* PARA
DETECÇÃO DO VÍRUS ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, como pré-requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão.

DOURADOS

2017

RENATA GOIS DE MELLO

**PADRONIZAÇÃO DA RT-PCR *DUPLEX*, *MULTIPLEX* e *NESTED* PARA
DETECÇÃO DO VÍRUS ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
FCS – UFGD

Prof.^a Dr.^a Herintha Coeto Neitzke Abreu
FCS – UFGD

Msc. Alessandra Aparecida Vieira Machado
UFGD

Dourados, 6 de Abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela motivação, incentivo e suporte durante todos esses anos de faculdade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio por todo seu apoio e ensinamentos no decorrer deste trabalho e durante toda sua orientação.

À Laís Ortolani por ter me guiado, aconselhado e ajudado durante todo esse processo e por ter se tornado uma grande amiga.

Aos meus amigos Peceu, Pamela, Noelly, José, Matheus, João e Ronaldo por todos esses anos de amizade e companheirismo e por todos os momentos vividos durante a faculdade.

Aos professores do curso de Biotecnologia da UFGD, pelos ensinamentos valiosos.

À Fundação Oswaldo Cruz por ter cedido as amostras necessárias para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela contribuição para o crescimento do trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis. ”

José de Alencar

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ZIKA	3
2.1.1. Epidemiologia	3
2.1.2. Virologia	4
2.1.3. Aspectos Clínicos	5
2.2. DENGUE	5
2.2.1. Epidemiologia	5
2.2.2. Virologia	7
2.2.3. Aspectos Clínicos	7
2.3. CHIKUNGUNYA	8
2.3.1. Epidemiologia	8
2.3.2. Virologia	9
2.3.3. Aspectos Clínicos	9
2.4. Vetores da Zika, Dengue e Chikungunya	10
2.5. Prevenção e Controle	10
2.6. Diagnóstico	11
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivos gerais	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Vírus e <i>Primers</i>	15
4.2. Quantificação das amostras virais	16
4.3. RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)	16
4.3.1. RT-PCT <i>Duplex</i>	17
4.3.2. RT-PCR <i>Multiplex</i>	17

4.3.3. <i>Nested</i> RT-PCR	18
5. RESULTADOS	20
5.1. Avaliação dos <i>Primers</i>	20
5.2. Quantificação das amostras virais	20
5.3. RT-PCT <i>Duplex</i>	20
5.4. RT-PCR <i>Multiplex</i>	21
5.5. <i>Nested</i> RT-PCR	22
6. DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	27
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A. - Aedes

CHIKV - Chikungunya vírus

DENV - Dengue vírus

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FHD - Febre hemorrágica da dengue

IgM - imunoglobulin M/ imunoglobulina M

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF - Open Reading Frame

PCR - Polimerase Chain Reaction/Reação em Cadeia da Polimerase

pb - pares de base

RNA - Ácido ribonucléico

RT-PCR - Reverse transcription Polymerase Chain Reaction/ Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa

SUS – Sistema Único de Saúde

ZIKV - Zika vírus

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. - Sinais e sintomas da Dengue, Zika e Chikungunya.....	p. 13
Figura 2. – Testes de detecção dos arbovírus Zika, Dengue e Chikungunya.....	p. 13
Figura 3. - Eletroforese em gel de agarose 2% do resultado da RT-PCR <i>Duplex</i>	p. 21
Figura 4. - Eletroforese em gel de agarose 2% do resultado da RT-PCR <i>Multiplex</i> (A) e da RT-PCR realizada com os <i>primers</i> ZIKVEN-F/ZIKVEN-R, CHIK-F/CHIK-R e DEN-F/DEN-CR separadamente (B).....	p. 22
Figura 5. - Eletroforese em gel de agarose 2% do resultado da <i>Nested</i> RT-PCR. (A) Reação RT-PCR com os primers DEN-F/DEN-CR. (B) Reação <i>Nested</i> -PCR com os primers que amplificam os 4 sorotipos da dengue.....	p.23

RESUMO

Os vírus zika (ZIKV), dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) são as arboviroses mais prevalentes nas Américas. Elas compartilham o mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, se sobrepõem em áreas endêmicas e possuem sintomas clínicos semelhantes nos estágios iniciais da doença. Essas, arboviroses nos últimos anos, aumentaram sua área de endemicidade e são consideradas como um grande problema de saúde pública. Isso reforçou a necessidade do desenvolvimento de testes laboratoriais para confirmar a infecção por essas viroses. Esses testes devem ser rápidos, específicos, eficientes, econômicos e fáceis de serem realizados, permitindo que possa ser feita a identificação dos vírus nos pacientes que apresentarem os sintomas da doença. Este trabalho propôs a padronização de protocolos para a identificação dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, além da detecção simultânea dos vírus ZIKV, DENV e CHIKV em uma única reação e diferenciação dos sorotipos do vírus DENV. Para isso foram utilizados nove pares de oligonucleotídeos iniciadores já descritos na literatura que se mostraram sensíveis e específicos à sequência alvo dos vírus. Três modalidades diferentes da RT-PCR foram utilizadas para atingir este propósito: a RT-PCR *Duplex*, a RT-PCR *Multiplex* e a *Nested* RT-PCR. Na reação RT-PCR *Duplex* foi possível observar apenas o produto amplificado pelo par de oligonucleotídeos iniciadores FG1/FG2, mostrando que o par de oligonucleotídeos iniciadores cM3W/M2W apresentou baixa sensibilidade. Na reação RT-PCR *Multiplex*, foi possível observar apenas os produtos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores DEN-F/DEN-CR e ZIKVEN-F/ZIKVEN-R, porém não foi possível observar o produto dos oligonucleotídeos iniciadores CHIKF/CHIKR, no entanto, quando a reação foi realizada separadamente foi possível observar todos os produtos amplificados por cada um dos oligonucleotídeos iniciadores. Na reação *Nested* RT-PCR, observamos apenas os produtos amplificados pelos oligonucleotídeos iniciadores DEN-F/DEN-CR, DEN-1 e DEN-2. Esses resultados mostram que ainda é necessário a otimização dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e das reações para aumentar a sensibilidade dos testes realizados neste estudo para que se possa padronizar um teste para a detecção das três arboviroses aqui descritas.

Palavras-chave: Arboviroses, teste laboratorial, detecção, RT-PCR.

ABSTRACT

Zika (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) viruses are the most prevalent arboviruses in the Americas. They share the same vector, the *Aedes aegypti* mosquito, overlap in their endemic areas and have similar clinical symptoms, especially in the initial stages of the infection. In recent years, these arboviruses have increased their area of endemicity and it has been considered a major public health problem. This reinforced the need for the development of laboratory tests to accurately confirm infections by these viruses. These tests should be rapid, specific, efficient, cost-effective and easy to perform, allowing identification of viruses in patients presenting the disease symptoms. This work proposes the standardization of protocols for the identification of the *Alphavirus* and *Flavivirus* genera, as well as the simultaneous detection of ZIKV, DENV and CHIKV viruses in a single reaction and differentiation of DENV serotypes. For this, nine pairs of primers already described in the literature which were sensitive and specific to the virus target sequence were used. Three different RT-PCR modalities were used to achieve this purpose, Duplex RT-PCR, Multiplex RT-PCR and Nested RT-PCR. In Duplex RT-PCR reaction, it was only possible to observe the product amplified by primer pair FG1 / FG2, showing that primer pair cM3W / M2W was not as sensitive. In Multiplex RT-PCR reaction, it was only possible to observe the products amplified by DEN-F / DEN-CR and ZIKVEN-F / ZIKVEN-R primers, but CHIKF / CHIKR product was not observed, however, when the reaction was performed separately it was possible to observe all products amplified by each of the primers. In Nested RT-PCR reaction, it was possible to observe only the products amplified by the primers DEN-F / DEN-CR, DEN-1 and DEN-2. These results show that it is still necessary to optimize the primers used and the reactions to increase the sensitivity of the tests performed in this study so that a test can be standardized for the detection of the three arboviruses described herein.

Keywords: Arboviruses, Laboratory test, Detection, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as arboviroses se tornaram um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Isso deve-se ao fato do grande número de casos de doenças causadas pelos arbovírus que acometem o ser humano (VASCONCELOS; CALISHER, 2016). O vírus dengue (DENV) juntamente com os vírus zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), são as arboviroses mais prevalentes das Américas e são responsáveis por problemas de saúde, econômicos e sociais para as populações que vivem em áreas endêmicas (RODRIGUEZ-MORALES, 2016).

Esses três arbovírus são transmitidos para os humanos através da picada do mosquito do Gênero *Aedes* (*A. aegypti* e *A. albopictus*). Por isso, além de ocorrer a co-circulação desses vírus em um mesmo local, é possível que ocorra a infecção por duas ou pelas três viroses simultaneamente (MUSSO et al., 2015). Esses arbovírus podem causar uma variedade de doenças como febre hemorrágica e encefalite e os sintomas clássicos das três infecções incluem febre, dor de cabeça, dor muscular, erupções cutâneas e artralgias. Devido a isso, o diagnóstico clínico diferencial dessas três arboviroses é difícil de ser realizado principalmente na fase aguda da doença onde os sintomas são similares (BRONZONI, 2005).

No Brasil, em 2016, foram confirmados 126.395 casos de infecção pelo ZIKV, dos quais seis evoluíram para óbito, além do aumento da incidência dos casos de malformação congênita; em relação ao DENV, 1.487.924 casos prováveis de infecção sendo 826 casos graves e 609 óbitos e 263.598 casos prováveis de infecção pelo CHIKV sendo 159 óbitos (BRASIL, 2016).

