



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



**DETECÇÃO MOLECULAR DE ARBOVIRUS EMERGENTES: WEST
NILE, SAINT LOUIS E MAYARO**

CAROLINA DE ARAÚJO ROLO

Orientador: Dr. Gubio Soares Campos

Co-orientadora: Dra. Sílvia Inês Sardi

Salvador
2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



DETECÇÃO MOLECULAR DE ARBOVIRUS EMERGENTES: WEST NILE, SAINT LOUIS E MAYARO

CAROLINA DE ARAÚJO ROLO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Gubio Soares Campos
Co-orientadora: Dra. Silvia Inês Sardi

Salvador
2021

CAROLINA DE ARAÚJO ROLO

Detecção Molecular de Arbovirus Emergentes: West Nile, Saint Louis E Mayaro

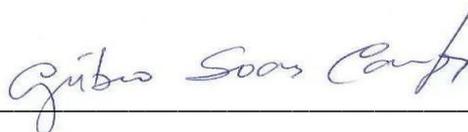
Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 04 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

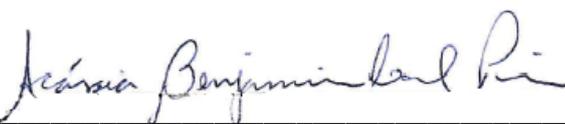
Gubio Soares Campos- Orientador

Doutorado em Virologia.
Universidad de Buenos Aires
UBA, Argentina.



Acássia Benjamim Leal Pires

Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP, Brasil.



Luis Gustavo Carvalho Pacheco

Doutorado em Bioquímica e Imunologia
Universidade Federal de Minas Gerais
UFMG, Brasil.



RESUMO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por vetores artrópodes, especialmente mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*. Estas doenças estão dispersas por todo o mundo e causam grandes impactos na saúde e na economia. No Brasil existem diversas arboviroses em circulação, como zika (ZIKV) e dengue (DENV). Algumas arboviroses são consideradas emergentes, como mayaro (MAYV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus do oeste do Nilo (WNV). Apesar de terem sido detectadas no Brasil e terem potencial para causar epidemias, estas arboviroses ainda não se disseminaram dentro do território brasileiro. Por conta de características geográficas e sociais, o Brasil apresenta o ambiente ideal para dispersão de arboviroses. Diante deste contexto, foram desenvolvidos ensaios de PCR em tempo real (qPCR) para detecção dos vírus SLEV e MAYV. Para padronização do qPCR foi empregado um plasmídeo contendo as sequências dos referidos vírus e, a partir destas sequências, foram desenhados os iniciadores e sondas. Para o ensaio de MAYV foi possível obter 96,39% de eficiência e, no que diz respeito a sensibilidade, detecção de uma cópia de RNA viral. Quanto ao ensaio de SLEV, foi obtida uma eficiência de 104,67% e sensibilidade para detecção de uma cópia de RNA viral. Em relação a especificidade, ambos os ensaios se mostraram específicos para os vírus de interesse. Os ensaios padronizados para SLEV e MAYV apresentaram eficiência, especificidade e sensibilidade dentro dos padrões determinados para qPCR, sendo adequado seu uso na rotina diagnóstica laboratorial.

Palavras-chave: arboviroses emergentes, qPCR, arbovírus, diagnóstico.

ABSTRACT

Arboviruses are viral diseases transmitted by arthropod vectors, especially mosquitoes of the *Culex* and *Aedes* genus. These diseases are spread across the world and have major impacts on health and the economy. In Brazil there are several arboviruses in circulation, such as Zika (ZIKV) and dengue (DENV). Some arboviruses are considered emerging, such as mayaro (MAYV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) and West Nile virus (WNV). Despite having been detected in Brazil and having the potential to cause epidemics, these arboviruses have not yet spread within Brazilian territory. Due to geographic and social characteristics, Brazil presents the ideal environment for the dispersion of arboviruses. In this context, real-time PCR assays (qPCR) were developed to detect SLEV and MAYV viruses. To standardize the qPCR, a plasmid containing the sequences of these viruses was used and, from these sequences, primers and probes were designed. For the MAYV assay it was possible to obtain 96.39% efficiency and, with regard to sensitivity, detection of one single viral RNA copy. As for the SLEV assay, an efficiency of 104.67% and sensitivity for detecting one single viral RNA copy were obtained. Regarding specificity, both assays were specific for the virus of interest. The standardized assays for SLEV and MAYV showed efficiency, specificity and sensitivity within the standards determined for qPCR, being suitable for use in routine laboratory diagnostics.

Keywords: emerging arboviruses, qPCR, diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição da taxa de incidência de Chikungunya por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021	18
Figura 2	Distribuição da taxa de incidência de Dengue por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021	18
Figura 3	Distribuição da taxa de incidência de Zika por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021	19
Figura 4	Representação gráfica da partícula do WNV com base em dados de microscopia crioelétrica. A glicoproteína E é mostrada na superfície da partícula. Esta proteína é responsável pela adesão viral e a entrada por fusão de membrana	26
Figura 5	Etapas do PCR em tempo real	28
Figura 6	Curvas de qPCR representando as fases exponencial e platô, além do Ct e do <i>threshold</i>	29
Figura 7	Ensaio de qPCR realizado por Waggoner para detecção de MAYV. (A) Curvas de amplificação para diluições seriadas de 10 vezes do padrão MAYV quantificado. O padrão era um oligonucleotídeo ssDNA contendo a sequência-alvo de consenso MAYV. (B) Regressão linear dos resultados obtidos em A. Ensaio realizado em quadruplicata	31
Figura 8	Fluxograma do desenho experimental do projeto	33
Figura 9	Visualização das sequências de MAYV no Jalview. A região sinalizada mostra o local da sonda. Esta etapa de alinhamento e desenho dos <i>primers</i> e sonda foi realizada para WNV e SLEV também	34
Figura 10	Representação do mapa do vetor contendo o inserto MSW. Imagem obtida através do software SnapGene	37
Figura 11	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os <i>primers</i> descritos por Waggoner	55
Figura 12	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os <i>primers</i> para MAYV	57
Figura 13	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA do cultivo MAYV	59

Figura 14	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de MAYV em SFB	63
Figura 15	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os <i>primers</i> e sonda para SLEV	65
Figura 16	Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de SLEV em SFB	68
Figura 17	Representação pelo software QuantStudio da amplificação do RNA MSW com diferentes concentrações de <i>primers</i> para WNV	69
Figura 18	Representação pelo software QuantStudio da amplificação do RNA MSW com <i>primers</i> para WNV	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Diluições em cada tubo e o seu respectivo log na base 10	45
Quadro 2	Montagem da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de <i>primers</i> utilizados neste estudo	46
Quadro 3	Iniciadores utilizados neste trabalho	51
Quadro 4	Sequências inseridas no plasmídeo MSW. Na cor rosa estão representados os <i>primers</i> F e R, enquanto a cor verde representa a sonda	52
Quadro 5	Diluição seriada do RNA MSW a partir do número de cópias. Para os ensaios de qPCR foram utilizadas as diluições enumeradas de 4 a 9 (1,77 x 10 ⁵ cópias até 1 cópia, respectivamente)	53
Quadro 6	Descrição dos <i>primers</i> e concentrações finais utilizadas	54
Quadro 7	Resultado da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de <i>primers</i> para MAYV utilizados neste estudo	56
Quadro 8	Valores de Ct para cada diluição de RNA MSW utilizada	57
Quadro 9	Cts observados no qPCR para as diluições seriadas do cultivo de MAYV	60
Quadro 10	Descrição das amostras utilizadas nos ensaios de coinfeção para MAYV	61
Quadro 11	Descrição dos tipos de amostra e quantidade de amostras utilizadas nesse estudo	62
Quadro 12	Resultado da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de <i>primers</i> para SLEV utilizados neste estudo	64
Quadro 13	Descrição das amostras utilizadas nos ensaios de co-infecção para SLEV	67
Quadro 14	Descrição dos tipos e quantidade de amostras utilizada nesse estudo.	68

LISTA DE GRÁFICOS

- | | | |
|------------------|---|----|
| Gráfico 1 | Diluição seriada de RNA MSW com <i>primers</i> de MAYV. No eixo Y é possível observar o Ct, enquanto no eixo X está o log da diluição | 58 |
| Gráfico 2 | Diluição seriada de RNA MSW com <i>primers</i> de SLEV. No eixo Y é possível observar o Ct, enquanto no eixo X está o log da diluição | 66 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição da montagem da reação de transcrição <i>in vitro</i> .	42
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BSQV	Bussuquara Virus
CHIKV	Chikungunya Virus
CPCV	Cacipacoré Virus
DENV	Dengue Virus
DTT	Dithiothreitol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ILHV	Ilheus Virus
JEV	Japanese Encephalitis Virus
LB	Meio de cultivo Luria-Bertani
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LOD	Limite de Detecção
MAYV	Mayaro Virus
O.D.	Densidade Ótica
OROV	Oropouche Virus
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCV	Rocio Virus
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro fetal bovino
SLEV	Saint Louis Encephalitis Virus
TE	Tris-EDTA
WNV	West Nile Virus
ZIKV	Zika Virus

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1.	ARBOVIROSES NO BRASIL	17
2.2.	VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS (SLEV)	21
2.2.1.	Descrição	21
2.2.2.	Transmissão e epidemiologia	22
2.2.3.	Diagnóstico	23
2.3.	VÍRUS MAYARO (MAYV)	23
2.3.1.	Descrição	23
2.3.2.	Transmissão e epidemiologia	24
2.3.3.	Diagnóstico	25
2.4.	VÍRUS DO OESTE DO NILO (WNV)	25
2.4.1.	Descrição	25
2.4.2.	Transmissão e epidemiologia	27
2.4.3.	Diagnóstico	27
2.5.	PCR EM TEMPO REAL	28
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	OBJETIVO GERAL	32
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4.	METODOLOGIA	33
4.1.	DESENHO EXPERIMENTAL	33
4.2.	DESENHO DE <i>PRIMERS</i> E SONDAS	33
4.3.	DESENHO DO PLASMÍDEO MSW	36
4.4.	CLONAGEM DO PLASMÍDEO MSW	37
4.4.1.	Competência bacteriana.....	37
4.4.2.	Transformação JM e plasmídeo MSW.....	38
4.4.3.	Purificação do plasmídeo MSW.....	39