O fato dos sintomas das três infecções se sobreporem e a ocorrência delas em áreas endêmicas leva a necessidade dessas viroses serem testadas simultaneamente. O diagnóstico das infecções causadas por arboviroses são na maioria das vezes realizados através de testes sorológicos, porém eles podem obter resultados falso-negativos se for realizado nos primeiros dias da doença ou podem ocorrer reações cruzadas de anticorpos com antígenos de viroses pertencentes ao mesmo gênero (CDC, 2016).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) pode ser utilizada como um potencial teste rápido, específico e sensível para detecção de DENV, ZIKV e CHIKV simultaneamente em amostras clínicas além da determinação dos sorotipos de dengue. Este método poderia aprimorar o diagnóstico e diferenciação dos sorotipos de determinadas viroses

principalmente em áreas tropicais onde o sistema de saúde público possui recursos limitados (CALVO, 2016; CDC, 2016).

Por este motivo, foi proposto uma adaptação dos protocolos descritos por Bronzoni et al, 2005; Faye et al, 2008 e Lanciotti et al, 1992, para a identificação de Alphavírus e Flavivirus, detecção dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV simultaneamente, além da diferenciação dos sorotipos do vírus dengue pelas técnicas RT-PCR *Duplex*, RT-PCR *Multiplex* e a *Nested* RT-PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ZIKA

2.1.1. Epidemiologia

O ZIKV foi primeiramente isolado em 1947 em primatas (macacos rhesus) na floresta Zika, em Uganda, país localizado no continente Africano (DICK et al., 1952 cap. I). Um ano depois, o vírus foi novamente isolado, desta vez do mosquito *Aedes africanus*, na mesma floresta, durante uma pesquisa sobre febre amarela (DICK et al., 1952 cap. I). Estudos sorológicos realizados posteriormente mostraram que o vírus também poderia infectar seres humanos, reportado por vários países do continente africano, mostrando que o vírus possui uma ampla distribuição geográfica (DICK et al, 1952 cap. II).

Após 8 anos, em 1954, foi relatado os três primeiros casos de infecção pelo vírus zika em seres humanos na Nigéria (MACNAMARA,1954). Somente em 2007, ocorreu o primeiro grande surto de zika nas ilhas Yap, Micronésia, localizada no Oceano Pacífico, onde aproximadamente 73% da população foi infectada pelo vírus e aproximadamente 18% das pessoas infectadas desenvolveram a doença com sintomas (DUFFY et al., 2009).

Já o segundo grande surto epidêmico foi reportado em 2013 na Polinésia Francesa com aproximadamente 11% da população infectada associada a complicações neurológicas e autoimunes (CAO-LORMEAU et al., 2014). Entre 2013 e 2014 subsequentes surtos foram relatados nas ilhas do Pacífico, incluindo Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015), Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016), Ilhas Cook (ROTH et al.,2014), e Taiti (WAEHRE et al.,2014).

Pouco depois, em 2015, o vírus zika foi identificado pela primeira vez no continente Americano, especificamente no Brasil, na região nordeste (ZANLUCA et al., 2015). Até março de 2016, o vírus se espalhou por 33 países e territórios do continente americano (MMWR, 2016). No Brasil, foram registrados 211.770 casos prováveis de febre pelo vírus zika (taxa de incidência de 103,6 casos/100 mil hab.) distribuídos em 2.280 municípios, tendo sido confirmados 126.395 (59,7%) casos em 2016, até a semana epidemiológica 49 (BRASIL, 2016). O vírus zika está difundido no país com transmissão autóctone e alta incidência notificada nos 27 estados administrativos da Federação.

Em 2015, um aumento da incidência de casos de malformação congênita em 20 vezes em relação aos anos anteriores foi relatado juntamente com o surto do vírus zika no nordeste brasileiro

(VICTORA et al., 2016). Isto levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a propagação do ZIKV e a sua associação com defeitos de nascimento como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) em 1º de fevereiro de 2016 (World Health Organization, 2016).

Já no estado de Mato Grosso do Sul foram registrados 339 casos confirmados de infecção pelo vírus zika no ano de 2016, sendo 8 deles no município de Dourados. (Mato Grosso do Sul, 2016).

2.1.2. Virologia

O ZIKV é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) de RNA fita simples de senso positivo pertencente à família *Flaviviridae* do gênero *Flavivirus* (LANCIOTTI et al., 2008). É classificado em dois genótipos, asiático e africano, de acordo com a análise filogenética de seu genoma (GATHERER; KOHL, 2016). Como outros flavivírus, o ZIKV é composto por duas regiões não codificantes que flanqueiam uma ORF que codifica uma poliproteína dividida em capsídeo, precursor de membrana, envelope e 7 proteínas não estruturais (KUNO; CHANG, 2007).

Em relação a patogenia, após o vírus ser inoculado no hospedeiro humano, ele entra nas células da pele através de receptores de células como fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas imaturas permitindo a sua migração para os linfonodos e para a corrente sanguínea (HAMEL et al., 2015). A partir daí uma resposta imune é iniciada ao mesmo tempo em que o vírus está se replicando causando a viremia. Diferentemente de outros flavivírus, o ZIKV se replica exclusivamente no núcleo das células infectadas (BUCKLEY; GOULD, 1988).

Logo depois, o vírus pode ser detectado no sangue assim que começam a aparecer os primeiros sintomas da doença e pode ser detectado até o décimo primeiro dia após os aparecimentos dos sintomas (LANCIOTTI et al., 2008). Além disso, o vírus foi detectado no líquido amniótico, mostrando que o vírus consegue cruzar a barreira placentária em mulheres grávidas (FILLIPPS, 2016).

2.1.3. Aspectos Clínicos

O período de incubação do vírus em seres humanos, do momento da picada do mosquito até o aparecimento dos sintomas, é de aproximadamente 3 a 12 dias. A infecção em humanos é assintomática em aproximadamente 80% dos casos (IOOS et al., 2014). Quando os sintomas ocorrem eles são moderados e não específicos, similares a outras infecções por arbovírus como DENV e CHIKV o que pode confundir o diagnóstico (DUFFY et al., 2009).

Nos casos sintomáticos, os sintomas são tipicamente erupções cutâneas, febre, artralgia, mialgia, fadiga, dor de cabeça e conjuntivite. Esses sintomas geralmente duram 1 a 2 semanas (DUFFY et al., 2009). Além destes sintomas, o vírus da zika também está associado com complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barre, meningite e meningoencefalite (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015).

Já em mulheres grávidas, a infecção pelo vírus pode levar a abortos e em recém-nascidos pode causar malformação congênita, calcificações cerebrais e degeneração muscular (Pan American Health Organization, 2016).

2.2. DENGUE

2.2.1. Epidemiologia

A dengue é a arbovirose mais importante e prevalente encontrada mundialmente. De acordo com a OMS, ela é a arbovirose que se espalha mais rapidamente no globo e é endêmica em todas as regiões habitadas do mundo, exceto no continente europeu (WHO, 1986).

A primeira epidemia reportada ocorreu entre os anos de 1779-1780 na Ásia, África e América do Norte (GLUBER et al., 1995). Após a Segunda Guerra Mundial, uma epidemia global começou no sudeste Asiático e no Pacífico, isso porque a Guerra causou significante mudanças demográficas e ecológicas, incluindo a alta mobilidade de pessoas e soldados e aumento de indivíduos susceptíveis em áreas endêmicas (GLUBER et al., 1998).

Desse modo, com o aumento da transmissão, a epidemia causada por vários sorotipos da dengue (hiperendemicidade) se desenvolveu em várias cidades do sudeste asiático levando ao aparecimento da febre hemorrágica da dengue (FHD) (GLUBER et al., 1994). A primeira epidemia

de FHD ocorreu no sudeste asiático nos anos de 1950, porém em 1975 se tornou a causa principal de hospitalização e morte entre as crianças da região (WHO, 1986).

Já nos anos de 1970, a dengue foi reintroduzida nas Ilhas do Pacífico e sua atividade epidêmica aumentou nas ilhas e no continente Americano (GLUBER, 1991). Durante os anos de 1980 e 1990 a epidemia da FHD de expandiu geograficamente do sudeste asiático para Índia, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Paquistão e leste da China (GLUBER, 1998). A emergência da dengue e da FHD como um problema de saúde pública se mostrou mais dramática no continente americano.

Durante os anos de 1950 e 1960, a epidemia era rara no continente Americano devido a uma campanha de erradicação do vetor *A. aegypti* realizada pela Organização Pan-Americana da Saúde nos países da América Central e América do Sul. A campanha foi cessada nos anos 1970 e devido a isso essa espécie de mosquito voltou a invadir os países de onde havia sido erradicada (PINHEIRO, 1989).

Desse modo, nos anos de 1980, vários países do continente americano estavam sofrendo com epidemias de dengue e novas cepas e sorotipos do vírus foram introduzidos nesses países (GLUBER, 1998). Por conta disso, vários desses países evoluíram de não endêmicos ou de hipoendêmicos (apenas um sorotipo do vírus presente na região) para países de hiperendemicidade e assim a epidemia da FHD emergiu nestes locais.

Assim, de 1981 a 1997, 24 países do continente americano reportaram casos confirmados de FHD (GLUBER, 1998). No ano de 1995, a dengue já era considerada a doença viral transmitida por mosquitos mais importante que afeta seres humanos. Estima-se que mais de 2,5 bilhões de pessoas (aproximadamente 40% da população mundial) vivem em áreas onde a doença é endêmica (World Health Organization, 2012). A cada ano, estima-se que ocorram de 50 a 100 milhões de casos de infecções, dos quais 500 mil são casos de FHD (WHO, 2012).

No Brasil, a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente foi em Boa Vista, Roraima, entre os anos de 1981-1982, causada pelos sorotipos 1 e 4. No ano de 1986, uma nova epidemia atingiu o estado do Rio de Janeiro, causada pelo sorotipo 1, tendo mais de 95 mil casos notificados, e a partir deste momento novas epidemias ocorreram em diferentes estados brasileiros (BRASIL, 2017).

Logo após, em 1990, foi registrado o primeiro caso de FHD no país, no estado do Rio de Janeiro, devido a introdução do sorotipo 2 do vírus (FUNASA, 1999). No ano de 2002, ocorreu uma incidência no país com aproximadamente 700 mil casos notificados (BRASIL, 2017), consolidando assim a dengue como um dos maiores problemas da saúde pública. Segundo o Boletim

Epidemiológico de 2016 foram registrados 1.487.924 casos prováveis de dengue no país, com uma incidência de 727,6 casos/100 mil habitantes, até a semana epidemiológica 49 (BRASIL, 2016).

Já no estado de Mato Grosso do Sul, em 2016, foram registrados 59.874 casos prováveis de infecção pelo DENV, sendo 5.124 casos notificados no município de Dourados segundo Boletim Epidemiológico emitido pela Secretaria do Estado de Saúde do Estado (Mato Grosso do Sul, 2016).

2.2.2. Virologia

O DENV é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. É um vírus de RNA de fita simples de cadeia positiva e possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GLUBER, 1998). Ele possui 10.700 nucleotídeos que são traduzidos em uma única poliproteína que é clivada no processo de pós-tradução em três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (KING, 2011).

A transmissão do vírus é feita através da picada do mosquito vetor que está infectado com o vírus e após um período de 5 a 7 dias de incubação, os sintomas da doença podem começar a aparecer (GLUBER, 1998). O mosquito adquire o vírus ao se alimentar de uma pessoa infectada e pode se tornar infectante após um período de incubação de 8 a 12 dias (GLUBER, 1998).

Primeiramente, o vírus infecta as células epiteliais do intestino do mosquito e após isso infecta suas glândulas salivares, onde se prolifera deixando o mosquito infectante (BLACK et al., 2002). Depois de inoculado no hospedeiro humano, o vírus infecta as células da linhagem monocítica e macrofágica de órgãos linfóides, pulmão e fígado, se replica e posteriormente se distribui para todo o organismo (BHAMARAPRAVATI, 1997).

2.2.3. Aspectos Clínicos

A infecção pelo DENV pode ser assintomática ou apresentar-se em três formas de aspectos clínicos diferentes, são elas: dengue sem sinal de alarme, dengue com sinal de alarme e dengue grave (WHO, 2009).

A classificação de dengue sem sinal de alarme é aplicada à pessoas quem vivam ou tenham viajado para áreas endêmicas e que apresentam febre entre 2 e 7 dias juntamente com duas ou mais

das seguintes manifestações: cefaléia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia náuseas, vômitos e exantema. (WHO, 2009).

Já a dengue com sinal de alarme é todo caso de dengue que no período de defervescência da febre apresenta um ou mais dos seguintes sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, acumulação de líquidos, sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia maior do que 2 cm e aumento progressivo do hematócito (WHO, 2009).

Por fim a dengue grave é todo caso de dengue que apresenta severo extravasamento de plasma o que pode levar ao choque; sangramento grave e comprometimento grave de órgãos (WHO, 2009).

Quando o hospedeiro humano se infecta com um sorotipo do vírus, ele automaticamente fica imune àquele sorotipo, porém ele ainda está suscetível a infecções pelos outros três sorotipos do vírus (GLUBER, 1998). Quando a pessoa se infecta pela segunda vez com um outro sorotipo do vírus, ela possui uma maior probabilidade de desenvolver a forma mais grave da doença (HALSTEAD, 1988).

2.3. CHIKUNGUNYA

2.3.1. Epidemiologia

O CHIKV foi primeiramente isolado no ano de 1952-1953 na Tanzânia, África (LUMSDEN,1955). “Chikungunya” é uma palavra do dialeto *Makonde* que significa “aquele que se curva” e refere-se à aparência curvada dos pacientes que foram atendidos na primeira epidemia documentada na Tanzânia (ROSS, 1956). Durante muitos anos (aproximadamente 20 anos), a doença causada pelo CHIKV foi raramente reportada, porém, no início do ano de 2004, surtos de grande escala foram reportados na costa da Quênia se expandindo para diferentes regiões da África, Ásia e várias ilhas do oceano Índico (WEAVER, 2015).

Assim, o fator que contribuiu para a emergência do vírus foi possivelmente os viajantes que se infectaram em áreas endêmicas e voltaram para seus países contribuindo para o estabelecimento da transmissão autóctone (HOCHEDÉZ, 2006). Em 2004, o vírus foi detectado em 19 países e foram registrados aproximadamente 1,9 milhões de casos (FIOCRUZ, 2016). Em 2013, uma

linhagem asiática do vírus foi introduzida em vários países do Caribe e resultou em grande surto que se espalhou para o México e vários países da América Central e do Sul. Até dezembro de 2015, o vírus já tinha se espalhado entre 44 países e territórios (WEAVER, 2015).

No Brasil, os primeiros casos de chikungunya foram reportados em meados de 2014. Duas linhagens diferentes do CHIKV foram detectadas nas regiões Norte e Nordeste do país, possivelmente originadas de viajantes oriundos do Caribe e Angola (NUNES, 2015). Em 2016, foram registrados 263.598 casos prováveis de febre de chikungunya no país e uma taxa de incidência de 128,9 casos/100 mil hab., até a semana epidemiológica 49 (BRASIL, 2016).

Já no estado de Mato Grosso do Sul, em 2016, foram registrados 452 casos prováveis de infecção pelo CHIKV, sendo 29 casos notificados no município de Dourados. (Mato Grosso do Sul, 2016).

2.3.2. Virologia

O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae*. É um vírus de RNA fita simples de sentido positivo. É classificado em quatro genótipos, o Asiático, o Oeste Africano, Leste/Central/Sul Africano (ECSA) e a linhagem do Oceano Índico (IOL) de acordo com a análise filogenética de seu genoma (WEAVER, 2015). Ele é composto por quatro proteínas não-estruturais e três proteínas estruturais. As proteínas estruturais são o capsídeo e duas glicoproteínas do envelope viral: E1 e E2 (WEAVER, 2015).

A transmissão do vírus é feita através da picada do mosquito infectado e o CHIKV é capaz de se replicar nas células epiteliais humanas e endoteliais, fibroblastos primários, e macrófagos derivados de monócitos e seu período de incubação é de 2 a 4 dias (TALARMIN, 2007).

2.3.3. Aspectos Clínicos

Os aspectos clínicos da infecção pelo vírus CHIKV são semelhantes aos das infecções causadas pelos vírus DENV e ZIKV, porém, ao contrário dessas outras doenças, a maioria das pessoas infectadas com o CHIKV são sintomáticas (CDC, 2016).

Após um período de incubação de 1 a 12 dias (média de 2-4 dias), a viremia ocorre e os sintomas começam a aparecer. Os primeiros sintomas são súbitos ataques de febre, calafrios, dor de cabeça, erupção cutânea, artralgia, principalmente nos punhos, joelhos, calcanhar e em pequenas

articulações, o que usualmente causa debilitações ao paciente (MOHAN, 2006). A fase aguda da doença dura cerca de 7 dias a 2 semanas, já a fase crônica pode durar de meses a anos com a presença de poliartralgia (TAUIL, 2014).

2.4. VETORES DA ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA

Os vírus ZIKV, DENV e CHIKV são tipicamente transmitidos via picada de mosquito, sendo o *A. aegypti* o principal vetor atualmente seguido do gênero *A. albopictus*. O mosquito *A. aegypti* é uma espécie originária da África, pertence à família *Culicidae*, subfamília *Culicinae*, gênero *Aedes*, e subgênero *Stegomyia*. Mosquitos do gênero *Aedes* estão amplamente distribuídos pelo mundo sendo regiões tropicais e subtropicais o habitat nativo da maioria das espécies (KRAEMER, 2015).

A aquisição do vírus pelo mosquito ocorre durante a alimentação do sangue do hospedeiro infectado. Após a captura, o vírus se replica e pode ser encontrado nas glândulas salivares do mosquito. Uma vez infectado, a fêmea transmite o vírus junto com sua saliva para um animal reservatório ao realizar sua próxima refeição (IOOS, 2014). O *A. aegypti* é um mosquito de hábito diurno e tem preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares (FIOCRUZ, 2008). A sua proliferação é dada pela postura de ovos pelas fêmeas em locais onde se encontra água parada, onde posteriormente os ovos irão eclodir dando origem às larvas. O ovo do mosquito consegue sobreviver até um ano fora da água aguardando condições ambientais favoráveis para se desenvolver (FIOCRUZ, 2008).

O vírus zika, além de ser transmitido pela picada do mosquito, pode ser transmitido também via sexual (FOY, 2011; MUSSO, 2015), por transfusão sanguínea (MUSSO, 2014) e via placentária, de mãe para filho (BESNARD, 2014; Pan American Health Organization, 2016).

2.5. PREVENÇÃO E CONTROLE

Atualmente não há nenhum tratamento específico ou vacina disponível para o tratamento dessas doenças. No caso da dengue, já foi desenvolvida uma vacina tetravalente contra os 4 sorotipos do vírus pelo laboratório francês Sanofi Pasteur que está disponível no Brasil desde 2015,

porém ela ainda não está disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e deve ser comprada pela rede particular (BRASIL, 2015).