4.5.	DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	40
4.6.	QUANTIFICAÇÃO E NÚMERO DE CÓPIAS.....	41
4.7.	TRANSCRIÇÃO DO PLASMÍDEO MSW	41
4.8.	ENSAIOS COM OUTROS INICIADORES	43
4.9.	CULTIVO DE CÉLULAS.....	43
4.10.	PADRONIZAÇÃO DE qPCR PARA MAYV, SLEV e WNV	44
4.10.1.	Teste da eficiência dos iniciadores e curva de quantificação.....	44
4.10.2.	Concentração de <i>primers</i> F e R.....	45
4.10.3.	Curva do RNA MSW e cultivo de células.....	46
4.10.4.	Validação dos ensaios com amostras	47
5.	RESULTADOS.....	48
5.1.	DESENHO DE <i>PRIMERS</i> E SONDAS	48
5.2.	CONSTRUÇÃO DO INSERTO	51
5.3.	PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO O PLASMÍDEO MSW.....	53
5.3.1.	Ensaio com outros iniciadores	53
5.3.2.	Padronização qPCR MAYV	55
5.3.2.1.	<i>Concentrações de primers e sonda para MAYV.....</i>	<i>55</i>
5.3.2.2.	<i>Curva padrão com RNA MSW.....</i>	<i>56</i>
5.3.2.3.	<i>Curva de diluição de cultivo MAYV.....</i>	<i>59</i>
5.3.2.4.	<i>Ensaio para coinfeção</i>	<i>60</i>
5.3.2.5.	<i>Ensaio com amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV.....</i>	<i>62</i>
5.3.3.	Padronização qPCR SLEV	63
5.3.3.1.	<i>Concentrações de primers e sonda para SLEV.....</i>	<i>63</i>
5.3.3.2.	<i>Curva padrão com RNA MSW.....</i>	<i>64</i>
5.3.3.3.	<i>Ensaio para coinfeção</i>	<i>66</i>
5.3.3.4.	<i>Ensaio com amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV.....</i>	<i>67</i>
5.3.4.	Padronização qPCR WNV	69

6.	DISCUSSÃO	71
7.	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

A disseminação de arboviroses (doenças virais transmitidas por vetores artrópodes, geralmente mosquitos hematófagos) pelo mundo é considerada uma grande preocupação em saúde pública. Os vírus responsáveis pela disseminação das arboviroses são os arbovírus, que apresentam um ciclo de transmissão complexo, no qual vetores - principalmente mosquitos, carrapatos, flebotomíneos e outras espécies de mosquito - patógenos e hospedeiros animais interagem sob fortes influências das condições ambientais (CATENACCI *et al.*, 2018). Fatores como crescimento de meio de transportes no mundo, adaptação dos vetores artrópodes à urbanização crescente, falhas na contenção dos mosquitos e destruição do habitat desses vetores facilitam a dispersão dos arbovírus de modo mais rápido (GOULD *et al.*, 2017).

As arboviroses prevalentes no mundo são dengue (96 milhões de casos por ano), chikungunya (693.000 casos por ano), Zika (500.000 casos por ano), febre amarela (130.000 casos por ano), encefalite japonesa (42.500 casos por ano) e o West Nile (2.588 casos por ano) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Outras arboviroses emergentes ou reemergentes são encefalite equina oriental, encefalite de Saint Louis, encefalite de La Crosse, febre de Rift Valley, Spondweni, Mayaro, Usutu, O'nyong-nyong e Sindbis (MADEWELL, 2020).

No Brasil existem muitos arbovírus circulantes, e muitos destes já estão descritos na literatura quanto à sua circulação no país, áreas onde são vírus endêmicos, dentre outros aspectos. Os arbovírus de maior circulação no país são a Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), embora existam outros com potencial de disseminação no país, como West Nile (WNV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV) (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

A maior parte dos arbovírus está incluída no gênero *Alphavirus* (pertencente à família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), porém as famílias *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, que compõem o grupo dos arbovírus, também são de extrema importância para a saúde humana. Por apresentarem grande plasticidade genética e alta frequência de mutações, os arbovírus são capazes de se adaptar a hospedeiros vertebrados e invertebrados. O CHIKV, por exemplo, se mostrou capaz de infectar tanto *Aedes aegypti*, vetor presente em zona urbana, quanto *Aedes albopictus*, vetor predominante em zona rural (SINGH; UNNI, 2011). Os arbovírus se

mantém em circulação por ciclos silvestres ou urbanos, infectando o ser humano e outros mamíferos, como primatas, e também outros vetores de transmissão (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Um estudo realizado por Catenacci e colaboradores (2018) detectou anticorpos para vírus dos gêneros *Flavivirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus* e *Alphavirus* em preguiças (*Bradypus torquatus* e *Bradypus variegatus*), micos-leão-dourado (*Leontopithecus chrysomelas*) e macacos-prego (*Sapajus xanthosternos*) nativos da região sul da Bahia. A circulação de arbovírus em animais silvestres serve de alerta para a disseminação das arboviroses no Brasil.

Pacientes acometidos por arboviroses permanecem, em muitos casos, sem diagnóstico ou com diagnóstico incorreto, provavelmente devido ao fato de que as manifestações clínicas dessas doenças são semelhantes. Geralmente os sintomas incluem febre, dor de cabeça e dor no corpo. Casos mais graves acabam sendo negligenciados, especialmente pela falta de laboratórios capazes de conduzir os ensaios de diagnóstico necessários (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007). Por meio da observação clínica do paciente e também através de metodologias de diagnóstico direto, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR), ou indireto, por meio do ELISA, é possível detectar a presença ou ausência de carga viral ou anticorpos na amostra. A sensibilidade e especificidade da técnica de qPCR garantem a esse ensaio precisão e confiabilidade, sendo esta metodologia aplicada para diagnóstico de inúmeras doenças

Outra questão relevante no que diz respeito ao diagnóstico é a ocorrência de reatividade cruzada, o que pode levar a resultados inconsistentes. Por exemplo, WNV e ZIKV pertencem à mesma família, e por conta disto pode ocorrer reatividade cruzada com estes vírus. Considerando a possível emergência do WNV, MAYV e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) no país, os impactos trazidos por essas doenças e a possível ocorrência de reatividade cruzada entre diferentes flavivírus, o desenvolvimento de um método diagnóstico sensível e eficaz se mostra necessário.

Levando em conta o impacto financeiro das arboviroses na saúde pública, a importância do diagnóstico preciso e, principalmente, o risco que essas doenças representam para a saúde das pessoas, o presente trabalho objetiva apresentar um ensaio de PCR em tempo real para detecção das seguintes arboviroses: MAYV, WNV

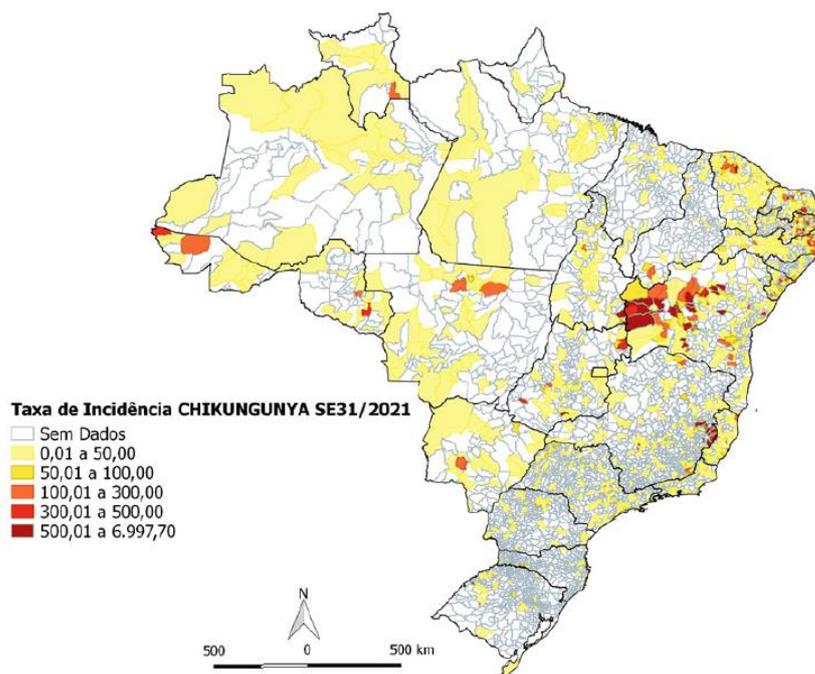
e SLEV com o intuito de, através do diagnóstico, monitorar o surgimento de novos casos e, dessa maneira, possibilitar a adoção de medidas de controle para estas arboviroses.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ARBOVIROSES NO BRASIL

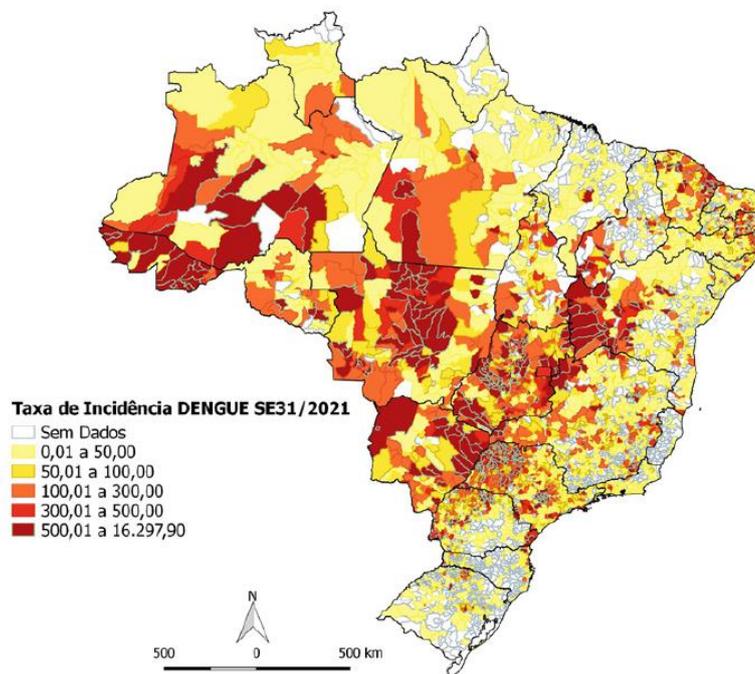
O Brasil apresenta um enorme potencial para a entrada e disseminação de arboviroses, como observado para DENV em meados dos anos 80 (NOGUEIRA; DE ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007), para CHIKV em 2014 (NUNES et al., 2015) e para ZIKV em 2015 (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Os impactos destas três arboviroses na saúde pública são imensuráveis, e por conta disto o país deve adotar medidas para contenção de outras arboviroses, como WNV e SLEV, que possam se disseminar no território, comprometendo a saúde de humanos e animais. As arboviroses urbanas compõem um cenário epidemiológico muito delicado no país, com a circulação simultânea dos quatro sorotipos dos vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), além da circulação do vírus Chikungunya (CHIKV) e do vírus Zika (ZIKV) (LANCIOTTI *et al.*, 2007; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011). Estas viroses possuem distribuição em todo o território nacional e suas taxas de incidência são crescentes no país, como pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3.