Desse modo, é recomendado para os pacientes o tratamento dos sintomas com analgésicos, ingestão de líquidos e repouso. Devido a isto, o papel da prevenção da doença e controle do vetor é de extrema importância, principalmente quando se trata de mulheres grávidas no caso de infecção pelo vírus zika. As medidas são focadas principalmente na prevenção da picada do mosquito transmissor do vírus, proteção do corpo, uso de mosquiteiros e telas para proteção da casa e uso de repelentes no caso de proteção individual. Já a nível de comunidade, áreas comuns em cidades, os Agentes Comunitários de Saúde e os Agentes de Combate a Endemias, junto da população, são responsáveis por promover o controle químico e mecânico do vetor, cujas estratégias têm como alvo a reprodução dos mosquitos através da eliminação de possíveis criadouros através do uso de inseticidas e a eliminação dos mosquitos adultos.

Outra estratégia necessária é a promoção de ações educativas sobre os vírus e seus riscos durante a visita dos agentes comunitários com o objetivo de garantir a eliminação dos criadouros pelos próprios proprietários das residências para tentar romper a cadeia de transmissão dessas doenças (BRASIL, 2009).

Por fim, para mulheres grávidas que não moram em países endêmicos é recomendado que não viajem para países afetados pelo vírus zika. Para mulheres que viajarem para áreas endêmicas é recomendado a realização de testes para a detecção do vírus e a ultrassonografia para monitorar a anatomia fetal é recomendada para mulheres que apresentarem testes positivo ou inconclusivo para o vírus (PETERSEN, 2016).

Essas estratégias estão diretamente relacionadas à educação e conscientização da população, para que ocorra uma mudança no comportamento da mesma em relação ao tratamento de possíveis criadouros de mosquitos transmissores do vírus.

2.6. DIAGNÓSTICO

Realizar o diagnóstico de arboviroses apenas através da avaliação clínica não é confiável devido a sobreposição de sintomas que ocorrem entre diversas arboviroses (CDC, 2016). Neste caso o diagnóstico depende de testes laboratoriais.

Além disso, a avaliação para os vírus zika, dengue e chikungunya devem ser realizadas simultaneamente para todos os pacientes que apresentarem os sintomas de febre aguda, erupção

cutânea, mialgia ou artralgia e que tenha viajado recentemente para uma área de transmissão em curso desses vírus.

Atualmente o diagnóstico laboratorial das arboviroses ZIKV, DENV e CHIKV pode ser feito indireto ou diretamente. O método indireto consiste nos testes sorológicos que detectam os anticorpos circulantes contra determinado vírus. O exame mais utilizado é o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) que detecta anticorpos IgM específicos contra o vírus em questão (BRASIL,2005). Ele pode ser realizado a partir do quarto dia da doença, quando esses anticorpos começam a aparecer. A vantagem deste teste é que ele exige apenas uma única amostra de soro para fazer a análise, porém os testes sorológicos podem causar resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros vírus da mesma família (CDC, 2016).

Já o método direto consiste nos testes moleculares que detectam a presença do vírus. Isso ocorre por meio da amplificação do material genético, no caso o RNA. Essa metodologia é denominada de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) e é o método de diagnóstico mais específico para detecção das arboviroses ZIKV, DENV e CHIKV (CDC, 2016). Este método permite a identificação do vírus e a diferenciação dos diferentes sorotipos caso exista, além de ser rápido, sensível, simples e reprodutível. Ele deve ser realizado durante o período virêmico da doença (até 5-8 dias após a infecção dependendo do vírus). Após este período, o resultado pode ser negativo, o que não exclui a infecção sendo necessário realizar os testes sorológicos para detecção de anticorpos.

Além das técnicas PCR e RT-PCR usuais, outras modalidades dessas técnicas foram desenvolvidas e podem ser utilizadas para a realização de diagnóstico das arboviroses descritas neste estudo. Dentre estas, estão as técnicas PCR *Multiplex* e *Nested-PCR*. A PCR *Multiplex* envolve a amplificação simultânea de mais de uma sequência alvo na reação pela mistura de vários pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que são específicos para cada uma das sequências. Ela tem a finalidade de promover a diferenciação entre várias espécies ou entre vários gêneros simultaneamente em uma única reação, isso faz com que as chances de contaminação sejam reduzidas e torna a técnica mais simples e prática (OLIVEIRA, 2007).

Já na técnica *Nested-PCR*, a reação é realizada primeiramente com um par de *primer* que irá amplificar a região alvo de interesse no genoma do organismo. Posteriormente, é utilizado um segundo par de *primer* que irá se ligar à região dentro do primeiro produto, produzindo um segundo produto de PCR mais específico. Essa técnica tem como finalidade aumentar a sensibilidade e a especificidade da reação (OLIVEIRA, 2007).

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre (duração)	Acima de 38°C (4 a 7 dias)	Sem febre ou subfebril 38°C (1-2 dias subfebril)	Febre alta > 38°C (2-3 dias)
Manchas na pele (frequência)	A partir do 4º dia (30-50% dos casos)	Surge no 1º ou 2º dia (90-100% dos casos)	Surge 2-5 dia (50% dos casos)
Dor nos músculos (frequência)	+++ /+++	++ /+++	+ /+++
Dor na articulação (frequência)	+ /+++	++ /+++	+++ /+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50-90% dos casos	30%
Dor de cabeça (frequência e intensidade)	+++	++	++
Coceira	Leve	Moderada/Intensa	Leve
Hipertrofia ganglionar (frequência)	Leve	Intensa	Moderada
Discrasia hemorrágica (frequência)	Moderada	Ausente	Leve
Acometimento Neurológico	Raro	Mais frequente que Dengue e Chikungunya	Raro (predominante em Neonatos)

Fonte: Carlos Brito – Professor da Universidade Federal de Pernambuco

#saúde nasredes blog.saude.gov.br SUS  /minsaude

Figura 1. - Sinais e sintomas da Dengue, Zika e Chikungunya.

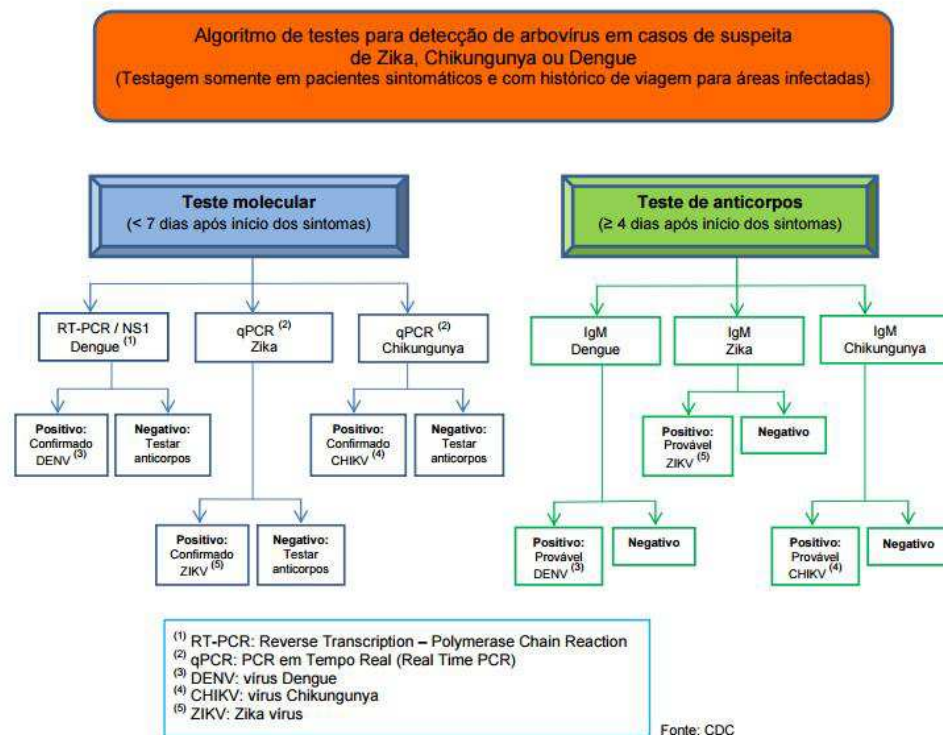


Figura 2. - Testes para detecção dos arbovírus Zika, Dengue e Chikungunya. *

*Fonte: CDC

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Padronizar as técnicas RT-PCR para a diferenciação dos vírus Alphavírus e Flavivírus e detecção do vírus simultânea ZIKV, DENV e CHIKV.

3.2. Objetivos específicos

Diferenciar os Alphavírus e Flavivírus pela técnica da RT-PCR *Duplex* utilizando os *primers*;

Detectar os vírus ZIKV, DENV e CHIKV conjuntamente pela técnica da RT-PCR *Multiplex*;

Diferenciar os 4 sorotipos do DENV a partir da técnica *Nested* RT-PCR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Vírus e *Primers*

Os materiais genéticos extraídos dos vírus ZIKV, DENV e CHIKV utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná). Os *primers* utilizados foram selecionados da literatura por anelarem em regiões conservadas dos genomas dos vírus produzindo produtos de PCR de tamanhos facilmente distinguíveis. As sequências dos *primers* e suas referências estão listadas na Tabela 1.

A avaliação *in silico* dos *primers* foi realizada através da ferramenta online *Multiplex Primer Analyser* disponível no site da Thermo Fisher Scientific (www.thermofisher.com) para verificar se havia competição entre os *primers*, além da formação de dímeros de *primers* e *hairpins*. A ferramenta foi utilizada também para verificar a temperatura de *melting* dos *primers* e quantidade das bases C - G.

Todas as técnicas e reações efetuadas neste estudo foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados.

Tabela 1. *Primers* usados nas técnicas de RT-PCR para identificação dos vírus ZIKV, CHIKV, DENV e seus sorotipos, suas respectivas sequências e tamanho do *amplicon*.