Figura 1 - Distribuição da taxa de incidência de Chikungunya por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021.



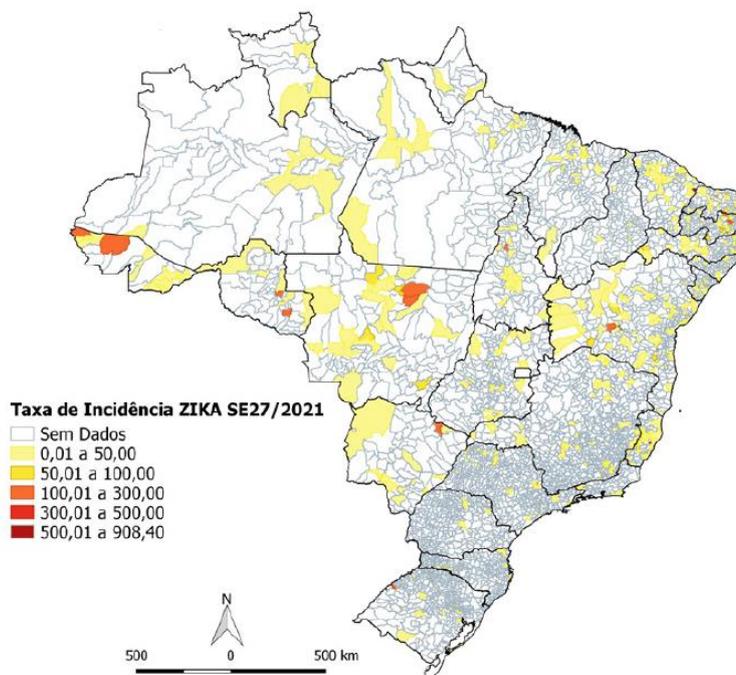
Fonte: Boletim Epidemiológico Volume 52, Nº 30, agosto 2021.

Figura 2 - Distribuição da taxa de incidência de Dengue por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021.



Fonte: Boletim Epidemiológico Volume 52, Nº 30, agosto 2021.

Figura 3 - Distribuição da taxa de incidência de Zika por município no Brasil, durante o período de 03/01/2021 até 07/08/2021.



Fonte: Boletim Epidemiológico Volume 52, Nº 30, agosto 2021.

Como pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3, a incidência de arboviroses está presente em todo o país, com maior destaque para DENV, circulante no país desde os anos 80. Vale ressaltar que, como os sintomas são semelhantes, as taxas de incidência dessas doenças podem ser ainda maiores. Além das arboviroses mais conhecidas popularmente, outros arbovírus já foram detectados no Brasil, como SLEV, Ilhéus (ILHV), Rocio (ROCV), Bussuquara (BSQV), Cacipacoré (CPCV) e, recentemente, WNV (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011). No Brasil já foram isolados cerca de 200 arbovírus, sendo aproximadamente 40 relacionados a doenças em humanos (FIGUEIREDO, 2007). A maior parte destas espécies pertence às famílias Bunyaviridae (gênero Orthobunyavirus), Flaviviridae (gênero Flavivirus) e Togaviridae (gênero Alphavirus) (PEREIRA SERRA *et al.*, 2016). O surgimento e reemergência de arbovírus são fenômenos naturais relacionados à evolução e adaptação das espécies (FIGUEIREDO, 2007). Os arbovírus são capazes de transitar entre espécies e se adaptar a novos vetores e hospedeiros vertebrados, o que pode aumentar a virulência e o potencial epidêmico, sendo a emergência e reemergência de arboviroses um risco constante (MUSSO *et al.*, 2018).

O Brasil apresenta condições ideais para a existência de muitos arbovírus, como uma grande área coberta de floresta, clima tropical, alta densidade populacional, presença de vetores artrópodes em todo o território (principalmente as espécies do gênero *Aedes* e *Culex*) e abundância de espécies de possíveis reservatórios virais, como primatas e equinos (BITTAR *et al.*, 2018; HONÓRIO *et al.*, 2019). Os flavivírus transmitidos por mosquitos são divididos naqueles que utilizam *Culex* spp. como vetores, geralmente associados a doenças febris e encefalites, e aqueles transmitidos por *Aedes* spp., responsáveis por doenças febris e hemorragias em seus hospedeiros (PEREIRA SERRA *et al.*, 2016).

Os humanos têm ocupado cada vez mais os habitats nos quais vivem os vetores artrópodes. Estes vetores naturalmente interagem com animais e plantas, sendo estas muitas vezes utilizadas como local para sua reprodução (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014). Muitos arbovírus são zoonóticos, capazes de infectar uma grande variedade de artrópodes, animais (como pássaros em seu habitat) e humanos como hospedeiros acidentais (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). A interação desses artrópodes com humanos e animais, seja no ambiente rural ou urbano, se deu através de um processo denominado domesticação, no qual os vetores se adaptam ao novo ambiente e, em virtude disto, facilitam a disseminação de arboviroses (FIGUEIREDO, 2007; GOULD *et al.*, 2017).

Outros arbovírus surgirão e o Brasil tem uma longa lista de candidatos, incluindo vírus que causaram surtos em humanos no passado e são detectados em protocolos de vigilância ou casos humanos esporádicos (LEVI, 2017). O Brasil se encontra em um cenário de risco de epidemias, afinal trata-se de um país com grande extensão territorial, presença de diversas espécies de vetores artrópodes e serviços de saúde ineficientes, além de um enorme fluxo migratório de pessoas, favorecendo a dispersão de doenças (FIGUEIREDO, 2007).

Existem evidências de uma forte associação entre a ocorrência de arboviroses e a distribuição de vetores, o que coloca o Brasil em risco, haja vista que as espécies do gênero *Culex* e *Aedes*, principais vetores de transmissão, estão distribuídos por todo o território (LETA *et al.*, 2018). O rastreamento da dispersão do CHIKV serve para demonstrar a facilidade com que os arbovírus podem ser introduzidos ao meio e, além disso, a adaptação dos vírus aos vetores do ambiente serve como um alerta para a saúde pública (WEAVER; REISEN, 2010). Além disso, no caso de arbovírus

que pertencem a um mesmo gênero, como ZIKV e DENV, que pertencem ao gênero *Flavivirus*, o diagnóstico sorológico pode apresentar resultados errôneos, sendo falso positivo ou falso negativo. Por conta disto o diagnóstico preciso via biologia molecular é crucial para assegurar a precisão dos resultados.

Modificações nos genomas virais ao longo dos anos tem resultado em grande diversidade genética para alguns vírus, haja vista que a taxa de erro da polimerase resulta em mutações e, conseqüentemente, variações no código genético dos vírus. Por conta disto, ocorrem adaptações que causam viremias mais intensas e com maior severidade da doença. Em virtude de uma maior adaptação do vírus, seu potencial para emergirem e se estabelecerem em outros locais, provocando o surgimento de novas epidemias, aumenta consideravelmente. O monitoramento da emergência de arboviroses se faz necessário, permitindo a detecção precoce de novos surtos. A investigação epidemiológica deve então fazer parte das preocupações de saúde pública nacional. Essa investigação requer métodos de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção e diferenciação de diferentes arbovírus.

2.2. VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS (SLEV)

2.2.1. Descrição

O SLEV pertence à família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, relacionado ao complexo antigênico do Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), grupo que contém também outros patógenos de importância médica, como o WNV (BAILLIE *et al.*, 2008). Este vírus está amplamente distribuído em todo o continente americano, do Canadá ao sul da Argentina, e foi isolado pela primeira vez no norte do Brasil em 1969 a partir de um *pool* de mosquitos *Sabethes belisarioi* coletados ao longo da rodovia Belém-Brasília (BAILLIE *et al.*, 2008). A infecção com SLEV pode causar encefalite, que é uma condição com risco de vida, com possíveis sequelas neurológicas em sobreviventes (VEDOVELLO *et al.*, 2015)

No Brasil, apenas dois isolados de SLEV foram obtidos em sangue humano, ambos na região amazônica, em 1971 e 1978, sendo o quadro clínico caracterizado por doença febril com icterícia, sem indícios de comprometimento do sistema nervoso central (ROCCO *et al.*, 2005). No Estado de São Paulo, entre 1967 e 1969, oito isolamentos de SLEV foram obtidos de roedores, aves e camundongos sentinela (SANTOS *et al.*, 2006)

O genoma dos flavivírus contém um de RNA de fita positiva com cerca de 10.800 nucleotídeos de comprimento, que codifica 10 proteínas distintas em um único quadro de leitura (SANTOS *et al.*, 2006). O genoma de SLEV codifica uma única poliproteína de 3429 aminoácidos, que é clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (C, PrM/M, E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3 [protease/helicase], NS4A, NS4B, NS5 [polimerase]) (BAILLIE *et al.*, 2008).

Apesar do raro isolamento de SLEV de humanos, anticorpos para este vírus foram encontrados em populações no norte e regiões sudeste do Brasil. No entanto, devido à reatividade cruzada do anticorpo para SLEV entre diferentes flavivírus e o fato de que esta população está vacinada contra a febre amarela e exposta ao DENV, tais resultados devem ser interpretados com cuidado. No entanto, nessas áreas, é possível que este vírus circule e infecte humanos, embora a maioria das infecções não sejam diagnosticadas (MONDINI *et al.*, 2007).