Reação	<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências
RT-PCR <i>Duplex</i>	M2W	YAGAGCDTTTTCGCAWSTRGCHW	434	Bronzoni et al., 2005
	cM3W	ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC	-	
	FG1	TCAAGGAACTCCACACATGAGATGTACT	958	Bronzini et al., 2005
	FG2	GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	-	
RT-PCR- <i>Multiplex</i>	DEN-F	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG	511	Lanciotti et al., 1992
	DEN-CR	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	-	
	ZIKVENV-F	GCTGGDGCRCGACACHGGRACT	364	Faye et al., 2008
	ZIKVENV-R	RTCYACYGCCATYTGGRCTG	-	
	CHIKF	ACCGGCGTCTACCCATTCATGT	325	Kumar et al., 2007
CHIKR	GGGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA	-		
<i>Nested</i> RT-PCR	DEN-F	TCAATATGCTGAAACGCGGAGAAACCG	511	Lanciotti, 1992
	DEN-CR	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	-	
	DEN1-R	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	482	
	DEN2-R	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	119	
	DEN3-R	TAACATCATCATGAGACAGAGC	290	
DEN4-R	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	392		

4.2. Quantificação das amostras virais

As amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro *BioDrop DUO*, onde foram avaliadas as concentrações de RNA e o grau de pureza das amostras definido pela razão entre as absorbâncias 260 e 280 nm. Após isso, os RNAs foram estocados no freezer -80°C até serem utilizados.

4.3. RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa)

Foram realizadas três diferentes técnicas para a transcrição e amplificação do material genômico neste estudo: i) a RT-PCR *Duplex* foi realizada com os *primers* M2W/cM3W para a detecção dos isolados Alphavirus e os *primers* FG1/FG2 para a detecção dos isolados Flavivirus; ii) a RT-PCR *Multiplex* foi realizada com *primers* específicos para a identificação dos vírus DENV, CHIKV e ZIKV e iii) a *Nested-PCR* foi realizada para a identificação dos quatro sorotipos do vírus dengue.

Além dessas técnicas, o método *one-step* RT-PCR foi utilizado em algumas das reações realizadas. Este método consiste na transcrição e amplificação do material genético em uma única etapa, realizada na mesma reação. Para isso foi utilizado o kit *iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit* (Bio-Rad). A vantagem desse método quando comparada ao *two-step* RT-PCR é que por ele ser efetuado em uma única etapa, em um único tubo, reduz os riscos de contaminação e também os erros de pipetagem, levando a praticidade e rapidez do teste (HARRIS, 1998).

Em todas as variações da técnica de PCR (*Duplex*, *Multiplex* e *Nested*) todos os pares de *primers* foram testados frente ao material em reações singulares e comparadas às reações executadas na associação dos *primers* com o material simultaneamente. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com gel *red* (10,000 X) e fotografado em um transiluminador de luz-ultravioleta (320 nm).

4.3.1. RT-PCR *Duplex*

Nessa reação foram utilizados dois pares de *primers* juntamente com a amostra de RNA dos três vírus. Como controle negativo, foram utilizados os dois pares de *primers*, porém sem a amostra. As duas etapas da RT-PCR *Duplex* foram realizadas, observando as seguintes condições de reação: na primeira etapa foram utilizados 8 µL de RNA da amostra, 10 mM de dNTP, 2 µL de H₂O, 100 µM do *primer reverse* cM3W e 100 µM do *primer reverse* FG2 15 µM. Essa mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e colocada imediatamente no banho de gelo após esse tempo para a desnaturação. Após isso foram adicionados no mesmo tubo Tampão 5X *First-Strand*, 0,1M de DTT e 200 U da enzima transcriptase reversa SuperScript RT™ III. Essa mistura foi incubada a 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos e colocadas em banho de gelo em seguida para inativação da enzima.

A segunda etapa consistiu na preparação do mix da PCR. A mistura conteve 1 µL de cDNA obtido na primeira reação, PCR Buffer 10X, 10mM de dNTP, 50 mM de MgCl₂, 50 µM do *primer forward* M2W, 15 µM do *primer forward* FG1, 5 U da Taq DNA polymerase e H₂O para completar uma reação de 50 µl. A mistura foi amplificada em um termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) programado para 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto; seguido de uma extensão final de 72°C por 5 minutos e foi submetida a eletroforese em gel de agarose.

4.3.2. RT-PCR *Multiplex*

A reação RT-PCR *Multiplex* foi realizada com 3 pares de *primers* em um único tubo, sendo os *primers* DEN-F e DEN-CR que amplificam o gene *prM-C* do vírus dengue, produzindo *amplicons* de 511-pb (LANCIOTTI et al,1992), os *primers* ZIKVEN-F e ZIKVEN-R que amplificam o gene *NS5* do vírus zika, produzindo *amplicons* de 364-pb (FAYE et al, 2008), e os *primers* CHIK-F e CHIK-R que amplificam o gene *E1* do vírus chikungunya, produzindo um *amplicon* de 330-pb (KUMAR et al, 2007). Foram utilizados três pares de *primers* com as amostras de RNA dos três vírus e como controle negativo, foram utilizados os três *primers*, porém, sem as amostras. Além disso, foram realizadas mais 3 reações, onde em cada uma foi adicionado os *primers* de cada vírus separadamente com suas respectivas amostras.

A RT-PCR *Multiplex* foi realizada usando o kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (Bio-Rad). Foram observadas as seguintes condições de reação: na primeira reação foram utilizados 5 µL de RNA das amostras de ZIKV, DENV e CHIKV, 10 µl do mix iTaq SYBR Green, 1 µl dos *primers forward* ZIKVENV-F, CHIKF e DEN-F, 1 µl dos *primers reverse* ZINKVENV-R, CHIKR e DEN-CR, 0,25 µl da enzima transcriptase reversa iScript e H₂O para completar uma reação final de 25 µl.

Na segunda reação foram utilizadas as mesmas quantidades dos reagentes. A amplificação foi realizada no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) programado para 1 ciclo de 50°C por 10 minutos, 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 1 ciclo de 68°C por 5 minutos para o alongamento final. Cada reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose.

4.3.3. *Nested* RT-PCR

Para realizar a *Nested* RT-PCR, primeiramente foi realizada a RT-PCR da amostra de DENV separadamente com o kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (Bio-Rad) com o *primer* DEN-F/DEN-F que produz um fragmento de 511-pb. Para isso foram utilizados 5 µL de RNA da amostra, 10 µL do mix iTaq SYBR Green, 1 µL do *primer forward* DEN-F, 1 µl do *primer reverse* DEN-CR, 0,25 µL da enzima transcriptase reversa iScript e H₂O para completar uma reação final de 25 µl. A amplificação foi realizada no termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) programado para 1 ciclo de 50°C por 10 minutos, 1 ciclo de 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 1 ciclo de 68°C por 5 minutos para o alongamento final. Antes da etapa de *Nested*-PCR, os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com gel *red* 10.000 X e fotografado em um transiluminador de ultravioleta.

Após isso, foi realizada a reação *Nested*-PCR em um único tubo com o produto da reação anterior junto com o *primer* DEN-F e os *primers* internos DEN1-R, DEN2-R, DEN3-R e DEN4-R que amplificam os 4 sorotipos de dengue e produzem *amplicons* de 482-pb, 119-pb, 290-pb e 392-pb respectivamente. Os produtos foram submetidos a *Nested*-PCR de acordo com a seguinte condição de reação: 1µL do produto amplificado na primeira reação, 10 X do PCR Buffer 10 X, 10 mM de dNTP, 50 mM de MgCl₂, 25 µM do *primer forward* DEN-F, 1 µl dos *primers reverse* DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, 5 U da Taq DNA polymerase e H₂O para completar uma reação

de 100 μ l. A mistura foi amplificada em um termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) programado para 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, seguido de uma extensão final de 72°C por 10 minutos e submetida a eletroforese em gel de agarose.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação dos *Primers*

Os *primers* utilizados neste estudo (Tabela 1), já publicados anteriormente, foram testados nas técnicas de RT-PCR *Duplex*, *Multiplex* e *Nested*. Não foi observada nenhuma reação cruzada entre os *primers* testados e apenas um produto amplificado foi obtido para cada par de *primers* das reações.

5.2. Quantificação das amostras virais

As amostras quantificadas através do espectrofotômetro *BioDrop DUO* obtiveram as seguintes concentrações: ZIKV: 49,54 ng/ μ L; CHIKV: 49,75 ng/ μ L; DENV: 51,86 ng/ μ L.

5.3. RT-PCR *Duplex*

A reação RT-PCR *Duplex* foi realizada com dois pares de *primers* em um único tubo, sendo os *primers* cM3W-R/M2W-F que amplificam o gene *NSP1* dos Alphavírus, produzindo amplicons de 434-pb e os *primers* FG1-F/FG2-R que amplificam o gene *NS5* de Flavivírus, produzindo amplicons de 958-pb (BRONZONI,2005). Foi possível observar no gel de agarose o fragmento amplificado pelo primer FG1-F/FG2-R (Figura 3). O uso dos *primers* FG1/FG2 foi capaz de detectar os flavivírus (Dengue e Zika) sem reação cruzada com outros arbovírus, no caso o vírus chikungunya também utilizado na reação. Porém, não foi possível observar o fragmento amplificado pelo primer cM3W-R/M2W-F (Figura 3). Não foi verificada competição entre os dois pares de *primers* através do uso da ferramenta online *Multiple primer analyzer* (Life technologies).

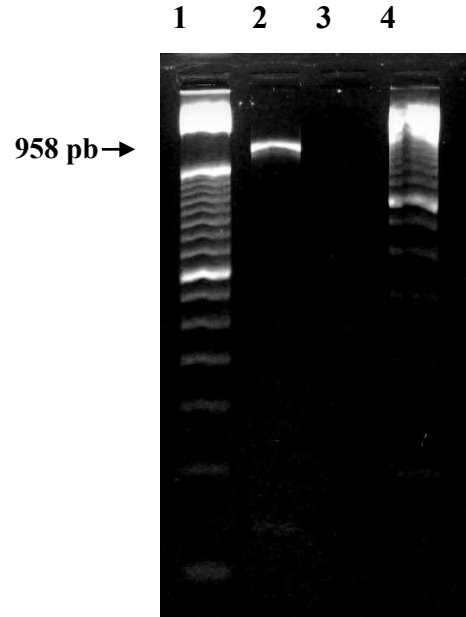


Figura 3. - RT-PCR *Duplex*. 1- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 50pb); 2- Flavivirus (958-pb) e Alphavirus (434-pb); 3- Controle negativo; 4- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb).

5.4. RT-PCR *Multiplex*

No final da reação da RT-PCR *Multiplex*, foi possível observar o fragmento amplificado pelos *primers* DEN-F/DEN-CR e ZIKVEN-F/ZIKVEN-R, porém não foi possível observar o fragmento amplificado pelo *primer* CHIK-F/CHIK-R (Figura 4A). Já na reação realizada com os *primers* separadamente, foi possível observar os três fragmentos amplificados pelos três pares de *primers* dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV (Figura 4B). Não foi verificada competição entre os três pares de *primers* através do uso da ferramenta online *Multiple primer analyzer* (*Life technologies*).

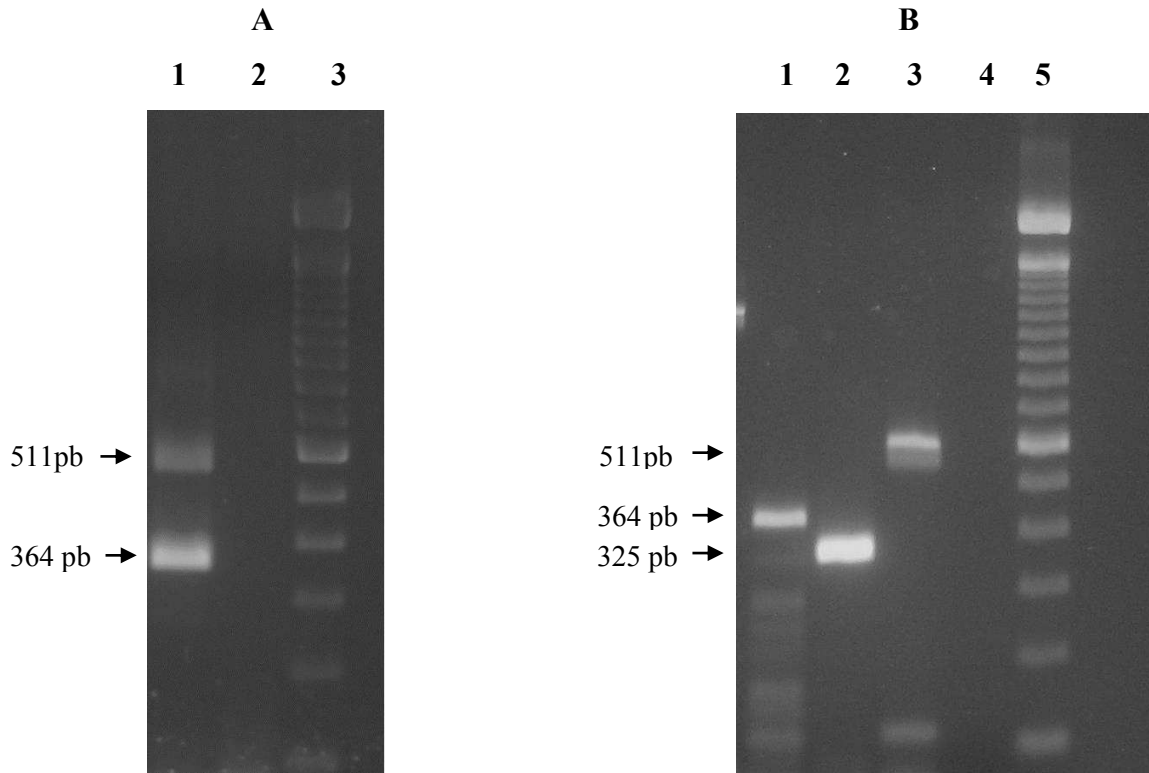


Figura 4. - RT-PCR *Multiplex* (A) e RT-PCR realizada com os *primers* ZIKVEN-F/ZIKVEN-R, CHIK-F/CHIK-R e DEN-F/DEN-CR separadamente (B). 1A- ZIKV, CHIKV e DENV; 2A- Controle negativo; 3A- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb). 1B- ZIKV (364 pb); 2B- CHIKV (330 pb); 3B- DENV (511 pb); 4B- Controle negativo; 5B- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 100pb).

5.5. *Nested* RT-PCR

Na técnica de *one-step* RT-PCR seguida de *Nested*-PCR para a detecção do vírus DENV e seus sorotipos, na primeira etapa foi possível observar a amplificação do fragmento de tamanho 511 pb produzido pelo *primer* DEN-F/DEN-CR, mostrando boa especificidade desse *primer* (Figura 5A). Na segunda etapa foi possível visualizar os fragmentos amplificados pelos *primers* DEN-F/DEN-CR, DEN-F/DEN1-R e DEN-F/DEN2-R (Figura 5B). Não foi possível observar os fragmentos amplificados pelos *primers* DEN-F/DEN3-R e DEN-F/DEN4-R.

Os *primers* internos escolhidos foram efetivos para a identificação de dois sorotipos de dengue, o sorotipo DEN1 e DEN2, porém, com o primer DEN-F/DEN2-R não houve uma boa amplificação do fragmento, apresentando-se muito claro no gel. Não foi verificada competição entre os três pares de *primers* através do uso da ferramenta online *Multiple primer analyzer* (*Life technologies*), porém com o *primer* DEN4-R foi verificado a formação de dímero.

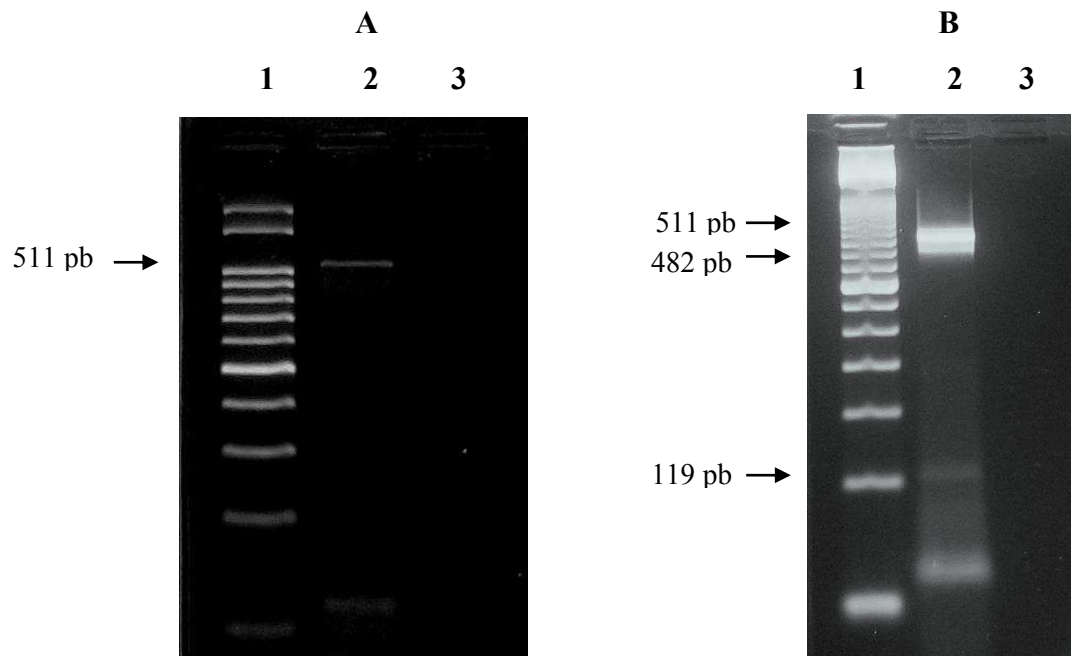


Figura 5. - *Nested* RT-PCR. (A) Reação RT-PCR com os *primers* DEN-F/DEN-CR. (B) Reação *Nested*-PCR com os *primers* que amplificam os quatro sorotipos da dengue. 1A- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 50 pb); 2A- DENV (511 pb); 3A- Controle negativo. 1B- Marcador de peso molecular (DNA Ladder 50 pb); 2B- DEN1 (482pb), DEN2 (119pb), DEN3 (290pb), DEN4 (392pb); 3B- Controle negativo.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, os arbovírus representam um importante problema de saúde por levarem ao desenvolvimento de doenças e pela sua ampla distribuição geográfica. Para conter este problema são necessárias medidas de vigilância epidemiológicas, assim como o desenvolvimento de métodos de diagnósticos dessas arboviroses que sejam eficazes, específicos e baratos. Por este motivo, neste estudo foi proposto uma adaptação dos protocolos descritos por Bronzoni et al. (2005), Faye et al. (2008) e Lanciotti et al. (1992), para padronização de um protocolo para a identificação de Alphavírus e Flavivírus, detecção dos vírus DENV, ZIKV e CHIKV simultaneamente, além da diferenciação dos sorotipos do DENV. Para isso foram utilizadas as técnicas RT-PCR *Duplex*, RT-PCR *Multiplex* e a *Nested* RT-PCR.