2.2.2. Transmissão e epidemiologia

O SLEV é considerado reemergente na América do Sul, com casos em humanos relatados na Argentina e no Brasil (RÉ *et al.*, 2008). Os sintomas podem ser leves, incluindo febre e dor de cabeça, até doença severa, como a meningite e encefalite, sendo que esta pode levar à morte ou deixar sequelas graves, como disfunção motora residual e/ou psicológica nos pacientes acometidos (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014).

Aves silvestres, primatas, marsupiais e outros animais silvestres, cuja transmissão ocorre por mosquitos do gênero *Culex*, podem atuar como reservatórios. No Brasil, casos clínicos de SLEV raramente são reconhecidos, apesar de o vírus

circular em aves, mosquitos e humanos (ROCCO *et al.*, 2005). Apesar dos raros isolamentos de SLEV em humanos, anticorpos para esse vírus foram encontrados em aproximadamente 5% das populações das regiões Norte e Sudeste (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

2.2.3. Diagnóstico

De acordo com o Centro de Controle de Doenças (CDC, EUA) o isolamento de SLEV a partir de amostras clínicas é difícil, e por conta disto quase todos os isolados vieram de tecido cerebral ou líquido cefalorraquidiano (LCR). O teste sorológico é o principal método para diagnosticar a infecção por SLEV através do ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de IgM. Devido à potencial reatividade cruzada com outras infecções por flavivírus ou reatividade não específica, um resultado positivo do teste de anticorpos IgM para o SLEV deve ser confirmado pelo teste de anticorpos neutralizantes, também conhecido como teste de neutralização por redução de placa (PRNT) de amostras de soro.

Culturas virais e testes para detectar RNA viral (por exemplo, qPCR) podem ser realizados em amostras de soro, LCR e tecido que são coletadas no início do curso da doença e, se os resultados forem positivos, pode confirmar uma infecção. A detecção precoce e específica do SLEV é importante para melhorar não apenas a vigilância epidemiológica, mas também o diagnóstico clínico (RÉ *et al.*, 2008). Ainda não existe tratamento específico ou vacina para SLEV (MARQUES, 2016).

2.3. VÍRUS MAYARO (MAYV)

2.3.1. Descrição

Foi isolado pela primeira vez de trabalhadores rurais em Trinidad e Tobago, um país insular da América Central, no ano de 1954 e, desde então, foram relatados casos na América do Sul, onde circula principalmente na região amazônica (MOTA *et al.*,

2015). As manifestações clínicas da febre causada por MAYV são frequentemente confundidas com as da Dengue, que ocorre com frequência no Brasil. Surtos de MAYV no país têm sido relatados periodicamente na Região Norte desde a década de 1950, incluindo nos estados do Pará e Amazonas (ZUCHI *et al.*, 2014). Em 2019, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) declarou alerta epidemiológico devido ao recente aumento de surtos e potencial deste arbovírus (AGUILAR-LUIS *et al.*, 2021).

Os alphavírus, grupo no qual está incluso MAYV, são arbovírus envelopados que possuem um capsídeo icosaédrico envolvido em um envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira durante o brotamento, e contém as proteínas virais que se organizam no capsídeo formando trímeros (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014). Cada trímero consiste em três heterodímeros formados entre duas glicoproteínas virais. O genoma consiste em uma única fita positiva de RNA e, ao contrário de outros vírus, tem uma extremidade 3' poliadenilada. Existem aproximadamente 11.700 nucleotídeos representando oito genes que codificam as proteínas não estruturais nsP1 a nsP4, que estão envolvidas na replicação viral, as glicoproteínas estruturais E1 e E2 do envelope, bem como o capsídeo e dois pequenos polipeptídeos E3 e 6K (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014).

As proteínas do envelope E1 e E2 são proteínas transmembrana que estão ancoradas à membrana viral com suas hélices transmembrana associadas entre si. A proteína E2 é responsável pelo reconhecimento do receptor da célula hospedeira. A proteína E1, um homólogo da glicoproteína E do flavivírus, assume a responsabilidade pela fusão da membrana (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015).

2.3.2. Transmissão e epidemiologia

O MAYV é transmitido principalmente por mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus*, tendo mamíferos na condição de hospedeiro. Segundo Lopes, Nozawa e Linhares (2014) existem evidências de que o MAYV é capaz de se adaptar a ciclos alternativos envolvendo aves e o homem.

A infecção por MAYV causa uma síndrome febril semelhante a CHIKV, com artralgia/artrite com duração de 2 semanas, além de febre, cefaleia, enxantema (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Por conta da similaridade de sintomas, muitas vezes a febre causada por MAYV pode ser diagnosticada erroneamente como DENV e CHIKV devido às suas semelhanças (SAATKAMP *et al.*, 2021).

2.3.3. Diagnóstico

O método mais comumente utilizado para detecção de MAYV é a sorologia de anticorpos, porém este método pode ser afetado pela ocorrência de reatividade cruzada com outros membros do gênero Alphavirus, como os vírus Semliki Forest e CHIKV (SAATKAMP *et al.*, 2021). As infecções por MAYV são frequentemente acompanhadas por viremia transitória e este aspecto, combinado com a ausência de diagnóstico diferencial de rotina, pode contribuir para a circulação silenciosa de MAYV durante surtos de dengue (ZUCHI *et al.*, 2014).

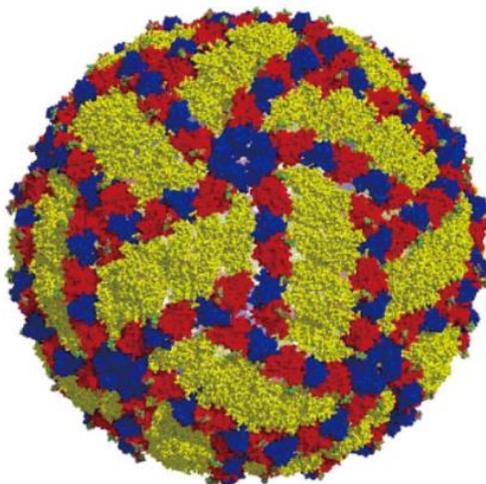
2.4. VÍRUS DO OESTE DO NILO (WNV)

2.4.1. Descrição

Detectado pela primeira vez no ano de 1937 a partir do sangue de uma mulher febril do nordeste de Uganda, em uma província denominada West Nile (MARTÍN-ACEBES, 2012). O WNV está incluso no complexo sorológico do JEV, no qual encontra-se também outros vírus causadores de doenças em humanos, como vírus da encefalite Murray Valley (MVE), encefalite de St. Louis (SLE) e Kunjin (LANCIOTTI, 2003).

Trata-se de um flavivírus do serocomplexo da encefalite japonesa da família Flaviviridae (MORALES *et al.*, 2017). Este vírus envelopado possui um genoma de RNA de fita simples positiva de 11kb que codifica três proteínas estruturais (C, E, prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (MARTÍN-ACEBES, 2012). A estrutura do WNV está representada na figura 4.

Figura 4 - Representação gráfica da partícula do WNV com base em dados de microscopia crioeletrônica. A glicoproteína E é mostrada na superfície da partícula. Esta proteína é responsável pela adesão viral e a entrada por fusão de membrana



Fonte: adaptado de Martín-Acebes, 2012.

O período de incubação tem duração de dois a 14 dias, e os sintomas incluem febre, dor de cabeça, fadiga, exantema, nódulos linfáticos palpáveis e dor ocular, sendo a meningite e encefalite presente em manifestações mais graves (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Em geral, a viremia durante a maioria das infecções por WNV é de curta duração e raramente detectável no momento em que as manifestações clínicas aparecem (LANCIOTTI, 2003). Aproximadamente 80% das pessoas infectadas são assintomáticas e 20% desenvolverão a doença (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011).

Foram detectadas evidências sorológicas de WNV no Brasil pela primeira vez em 2011 a partir de um estudo conduzido por Pauvolid-Corrêa e colaboradores, no qual foram analisadas amostras de soro de cavalos e jacarés oriundos do pantanal mato-grossense. A partir das análises de soro de 168 cavalos, foram detectados anticorpos para WNV em 5 animais, os quais não apresentavam sintomatologia e nunca saíram do pantanal. Não foi observada morbidade e, de acordo com Pauvolid-Corrêa e colaboradores, o WNV pode estar circulando por meio de ciclos enzoóticos silenciosos em uma área com condições primitivas

2.4.2. Transmissão e epidemiologia

A entrada do WNV no Ocidente ocorreu entre meados de agosto e setembro de 1999, nos Estados Unidos, na cidade de Nova Iorque (LIMA-CAMARA, 2016). O WNV tem potencial para causar epidemias em áreas urbanas, e já foram reportados casos em 13 países da América do Sul (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Este vírus já causou epidemias na América do Norte e pode ser transportado por meio da migração de aves infectadas (ROCCO *et al.*, 2005).

Transmitido por mosquitos do gênero *Culex* e utilizando aves como principal reservatório, o WNV já foi detectado em mais de 200 espécies de aves silvestres e domésticas em todo o mundo (FLORES; WEIBLEN, 2008). Esta arbovirose pode atingir cavalos e humanos como hospedeiros acidentais, porém estes desenvolvem viremia de baixo nível, o que é insuficiente para contribuir para a propagação do WNV através dos mosquitos (PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2011).

2.4.3. Diagnóstico

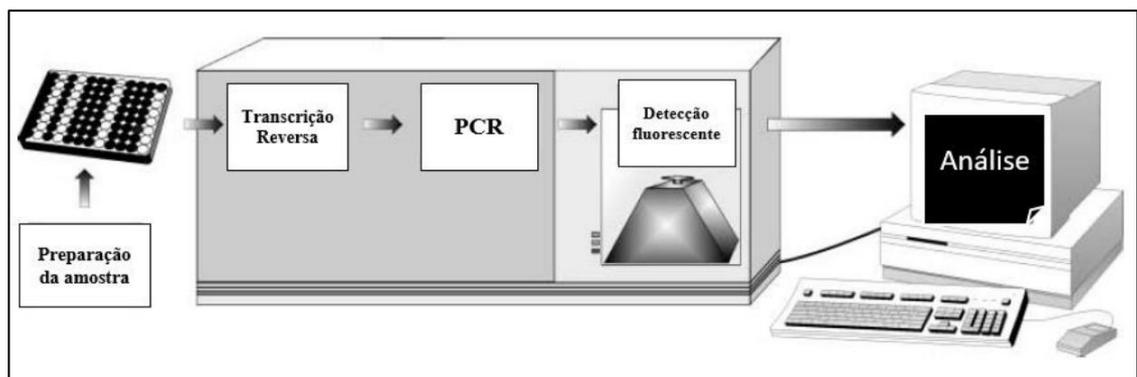
A infecção aguda pelo WNV em humanos pode ser diagnosticada pela detecção do RNA do WNV em amostras obtidas de pacientes sintomáticos (LUSTIG *et al.*, 2018). Devido aos desafios com a detecção do vírus do WNV, o teste de anticorpos específicos é atualmente a abordagem mais amplamente usada para o diagnóstico do WNV. Os anticorpos imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) geralmente podem ser detectados no dia 4 e no dia 8 após o início dos sintomas, respectivamente (BUSCH *et al.*, 2008).