A especificidade destes testes baseia-se na capacidade dos *primers* em reconhecer a sequência de RNA específica de cada um dos vírus e seus sorotipos. Essa especificidade foi confirmada pelos *primers* FG1/FG2, DEN-F/DEN-CR, ZIKVEN-F/ZIKVEN-R, CHIK-F/CHIK-R, DEN-F/DEN1-R e DEN-F/DEN2-R. Isso mostrou que os *primers* foram específicos para as sequências alvo escolhidas, porém nem todos foram sensíveis o suficiente pois não foi possível observar o produto amplificado de todos eles no gel de agarose, mostrando que a sensibilidade de alguns ainda precisa ser melhorada.

Para a realização da reação RT-PCR *Duplex* para a identificação dos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*, os *primers* foram escolhidos devido sua similaridade de comprimento, capacidade de hibridização e quantidade de C-G, além disso alguns parâmetros foram otimizados como a melhor concentração dos *primers* e seleção de uma temperatura de anelamento ótima. No entanto, com os *primers* cM3W/M2W não foi possível observar a amplificação do produto esperado. A sensibilidade do *primer* pode ter sido afetada possivelmente devido aos *mismatches* encontrados nas sequências dos *primers*, isso faria com que o *primer* não se anelasse corretamente a sequência do gene de interesse e conseqüentemente afetaria a eficiência da amplificação desses *primers* (BRONZONI et al., 2005).

Esses *mismatches* ocorrem possivelmente devido ao fato de que quando os *primers* foram desenhados, ainda não estarem disponível dados de sequência relevantes para se realizar o alinhamento de múltiplas sequências para então ser possível selecionar *primers* específicos para detecção de gêneros de interesse (KUNO, 1998). Nesse caso, seria necessário a realização de estudos das sequências das espécies do gênero de interesse para que os dados necessários para o

desenho de *primers* estejam disponíveis. Kuno (1998), demonstrou que uma alternativa para otimizar a reação é adotar a metodologia *Nested* PCR após a amplificação com os *primers* degenerados cM3W/M2W, o que aprimoraria a baixa sensibilidade do *primer* e do teste. No estudo realizado por Bronzoni et al. (2005) o uso dos dois pares de *primers* FG1/FG2 e cM3W/M2W foi satisfatório para a amplificação dos Alphavírus e Flavivírus utilizados no estudo, porém os arbovírus utilizados nesse estudo não foram os mesmos que foram utilizados em nosso estudo.

A segunda técnica utilizada foi a RT-PCR *Multiplex* para a detecção simultânea dos vírus ZIKV, DENV e CHIKV. Essa técnica é vantajosa pois é capaz de detectar um número maior de viroses em uma única reação quando comparada com outras técnicas (BRONZONI et al., 2005). Nesta reação foram utilizados três pares de *primers* externos específicos para cada vírus e a amplificação foi feita através do método *one-step* RT-PCR. Os *primers* DEN-F/DEN-CR, ZIKVEN-F/ZIKVEN-R e CHIK-F/CHIK-R foram escolhidos de acordo com sua alta homologia entre os vírus específicos e alta divergência entre outros vírus do mesmo gênero (KUMAR et al, 2007; FAYE et al, 2008; LANCIOTTI et al,1992).

Foi observado com esses *primers* uma boa amplificação dos fragmentos quando eles foram avaliados sozinhos pela técnica RT-PCR. Porém, quando os *primers* foram avaliados simultaneamente na técnica *multiplex*, só foi possível observar os fragmentos gerados pelos *primers* DEN-F/DEN-CR e ZIKVEN-F/ZIKVEN-R. Apesar de não ter sido verificada competição entre os três pares de *primers* através do uso da ferramenta online *Multiple primer analyzer (Life technologies)* é possível que tenha ocorrido alguma interferência entre os *primers* utilizados na reação ou entre os fragmentos de RNA das amostras utilizadas, o que possivelmente faria com que não fosse possível uma boa amplificação do fragmento pelo *primer* CHIK-F/CHIK-R (KUNO, 1998).

No estudo de Calvo et al. (2016), foi realizado a técnica *Multiplex* RT-PCR seguida de *Nested* para a detecção das arboviroses ZIKV, DENV e CHIKV, simultaneamente. Para isso eles utilizaram seis pares de *primers*, sendo três *primers* externos utilizados na reação *Multiplex* e três *primers* internos utilizados na reação *Nested*. Na primeira reação não foi possível observar os fragmentos amplificados pelos *primers*, apenas os fragmentos amplificados pelos controles positivo foram observadas. Já na segunda reação foi possível observar todos os fragmentos amplificados pelos *primers*, o que aprimorou a sensibilidade do teste, mostrando um resultado satisfatório para a técnica proposta. Vale ressaltar que os *primers* utilizados foram diferentes dos *primers* utilizados

aqui. Assim, a introdução da técnica *Nested* após a *Multiplex* RT-PCR possivelmente poderia ser utilizada como uma alternativa para otimizar os testes realizados neste estudo.

Na técnica de *one-step* RT-PCR seguida de *Nested* PCR para a detecção do vírus DENV e seus sorotipos, os *primers* DEN-F/DEN-CR foram escolhidos de acordo com sua alta homologia com os quatro sorotipos de dengue e sua não homologia a outras regiões do genoma do vírus (LANCIOTTI et al, 1992). O uso de *primers* homólogos a sequências conservadas do vírus garante que todas as sequências do DENV sejam amplificadas na primeira reação. A amplificação deste produto em uma segunda etapa pela técnica de *Nested*-PCR usando *primers* internos específicos permite a identificação de cada sorotipo do DENV (OLIVEIRA, 2007).

O *primer* externo escolhido para a realização da *Nested* RT-PCR se mostrou específico para a amplificação do DENV. Já dos *primer* internos escolhidos, apenas os *primer* DEN1-R e DEN2-R se mostraram específicos para a amplificação dos sorotipos DEN1 e DEN2. Com o *primer* DEN4-R foi verificado a formação de dímero através do uso da ferramenta online *Multiple primer analyzer* (*Life technologies*), isso pode ter afetado na sua efetividade de amplificação do produto desejado pois diminui as possibilidades de alinhamento do *primer* com a sequência de interesse (KUNO, 1998). Outro motivo que pode ter levado a ineficiência dos *primers* é a ocorrência de *mismatches* com as sequências do *template*, o que pode levar a resultados falso-negativos e afeta sensibilidade do teste. No estudo realizado por Lanciotti et al. (1992), o uso dos cinco *primers* utilizados na reação *Nested* RT-PCR foi satisfatório para a amplificação do vírus DENV e seus quatro sorotipos.

Uma alternativa que poderia ser usada para otimizar estes protocolos seria a introdução de um controle interno nas reações de RT-PCR realizadas para evitar os resultados falso-negativos e a interpretação errada dos resultados, como por exemplo, o uso de um gene endógeno (gene expresso de forma contínua e uniforme presente nas amostras biológicas), tornando a técnica mais confiável, sensível e eficaz (BARBOSA, 2016).

7. CONCLUSÃO

Nas condições de epidemia causada pelo DENV e ZIKV, associada a possibilidade de introdução do vírus chikungunya, o teste RT-PCR pode ser aplicado clinicamente para a detecção molecular desses arbovírus. A RT-PCR realizada foi considerada um método fácil, rápido e eficiente que pode ser implementado na prática do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde. No entanto, os resultados obtidos neste estudo com as diferentes técnicas de RT-PCR realizadas disponíveis para o diagnóstico laboratorial para os casos suspeitos de arboviroses, demonstrou que é necessário a otimização das reações e dos *primers* utilizados para o desenvolvimento de um protocolo padrão das técnicas para detecção dessas arboviroses no Brasil.

Os protocolos descritos neste estudo representam uma metodologia útil e tem o potencial de melhorar o diagnóstico de zika, dengue e chikungunya. A técnica RT-PCR *Duplex* não foi possível de ser padronizada sendo necessário a otimização do *primer* cM3W/M2W. Já a técnica RT-PCR *Multiplex* pode ser utilizada para a detecção simultânea de DENV e ZIKV, porém ainda é necessária a otimização da reação para a detecção do CHIKV. Por fim, a técnica *Nested* RT-PCR pode ser utilizada para a detecção do DENV e diferenciação dos sorotipos 1 e 2, porém é necessário a otimização da reação e dos *primer* que amplificam os sorotipos 3 e 4.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, P. P. **Otimização da RT-PCR *Multiplex* para detecção de vírus dengue em amostras de *Aedes aegypti* infectados artificialmente.** Recife. Dissertação (Biociências e Biotecnologia na Saúde). Fundação Oswaldo Cruz, 2016.
- BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. **Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014.** Euro Surveill.; v. 19, p. 20751, 2014.
- BHAMARAPRAVATI, N. **Pathology of dengue infections.** In: Gubler DJ, Kuno G, eds. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* Cambridge: CAB International; p.115-32, 1997.
- BLACK, W. C. T. et al. **Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*.** Arch. Med. Res., Mexico, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.
- BRASIL. **Anvisa Registra Primeira Vacina Contra Dengue no Brasil.** 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2015/anvisa+registra+primeira+vacina+contra+dengue+no+brasil>>
- BRONZONI, R. V. de M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. **Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses.** Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n.2, p. 696–702, 2005.
- BUCKLEY, A.; GOULD, E.A. **Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus.** J Gen Virol.; v. 69, p.1913–20, 1988.
- CALVO, E.P.; SANCHEZ-QUETE, F.; DURÁN, S.; SANDOVAL, I.; CASTELLANOS, J.E. **Easy and inexpensive molecular detection of dengue: chikungunya and zika viruses in febrile patients.** Acta Trop., v. 163, pp. 32–37, 2016.
- CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.L.; MALLET, H.P.; MUSSO, D. **Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013.** Emerging Infectious Diseases, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention. **Updated Diagnostic Testing for Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses in US Public Health Laboratories.** 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/nczod/diseases/zika/index.html>>
- Centers for Disease Control and Protection. **Chikungunya: Information for Healthcare Providers.** 2016. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_Clinicians.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention. **Zika virus.** 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/zika/index.html>. Last viewed on January 24, 2016>.

DICK, G.W., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. **Zika virus I. Isolations and serological specificity.** Trans R Soc Trop Med Hyg., v. 46, p. 509–20, 1952.

DICK, G.W. **Zika virus II. Pathogenicity and physical properties.** Trans R Soc Trop Med Hyg. v. 46, p. 521-34, 1952.

DUFFY, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S., et al. **Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.** New England Journal of Medicine. v. 360, p. 2536–43, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; O’CONNOR, O.; CALVEZ, E.; DAURES, M.; JOHN, M.; GRANGEON, J.P.; et al. **Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014.** Emerg Infect Dis.; v. 21, p. 381–2, 2015

European Centre for Disease Prevention and Control. **Rapid Risk Assessment: Microcephaly in Brazil Potentially Linked to the Zika virus.** Epidemic-24 November, 2015. Stockholm: ECDC; 2015. Disponível em: <<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-microcephaly-Brazil-rapid-risk-assessment-Nov-2015.pdf>>

FAYE, O. et al. **One-step RT-PCR for detection of Zika virus.** Journal of Clinical Virology , v. 43 ,n. 1 ,p. 96 – 101, 2008.

FILIPPIS, A.M.B., et al. **Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study.** The Lancet Infectious Diseases, 2016.

FIOCRUZ. **Vetor da dengue na Ásia, *A. albopictus* é alvo de estudos.** Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=576&sid=32>>.

FOY, B.D.; KOBYLINSKI, K.C.; CHILSON, J.L.F.; BLITVCH, B.J.; TRAVASSOS A.R.; HADDOW, A.D., et al. **Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA.** Emerg Infect Dis. v. 17, p. 880–2, 2011.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998.** 3a Edição Especial. 1999.

GATHERER, D.; KOHL, A. **Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas.** J Gen Virol.; v. 97, p. 269– 73, 2006.

GUBLER, D.J.; CLARK, G.G.; **Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: The Emergence of a Global Health Problem.** Emerging Infectious Diseases. v. 1, n.2, p.55-57. doi:10.3201/eid0102.950204,1995.

GUBLER, D.J. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** Clinical Microbiology Reviews v. 11, n.3, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. **Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas.** Infect Agents Dis.; v. 2, p. 383–393. 1994.

GUBLER, D.J. **Dengue hemorrhagic fever: a global update** [Editorial]. *Virus Information Exchange News.*;v. 8, p. 2–3,1991.

GUBLER, D. J. **The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future.** *Ann Acad Med Singapore*; v. 27, n. 2, p. 227-34,1998.

HALSTEAD, S.B. **Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology.** *Science*; v. 238, p. 476-81, 1988.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N., et al. **Biology of Zika virus infection in human skin cells.** *J Virol*; v. 89, p. 8880-96, 2015.

HARRIS, E. et al. **Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by singletube multiplex reverse transcriptase PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 36, n. 9, p. 2634-2639, 1998

HOCHEDÉZ, P.; JAUREGUIBERRY, S., et al. **Chikungunya infection in travelers.** *Emerg. Infect. Dis.*, v. 12,n. 10, p. 1565–1567,2006.

IOOS, S.; MALLET, H.P.; LEPARC, G. I.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics.** *Med Mal Infect.*;v. 44, p.302–7,2014.

KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ. E.J. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses:** Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, p. 1003–1020,2011.

KRAEMER, M.U.; SINKA, M.E.; DUDA, K.A.; MYLNE, A.; SHEARER, F.M.; BRADY, O.J., et al. **The global compendium of Aedes aegypti and Ae. albopictus occurrence.** *Sci* ;v. 2, p. 150035,2015.

KUMAR,C.V.M. N; JOHNSON, A.M. A.; R Sai GOPAL, D.V.R.S. **Molecular characterization of chikungunya virus from Andhra Pradesh, India & phylogenetic relationship with Central African isolates.** *Indian J Med Res. Dec*; v. 126, n. 6, p. 534-40, 2007.

KUNO, G.; CHANG, G.J. **Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses.** *Arch Virol.*; v. 152, p. 687–96, 2007.

KUNO, G. **Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses.** *Journal of Methods* v.72, p.27–41, 1998.

LANCIOTTI, R. S.; CALISHER, C. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J.; VORNDAN, A. V. **Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 3, p. 545–551. 1992.

LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAYEN, J.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; JOHNSON, A.J., et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007**. *Emerg Infect Dis.*;v. 14, p.1232–9, 2008.

LUMSDEN, W.H. **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53**. II. General description and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 49, p. 33–57, 1955.

MACNAMARA, F.N. **Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria**. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 48, p. 139–45, 1954.

Ministério da Saúde do Brasil. **Dengue**. 2017. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=27630>

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue**. (Série A. Normas e Manuais Técnicos.) Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **Zika virus spreads to new areas — region of the Americas, May 2015–January 2016**. V. 65, p. 55-8, 2016.

MOHAN, A. **Chikungunya fever: clinical manifestations & management**. *Indian J Med Res*, v. 124 n. 5, p. 471–474, 2006.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V.M.; GUBLER, D.J.. **Zika virus: following the path of dengue and chikungunya?** *Lancet*, v. 386, p. 9990, p. 243–244, 2015.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.M. **Potential sexual transmission of Zika virus**. *Emerg Infect Dis.*;v. 21, p. 359–61, 2015.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN E.; ROCHE, C.; BIERLAIRE, D.; ZISOU, K., et al. **Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014**. *Euro Surveill.*; v. 19, p. 20761, 2014.

NUNES, M.R.; FARIA, N.R., et al. **Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil**. *BMC Med.*, v. 13, p. 102, 2015.

OLIVEIRA, M. C. S., et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

Pan American Health Organization/World Health Organization. **Epidemiological Update: Neurological Syndrome, Congenital Anomalies and Zika virus Infection**. 17 January. Washington, DC: PAHO/WHO; 2016.

Pan American Health Organization. **Epidemiological alert. Zika virus.** 7 May, 2015. Disponível em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=30075>

PETERSEN, E.E.; STAPLES, J.E.; MEANEY-DELMAN, D.; FISCHER, M.; ELLINGTON, S.R.; CALLANGHAN, W.M., et al. **Interim guidelines for pregnant women during a Zika virus outbreak – United States, 2016.** MMWR Morb Mortal Wkly Rep; v. 65, p. 30-3, 2016.

PINHEIRO, F. P. **Dengue in the Americas, 1980–1987.** Epidemiol Bull., 10:1. 1989.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J. **Zika: the new arbovirus threat for Latin America** J. Infect. Dev. Ctries., v. 9, p. 684–685, 2015.

ROSS, R.W. **The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic.** The Newala epidemic, III. London: J. Hyg. v. 54, p. 177–191, 1956.

ROTH, A.; MERCIER, A.; LEPERS, C.; HOY, D.; DUITUTURAGA, S.; BENYON, E.; et al. **Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014.** Euro Surveill. v. 19, p. 20929, 2014.

Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 37, 2016.** Ministério da Saúde do Brasil; vol. 47, no. 34. 2016.

Secretaria de Estado de Saúde. **Boletim epidemiológico Vírus Zika.** Governo do Estado Mato Grosso do Sul; vol. 47, no. 15, 2016.

Secretaria de Estado de Saúde. **Boletim epidemiológico Dengue.** Governo do Estado Mato Grosso do Sul; no. 47, 2016.

Secretaria de Estado de Saúde. **Boletim epidemiológico Febre do Chikungunya.** Governo do Estado Mato Grosso do Sul; 2016.

TALARMIN, F. et al. **Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island.** Med. Trop. v. 67, p. 167–173, 2007.

TAUIL, P. L. **Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya.** Epidemiologia. Serv. Saúde, Brasília, v. 23, n. 4, p. 773-774, 2014.

TOGNARELLI, J., ULLOA, S., VILLAGRA, E.; LAGOS, J.; AGUAYO, C.; FASCE, R., et al. **A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014.** Arch Virol; v. 161, p. 665–8, 2016.

VASCONCELOS, P.; CALISHER, C.H. **Emergence of human arboviral diseases in the americas, 2000–2016.** Vector Borne Zoonotic Dis., v. 16, n. 5, p. 295–301, 2016.

VICTORA, C.G.; SCHULER-FACCINI, L.; MATIJASEVICH, A.; RIBEIRO, E.; PESSOA, A.; BARROS, F.C. **Microcephaly in Brazil: How to interpret reported numbers?** The Lancet Infectious Diseases, v. 387, p. 621-4, 2016.

WAEHRE, T.; MAAGARD, A.; TAPPE, D.; CADAR, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J. **Emerg. Infect. Dis.** v. 20, p. 1412–1414, 2014.

WEAVER, S.C; FORRESTER, N.L. **Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread.** Antiviral Res. Aug; v. 120, p. 32-9, 2015.

World Health Organization. **Dengue hemorrhagic fever, diagnosis, treatment and control.** Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1986.

World Health Organization. **Statement on the First Meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee on Zika Virus and Observed Increase in Neurological Disorders and Neonatal Malformations.** 2016.

World Health Organization. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control.** Geneva, Switzerland: WHO; 2009. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44188/1/9789241547871_eng.pdf>

ZANLUCA, C.; MELO, V.C.; MOSIMANN, A.L.; SANTOS, G.I.; SANTOS, C.N.; LUZ, K. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz; v. 110, p. 569-72, 2015.