De acordo com um estudo realizado por Lustig e colaboradores (2018), o RNA de WNV pode ser detectado durante a infecção aguda em amostras de sangue total, soro, líquido cefalorraquidiano, plasma e urina em pacientes infectados com WNV, demonstrando a superioridade e eficácia de detecção de RNA de WNV em sangue total para diagnóstico de infecção aguda.

2.5. PCR EM TEMPO REAL

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida na década de 1980 pelo Dr. Kary Mullis e desde então vem sendo utilizada em diversas abordagens, como no diagnóstico de doenças, quantificação microbiana e avaliação de risco de câncer (BUSTIN, 2000; JALALI; ZABOROWSKA; JALALI, 2017). Dentre as técnicas desenvolvidas está o PCR em tempo real, também conhecido como PCR quantitativo (qPCR). Nos últimos anos, a detecção do genoma viral em fluidos corporais por PCR quantitativo tornou-se o método de diagnóstico de rotina para muitas infecções virais devido ao seu formato padrão da indústria, altos níveis de repetibilidade e reprodutibilidade, alta sensibilidade e especificidade, tempo de resposta rápido e facilidade de usar (LUSTIG *et al.*, 2018). Novas técnicas de amplificação com base no método de PCR original foram desenvolvidas, como o RT-PCR, que combina transcrição reversa com amplificação de cDNA. A aplicação de técnicas de fluorescência ao RT-PCR, juntamente com instrumentação adequada capaz de combinar amplificação, detecção e quantificação em uma única etapa resultou em uma metodologia de alta sensibilidade, especificidade e melhor custo benefício em relação a outros ensaios de detecção, além de necessitar de uma pequena quantidade de amostra, como pode ser observado na Figura 5 (BUSTIN, 2000; JALALI; ZABOROWSKA; JALALI, 2017)

Figura 5 - Etapas do PCR em tempo real

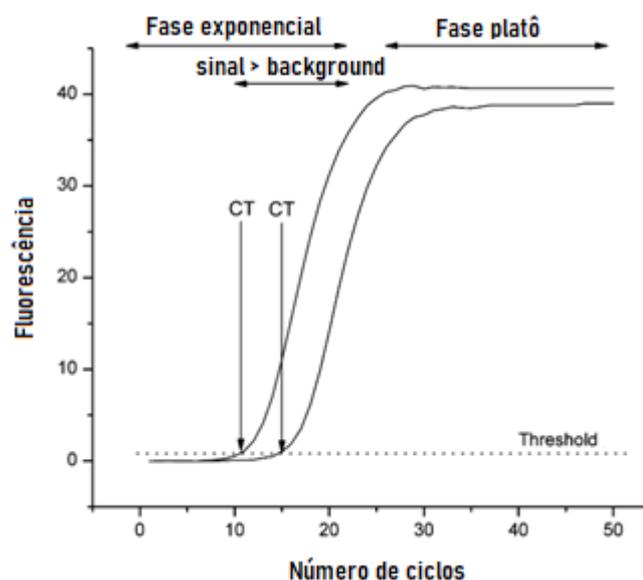


Fonte: adaptado de Bustin (2000).

O desenvolvimento de um ensaio diagnóstico de qPCR requer amplo conhecimento das etapas envolvidas, desde a qualidade da amostra até a análise da reação em software específico. Quando se trata de RT-qPCR, a etapa de transcrição reversa anteriormente a amplificação é necessária. Sendo assim, a extração de RNA viral utilizando metodologias específicas e o armazenamento dessa amostra em freezer - 80°C são parâmetros essenciais para assegurar um ensaio de qualidade. O RNA degradado ou contaminado produzirá cDNA de baixa qualidade, que produzirá eficiências de reação qPCR inaquadas, resultando em dados de baixa qualidade que são analiticamente imprecisos (BIORAD, 2019).

A qPCR requer um fluoróforo que se liga ao produto formado e relata sua presença, gerando um sinal de fluorescência que reflete a quantidade de produto formado. Durante os ciclos iniciais da reação, o sinal é fraco e não pode ser distinguido do ruído inerente a reação, também chamado *background*. À medida que a quantidade de produto se acumula, desenvolve-se um sinal que aumenta exponencialmente, sendo esta fase denominada fase exponencial de amplificação. Depois disso, o sinal se estabiliza e satura, caracterizando a fase platô (figura 6). A saturação do sinal deve-se à reação de esgotamento de algum componente crítico (KUBISTA *et al.*, 2006).

Figura 6 - Curvas de qPCR representando as fases exponencial e platô, além do Ct e do *threshold*



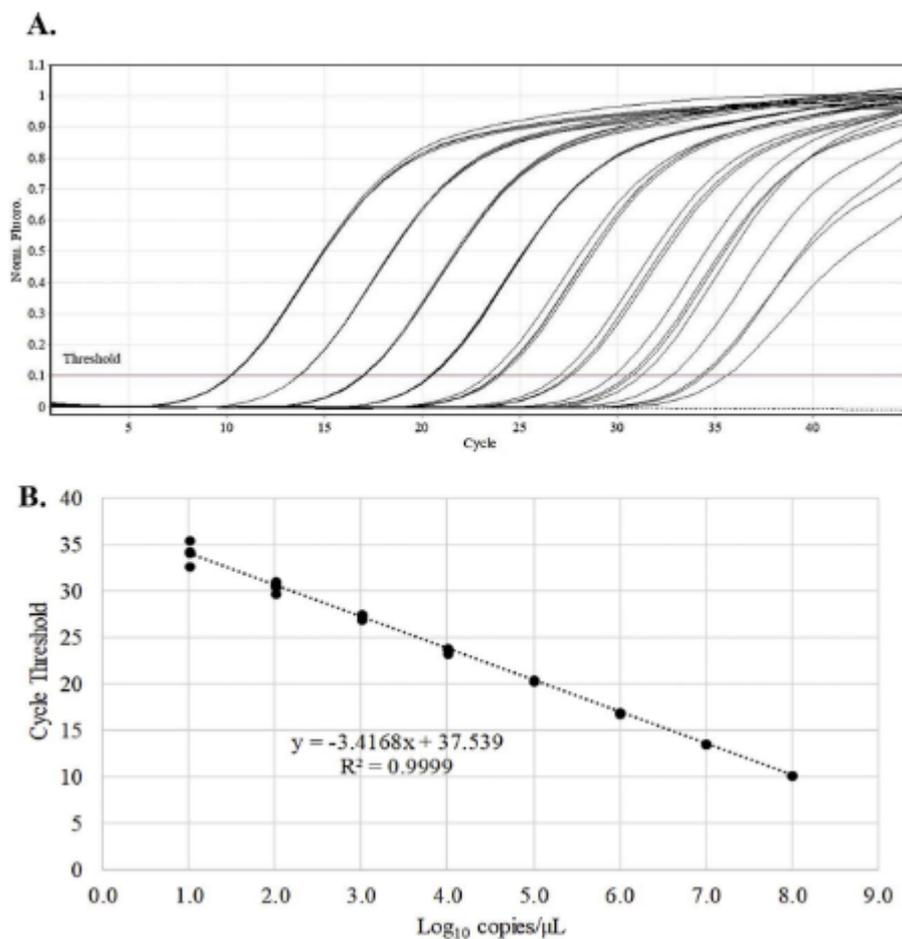
Fonte: adaptado de Kubista, 2006.

Existem parâmetros e nomenclaturas relacionadas ao desenvolvimento do ensaio que devem ser levados em conta, como os termos *Threshold* e *Cycle threshold*. O *cycle threshold* (CT) é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente exceda a fluorescência de fundo e cruze o limite (*threshold*). Os valores mais altos de CT indicam cargas virais muito baixas, enquanto valores menores são indicativos de carga viral elevada (LEON *et al.*, 2019).

Para desenvolver um ensaio de qPCR eficiente e sensível é preciso levar em conta o limite de detecção (LOD). O LOD é definido como a concentração mínima de ácido nucleico que sempre dá um resultado PCR positivo em todas as repetições testadas, ou na maior parte (mais de 95%) delas (KRALIK; RICCHI, 2017). Quanto menor o valor do LOD, mais sensível é o ensaio. De acordo com Kralik e Ricchi, para determinar o LOD é necessário montar uma curva de diluição com o gene alvo e plotar um gráfico usando o log da diluição pelo Ct de amplificação de cada diluição determinado pelo qPCR. O LOD estimado será calculado levando-se em consideração o número mínimo de cópias por um ciclo de *threshold* determinado.

As infecções por arbovírus geralmente não podem ser diagnosticadas apenas com base nos sintomas clínicos; o MAYV, por exemplo, causa uma doença febril que pode ser confundida com DENV ou outras doenças exantemáticas (COIMBRA *et al.*, 2007). O ensaio para detecção de MAYV por RT-qPCR desenvolvido por Waggoner e colaboradores é um excelente exemplo de construção e otimização da metodologia diagnóstica. Foram utilizadas cepas de MAYV em diluição seriada e, posteriormente, ao realizar a qPCR, foi possível calcular a eficiência e estabelecer o limite de detecção, como pode ser observado na figura 7.

Figura 7 – Ensaio de qPCR realizado por Waggoner para detecção de MAYV. (A) Curvas de amplificação para diluições seriadas de 10 vezes do padrão MAYV quantificado. O padrão era um oligonucleotídeo ssDNA contendo a sequência-alvo de consenso MAYV. (B) Regressão linear dos resultados obtidos em A. Ensaio realizado em quaduplicata



Fonte: adaptado de Waggoner.

A eficiência do *primer* é calculada de acordo com Dymond (2013), utilizando a fórmula $E=10^{(-1/\text{inclinação})-1}$, onde a inclinação é determinada por “a” na fórmula do gráfico linear $y = xa + b$. São considerados aceitáveis *primers* que apresentam eficiência entre 95% e 115%.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar e otimizar um protocolo de qPCR específico para a detecção das arboviroses MAYV, WNV e SLEV em ensaios *singleplex*.

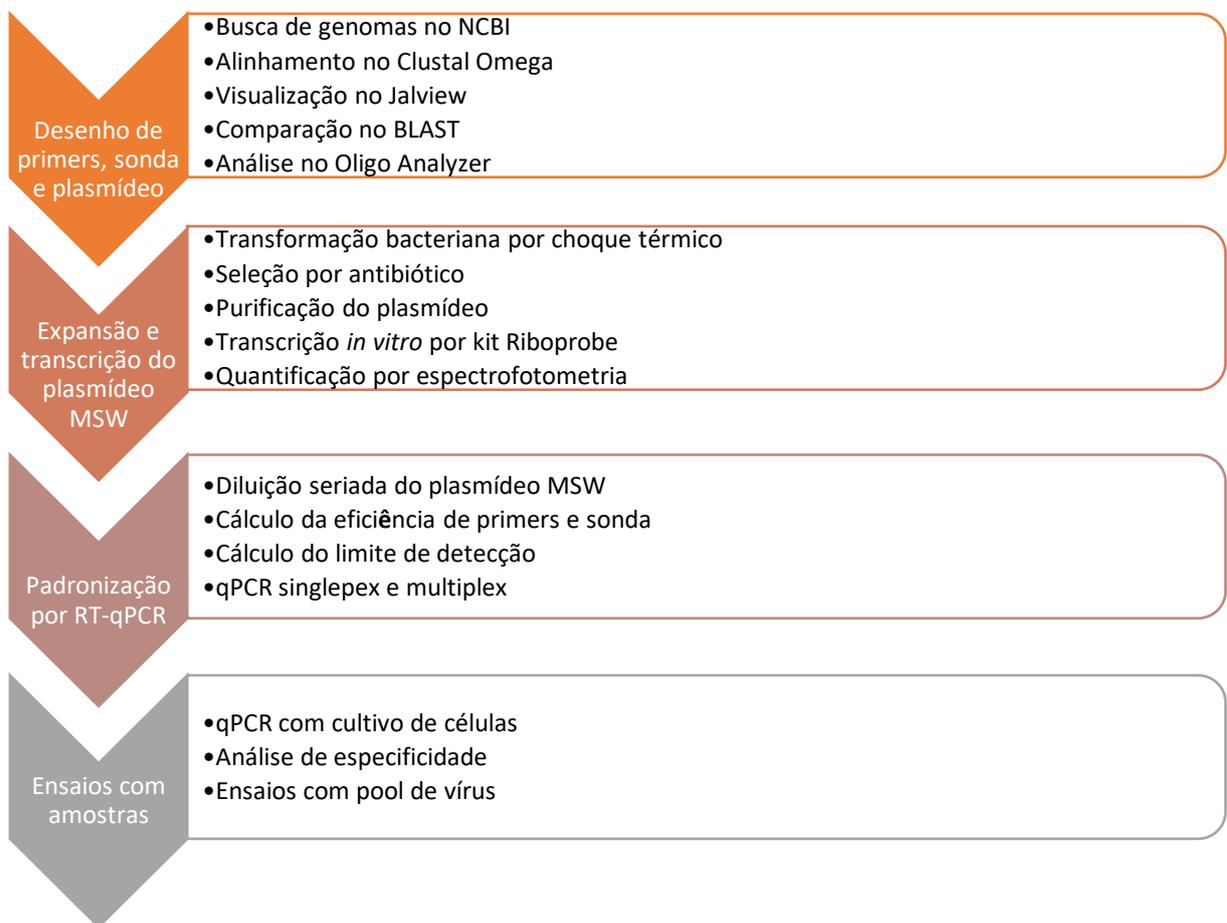
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar *primers* e sondas específicas para MAYV, WNV e SLEV a partir de sequências selecionadas previamente utilizando o banco de dados Genbank;
- Construir um plasmídeo contendo conjunto de fragmentos dos vírus a serem estudados que servirão como controle e para quantificação do número de cópias;
- Obter transcritos do padrão utilizando kit comercial;
- Realizar os ensaios de RT-qPCR para testar a eficiência dos *primers* e sondas e elaborar a curva para determinação do Limite de Detecção (LoD).

4. METODOLOGIA

4.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 8 - Fluxograma do desenho experimental do projeto.



Fonte: a autora.

4.2. DESENHO DE *PRIMERS* E SONDAS

A fim de encontrar a melhor região para desenho dos *primers* e sondas para cada um dos três vírus, foi realizada uma busca pelas sequências disponíveis no GenBank do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os critérios de seleção dos genomas de interesse foram:

- Tamanho entre 10.000pb e 12.000pb, que corresponde ao genoma completo dos vírus;
- Origem em locais não isolados. Cepas oriundas de locais geograficamente isolados foram excluídas deste estudo. Sendo assim, foram selecionadas sequências oriundas de vírus de locais com maior circulação humana.

Foi realizado o download das sequências em formato FASTA para posterior alinhamento utilizando o software gratuito Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (MADEIRA *et al.*, 2019). Após o alinhamento das sequências, estas foram visualizadas no software gratuito Jalview (<http://www.jalview.org/getdown/release/>) em busca de regiões de homologia para desenho dos *primers* e sonda (Figura 9) (WATERHOUSE *et al.*, 2009). Genomas virais provenientes de locais muito isolados ou que apresentavam bases degeneradas foram descartados deste estudo a fim de manter a homologia entre as sequências.

Figura 9 - Visualização das sequências de MAYV no Jalview. A região sinalizada mostra o local da sonda. Esta etapa de alinhamento e desenho dos *primers* e sonda foi realizada para WNV e SLEV também.



Fonte: a autora.

Como se pode observar na figura 9, foram selecionados fragmentos de cada vírus para compor os iniciadores, e em seguida cada fragmento foi analisado através do software gratuito Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>), levando em conta os parâmetros ideais para desenho de *primers* descritos no Real-time PCR handbook, da BIORAD. Foram observados os seguintes critérios:

- Tamanho ideal: entre 18 e 28 bases;
- Trechos de nucleotídeos repetidos devem ser evitados;
- Os *primers* devem ter valores de T_m compatíveis (dentro de 1 ° C um do outro);
- No máximo 50% de nucleotídeos G e C nos *primers*.

Para o desenho da sonda, foram adotados os seguintes critérios:

- Tamanho máximo de 30 bases;
- Temperatura de *melting* (T_m): mínimo de 6°C acima da T_m dos *primers* e no máximo 10°C. A T_m ideal na maioria dos casos é 70°C;

Após a análise destes parâmetros, foram selecionadas as sequências para desenho dos *primers* e sonda presentes neste estudo. Cada sonda foi marcada com um corante fluoróforo distinto. Os *primers* para MAYV, WNV e SLEV e suas respectivas sondas foram desenhados especificamente para este projeto e sintetizados pela Life Technologies (EUA).

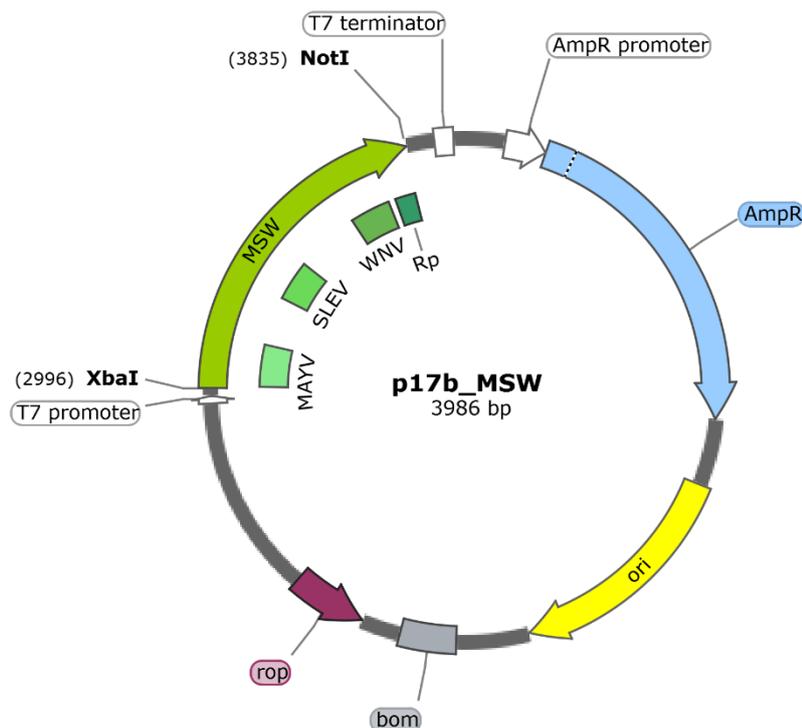
Os oligonucleotídeos chegaram ao laboratório liofilizados e em temperatura ambiente. Foi obedecido o protocolo do fabricante para ressuspender os *primers* e sondas. Primeiramente foi feito um *spin* em micro centrífuga para que todo o material liofilizado no interior do tubo decantasse. Em seguida, foi adicionado um volume de tampão Tris-EDTA 1x (10mM Tris/1mM EDTA), pH 7,2 (TE 1x), a fim de se obter uma concentração final de 100µM. Os *primers* com TE 1X foram homogeneizados brevemente em vórtex e armazenados à -20°C. Para os ensaios de PCR em tempo real (qPCR) foi utilizado o kit GoTaq Probe qPCR e o RT-qPCR Systems (Promega, Madison, Wisconsin, EUA).

4.3. DESENHO DO PLASMÍDEO MSW

O plasmídeo MSW atuou como controle para o PCR em tempo real por conter as regiões das cepas dos vírus em estudo. O vetor escolhido foi o pet17b da Biomatik (Wilmington, DE, EUA), pois trata-se de um vetor de clonagem que possui sítios específicos para as enzimas de restrição disponíveis no laboratório, além de possuir promotor T7 e gene de seleção por ampicilina. O desenho do plasmídeo seguiu a mesma lógica que o desenho dos *primers* descritos anteriormente. Foram analisadas as regiões de homologia das sequências utilizadas para o desenho dos *primers* e sondas e, após a seleção dos possíveis fragmentos para compor o plasmídeo, foram observadas as regiões onde estas sequências estavam, de modo que as sequências localizadas em locais não estruturais do genoma foram descartadas. Foi levado em conta também o tamanho do fragmento para inserção no plasmídeo e as composições genômicas distintas de cada um dos vírus, evitando a possibilidade de amplificação cruzada. Como o plasmídeo contém as sequências dos vírus MAYV, SLEV e WNV, foi dado a ele o nome MSW em função das iniciais dos vírus.

O padrão é, portanto, um fragmento sintético que representa uma sequência real dos vírus de interesse. Após a seleção das sequências a serem utilizadas no padrão, estas foram enviadas à FASTBIO, empresa responsável pela manufatura. Para a confecção do plasmídeo, foram selecionados os sítios de seleção por antibiótico (ampicilina) e as enzimas de restrição desejadas (*Xba I* e *Not I*). Utilizando o software pago SnapGene, da GraphPad Software (<https://www.snapgene.com/>), foi possível visualizar o inserto, o tamanho do vetor e os sítios para as enzimas de restrição, como está representado na figura 10.

Figura 10 - Representação do mapa do vetor contendo o inserto MSW. Imagem obtida através do software SnapGene



Fonte: a autora.

4.4. CLONAGEM DO PLASMÍDEO MSW

4.4.1. Competência bacteriana

Para a expansão do plasmídeo MSW foi utilizada a bactéria *E.coli* JM109 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) quimicamente competente por cloreto de cálcio. O emprego do cloreto de cálcio neutraliza a repulsão eletrostática entre o DNA plasmidial e a membrana celular bacteriana, facilitando a permeabilidade para moléculas grandes de DNA, como é o caso do plasmídeo MSW. Por esta razão, primeiro foi realizada a competência e em seguida a transformação.

Uma alíquota da bactéria JM do estoque do LABVIRO, armazenada em freezer -80°C, foi semeada em placa contendo meio sólido Luria-Bertani (LB) (10g tripton, 5g NaCl, 5g extrato de levedura, água destilada q.s.p 1L) e incubada *overnight* em estufa a 37°C. Decorrido o tempo de crescimento em placa, a mesma foi colocada na

geladeira para que, no final da tarde, fosse isolada uma colônia para crescimento em 7 mL de LB líquido em *shaker* a 37°C, sendo este o pré-inóculo do experimento.

No dia seguinte, um volume de 6 mL de cultivo foi colocado em um novo recipiente contendo 600 mL de LB, e incubado por 3h em *shaker* a 37°C. O crescimento desta cultura foi monitorado pela medição da O.D. em espectrofotômetro a cada 20 minutos, sendo que a O.D. ideal para a competência varia entre 0,4 e 0,6. Ao atingir a O.D. ideal, a cultura foi colocada em banho de gelo por 20 minutos para reduzir o crescimento bacteriano e, decorrido este tempo, foi realocada para tubos Falcon e centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado em gelo novamente para que o precipitado de células fosse ressuspense em 60 mL de cloreto de magnésio (2M). Todos os precipitados foram colocados em um mesmo tubo e centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuspense em 120 mL de cloreto de cálcio (0,1M) gelado, e o tubo foi mantido em gelo por 20 minutos.

Na sequência ocorreu mais uma rodada de centrifugação a 2000 rpm por 20 minutos a 4°C. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 120 mL de cloreto de cálcio (0,1M) gelado e 15% de glicerol gelado. Em seguida ocorreu mais uma rodada de centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1,2 mL de cloreto de cálcio (0,1M) gelado e 15% de glicerol gelado. O volume total de bactérias competentes foi separado em alíquotas com volume de 100µL, armazenadas em freezer -80°C.

4.4.2. Transformação JM e plasmídeo MSW

O vetor MSW foi ressuspense com TE 1x para uma concentração inicial de 4.000ng/µL e submetido a diluição seriada até uma concentração final de 2ng/µL, seguindo as recomendações do fabricante. Através do processo de transformação por choque térmico, o plasmídeo foi integrado à bactéria, sendo posteriormente realizada a seleção por ampicilina a 100µg/mL.

Para a transformação, uma alíquota de 100µL de JM competente foi colocada em gelo e, ao iniciar seu descongelamento, foram adicionados 2µL do plasmídeo MSW a 2ng/µL. O microtubo contendo a bactéria e o plasmídeo foram mantidos em

gelo durante 30 minutos, seguido de 30 segundos no banho maria a 42°C e choque térmico no gelo imediatamente, a fim de garantir a incorporação do plasmídeo. Para o crescimento das bactérias foram adicionados 500µL de meio LB ao microtubo, e este foi colocado em *shaker* de agitação durante 1h a 37°C. Decorrido este tempo, foram colocados cerca de 20µL de bactéria transformada em placas contendo meio LB. Três placas distintas foram utilizadas para avaliar a transformação: uma placa somente com LB (controle positivo), uma placa com LB e kanamicina (controle negativo) e uma placa com LB e ampicilina, na qual se espera observar o crescimento bacteriano, decorrente do sucesso da transformação. As placas foram deixadas em estufa a 37°C *overnight* e analisadas na manhã seguinte, onde foi possível observar o seguinte resultado:

É possível observar que na placa A ocorreu crescimento bacteriano com formação de colônias densas e uniformes; na placa B houve crescimento bacteriano em forma de biofilme, o que assegura a viabilidade das bactérias utilizadas. Na placa C não ocorreu crescimento bacteriano, indiciando que as bactérias possuem resistência somente a ampicilina. Das colônias que cresceram, seis foram selecionadas para verificação da presença do vetor MSW. As colônias transformadas que cresceram em meio com ampicilina a 100µg/mL foram expandidas em tubo Falcon com 15 mL de LB. Foram utilizados três tipos de tubos: um contendo somente LB, um tubo com LB e kanamicina a 100µg/mL (controle negativo) e um tubo com LB e ampicilina (controle positivo). As bactérias foram inoculadas para crescimento *overnight* no *shaker* de agitação a 37°C, sendo manipuladas na manhã seguinte para a extração do plasmídeo.

4.4.3. Purificação do plasmídeo MSW

Para a extração do vetor foi utilizado o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) seguindo as orientações do fabricante. O cultivo em ampicilina foi transferido para quatro microtubos (aproximadamente 1,25 mL em cada tubo) e estes foram centrifugados em microcentrífuga Pico 17 (Thermo Scientific) por 1 minuto a 13.300 rpm, a fim de se obter um precipitado de bactérias e remover o

meio. Em seguida o precipitado foi homogeneizado com 250 μ L do tampão R3, e em seguida foram adicionados 250 μ L do tampão L7 para lisar a bactéria. Após agitação por inversão, as bactérias foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Seguiu-se com a adição do tampão N4 aos microtubos e novamente agitação por inversão até homogeneizar a mistura, seguida de centrifugação por 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma coluna posicionada sobre um tubo de lavagem e ocorreu outra centrifugação 12.000 g por 1 minuto, sendo o conteúdo do tubo de lavagem desprezado em seguida. Foram adicionados 500 μ L do tampão W10 com etanol na coluna seguida de incubação por 1 minuto a temperatura ambiente. Outra rodada de centrifugação foi realizada a 12.000 g por 1 minuto, sendo o conteúdo do tubo de lavagem desprezado novamente. Foram adicionados 700 μ L do tampão W9 na coluna e seguiu-se para centrifugação a 12.000 g por 1 minuto, sendo o conteúdo do tubo de lavagem desprezado e colocado novamente para centrifugação a fim de secar a coluna. Para a eluição, a coluna foi posicionada sobre um microtubo estéril livre de RNase e DNase, e a ela foram adicionados 75 μ L de TE, sendo incubada por 1 minuto a temperatura ambiente. A coluna foi centrifugada 12.000 g por 2 minutos e o conteúdo do microtubo, que consiste em DNA plasmidial, foi armazenado em freezer -80°C.

4.5. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Para assegurar o sucesso da transformação e visualizar o inserto foi realizada uma digestão. O plasmídeo linearizado contendo o fragmento MSW apresenta 3.986 pb, enquanto o próprio fragmento possui 846 pb. Foram utilizadas as enzimas XbaI e NotI, da Jena Biosciences, e o tampão B3, também fabricado pela empresa. A digestão ocorreu em três tubos: um tubo contendo as duas enzimas, um tubo contendo apenas uma enzima e outro tubo sem enzimas, apenas com o plasmídeo, tampão e água. Para a digestão foi utilizado o termociclador SimpliAmp Thermal Cycler da Applied Biosciences, e as amostras foram submetidas a uma ciclagem de 60 minutos a 37°C seguida de 20 minutos a 65°C para inativar as enzimas. O resultado foi visualizado em gel de agarose 0,9% com DNA ladder de 100 pb (Promega, Madison, Wisconsin, EUA).

4.6. QUANTIFICAÇÃO E NÚMERO DE CÓPIAS

Confirmada a transformação através da digestão enzimática, foi realizada a quantificação para estimar o número de cópias de DNA. Esta etapa foi feita por espectrofotometria utilizando o Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific). Para a calibração do aparelho utilizado o tampão de eluição AVE, posteriormente utilizado na diluição seriada de RNA. Este tampão foi empregado a fim de garantir a estabilidade do RNA para os experimentos seguintes. A quantificação é dada em nanogramas por microlitro e, levando em conta o número de pares de base do vetor, foi feito o cálculo do número de cópias através do software Calculate Copy Number (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Após a dosagem foi possível constatar que havia uma quantidade de 28ng/μL de plasmídeo e, de acordo com o software utilizado, foi possível estimar $6,51 \times 10^9$ cópias de DNA.

4.7. TRANSCRIÇÃO DO PLASMÍDEO MSW

Como os vírus em estudo são de RNA, para assegurar fidelidade no desenvolvimento do ensaio, o vetor foi transcrito em RNA utilizando o kit Riboprobe (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Para maior eficiência nesta etapa, o vetor foi linearizado previamente com a enzima XhoI e tampão CutSmart 10x, ambos na New England Biolabs (NEB). A ciclagem teve duas etapas: 60 minutos a 37°C seguida de 20 minutos a 65°C para inativar as enzimas. A reação ocorreu em termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosciences).

O preparo da reação de transcrição está descrito na tabela 1, sendo utilizadas as instruções do fabricante. De acordo com o protocolo do kit, a quantidade de DNA deve estar entre 1 e 2,5 mg/mL, e o cálculo da quantidade de plasmídeo utilizada foi feita com base nessa quantidade:

1mg ----- 1000ng

28ng -----1 μ L

1.000ng ----- x μ L

X = 1.000/28 = 35,7 μ L de plasmídeo para a transcrição

Tabela 1 - Descrição da montagem da reação de transcrição *in vitro*.

REAGENTE	Controle positivo	Plasmídeo MSW
Tampão transcription 5X	4 μ L	20 μ L
DTT 100mM	2 μ L	10 μ L
RNAsin	0,5 μ L	2,5 μ L
rATP	1 μ L	5 μ L
rGTP	1 μ L	5 μ L
rCTP	1 μ L	5 μ L
rUTP	1 μ L	5 μ L
Pgem controle positivo	1 μ L	-
Plasmídeo MSW	-	35,7 μ L
T7 RNA Polimerase	1 μ L	2 μ L
Água	7,5 μ L	9,8 μ L
Volume final	20 μ L	100 μ L

Fonte: a autora.

A reação foi incubada em termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosciences) por 1h30 a 37°C, e em seguida foi realizada a extração de RNA por coluna utilizando o kit Qiagen Qiampl Viral RNA Mini Kit, a fim de remover os resíduos da transcrição. Para a extração foram colocados 560 μ L do tampão AVL e 140 μ L de RNA transcrito em um micro tubo de 1,5 mL. Em seguida a mistura foi homogeneizada no vórtex por 10 segundos e colocada em temperatura ambiente para incubar por 10 minutos. Decorridos os 10 minutos, foram adicionados 560 μ L de etanol puro na amostra, seguido da homogeneização no vórtex. O conteúdo do micro tubo, cerca de 1.160 μ L, foi transferido para uma coluna, sendo colocados 630 μ L por rodada de centrifugação. A coluna com a amostra foi posicionada sobre um tubo coletor, sendo

centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. Após a primeira centrifugação, o tubo coletor foi descartado e o restante do conteúdo da amostra foi colocado na mesma coluna, utilizando um tubo coletor novo. Concluída a segunda centrifugação, o tubo coletor foi descartado e na coluna foram colocados 500 µL de tampão AW1, seguido de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Novamente o tubo coletor foi descartado e 500 µL de tampão AW2 foi adicionado a coluna, ocorrendo logo em seguida uma rodada de centrifugação a 13.300 rpm por 3 minutos. Por fim, a coluna foi posicionada sobre um micro tubo de 1,5 mL identificado e a ela foram adicionados 60 µL de tampão AVE, seguida de 1 minutos incubando a temperatura ambiente. Ocorreu outra rodada de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e, concluída esta etapa, foi possível obter o RNA do plasmídeo MSW livre de impurezas para ser dosado no Nanodrop Lite. Após a dosagem foi possível estimar uma quantidade de 4 ng/µL de RNA.

4.8. ENSAIOS COM OUTROS INICIADORES

Para confirmar a especificidade do plasmídeo e a ocorrência de amplificação cruzada foram realizados ensaios de qPCR com iniciadores descritos por outros autores. O RNA do plasmídeo MSW foi utilizado como amostra em ensaios para detecção de CHIKV, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti (2007) e de ZIKV, cujo ensaio foi descrito por Lanciotti (2008). Também foram realizados os ensaios de qPCR para MAYV, seguindo o protocolo de Waggoner (2018) e USUV, de acordo com o estabelecido por Cavrini (2011).

4.9. CULTIVO DE CÉLULAS

Para validar o funcionamento dos *primers* foram utilizados cultivos de células contendo os vírus em estudo. As cepas de MAYV foram cedidas pelo Instituto Evandro Chagas, e os vírus foram cultivados em células C6/36 AT 160, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro. Para os experimentos envolvendo WNV, a cepa foi cedida pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Minas Gerais

(UFMG). Por conta da pandemia do COVID-19 não foi possível obter a cepa de SLEV a tempo para padronização dos experimentos.

Para os ensaios de co-infecção foram utilizados cultivos de DENV, ZIKV, CHIKV e OROV feitos a partir do isolamento viral em células C6/36 de amostras positivas para os vírus. Para validar esses cultivos como positivos, foram utilizados diferentes protocolos de qPCR. Os *primers* desenhados pelo CDC foram utilizados no ensaio para detecção de DENV, enquanto para ZIKV foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (2008). O cultivo e a detecção de OROV foram realizados por Fonseca e colaboradores (2020) e utilizados neste estudo. Os *primers* desenhados por Morelli e colaboradores (2002) foram empregados na detecção por nested RT-PCR para OROV feitos por Fonseca e, para a detecção em tempo real de CHIKV, os *primers* descritos por Lanciotti e colaboradores (2007).

4.10. PADRONIZAÇÃO DE qPCR PARA MAYV, SLEV e WNV

4.10.1. Teste da eficiência dos iniciadores e curva de quantificação

Para testar os *primers* e verificar a quantificação usando o plasmídeo foi realizada a técnica de qPCR utilizando o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. No Master Mix foi adicionada a referência passiva ROX, seguindo a concentração estabelecida pelo kit, a fim de maximizar a eficácia da reação. Foram utilizadas placas para qPCR da Applied Biosystems no preparo das reações e 20 µL de reação em cada poço. Foram testadas também diferentes concentrações de *primers* para o preparo do mix. Os experimentos foram realizados em termociclador Quantus 5 da Applied Biosciences e analisados no software QuantStudio Design & Analysis Software v. 1.5.1. A ciclagem utilizada seguiu os protocolos do kit: transcrição reversa a 45°C por 15 minutos, seguida de inativação da transcriptase reversa e ativação da polimerase a 95°C por 2 minutos. A amplificação ocorreu em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Uma diluição seriada de 9 pontos na ordem de 1:10 foi elaborada, sendo os cada diluição numerada de 1 a 9, sendo o tubo 1 o mais concentrado e o tubo 9 o mais

diluído. Como amostra foram utilizados 5µL de cada diluição. Através da análise no software foi possível manipular e alterar o *threshold* para o cálculo da eficiência, sendo o valor do *threshold* adaptado para cada tipo de vírus estudado. Para calcular a eficiência de amplificação foi adotada a fórmula descrita por (DYMOND, 2013). Foi feito o download dos dados numéricos relativos aos ensaios em formato .xlsx, compatível com o Excel 2019, pois através desse software é possível organizar as tabelas com a concentração da diluição, os Cts e elaborar os gráficos para análise da eficiência. Utilizando o Excel 2019, foram colocados os valores dos últimos 5 pontos da diluição seriada (tubos 4 a 9) e calculado o log destes valores na base 10, como está descrito no quadro 1. A fórmula da eficiência consiste em elaborar um gráfico com o valor de Ct e o log da diluição do RNA, e aplicar a fórmula da inclinação do Excel [=INCLINAÇÃO(known_xs;known_ys)]. A partir do valor da inclinação é possível calcular a eficiência, que é dada por $E=10^{(-1/inclinação)} -1$.

Quadro 1 - Diluições em cada tubo e o seu respectivo log na base 10.

RNA	Diluição	Log da diluição na base 10
TUBO 1	0,1	-1
TUBO 2	0,01	-2
TUBO 3	0,001	-3
TUBO 4	0,0001	-4
TUBO 5	0,00001	-5
TUBO 6	0,000001	-6
TUBO 7	0,0000001	-7
TUBO 8	0,00000001	-8
TUBO 9	0,000000001	-9

Fonte: a autora.

4.10.2. Concentração de *primers* F e R

Antes de executar o ensaio de qPCR para as diluições de RNA do plasmídeo MSW foi necessário elucidar qual concentração de *primers* obteria maior eficiência na reação. Para isso, foram realizadas diferentes combinações de concentração para os

primers R e F de cada um dos vírus, levando em conta as instruções do kit no que diz respeito aos limites máximo e mínimo de oligonucleotídeos em uma reação.

De acordo com o protocolo do kit utilizado, a concentração de *primers* em uma reação pode variar entre 300 nM até 1.000 nM. Os *primers* em estoque estão a 10µM, equivalente a 10.000 nM, e foram utilizados volumes distintos em cada mix para que fosse possível obter uma concentração final dentro da variação permitida no kit. Para escolha da melhor concentração inicial foram adotadas quatro concentrações finais distintas para os *primers*, denominadas FR1, FR2, FR3 e FR4, descritas no quadro 2. Como amostra foram utilizados 5 µL de RNA transcrito do plasmídeo MSW.

Quadro 2 - Montagem da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de *primers* utilizados neste estudo.

CONJUNTO	Concentração inicial de cada <i>primer</i>	Concentração final por reação	Volume de cada primer por reação	Volume final do mix por reação
FR1	10.000 nM	250 nM	0,5 µL	20 µL
FR2	10.000 nM	500 nM	1 µL	20 µL
FR3	10.000 nM	750 nM	1,5 µL	20 µL
FR4	10.000 nM	1.000 nM	2 µL	20 µL

Fonte: a autora

4.10.3. Curva do RNA MSW e cultivo de células

Foi utilizado o tampão de eluição AVE (Qiagen) na diluição seriada em 10 vezes tanto do RNA MSW quanto do cultivo de células. Foram feitos 9 pontos de diluição de RNA, sendo apenas os 5 últimos empregados na padronização do qPCR. Para a análise com cultivo de células foi feita uma diluição 1:10 com 4 pontos a fim de se obter uma curva.

4.10.4. Validação dos ensaios com amostras

Para validação foram utilizadas amostras do próprio LABVIRO, e a partir destas foi elaborado um banco de amostras. Os critérios para inclusão das amostras neste estudo foram:

- a) Amostras negativas para ZIKV, DENV e CHIKV por qPCR;
- b) Amostras apenas de soro, saliva, urina, líquido e plasma;
- c) Amostras coletadas entre 2016 e 2017.

Também foi realizado o qPCR em diluição de cultivo de células, amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV, e pool de vírus em soro fetal bovino (Invitrogen, EUA), confirmando que o ensaio funciona não só com o padrão sintético, mas também em amostras. Foram implementados quatro grupos de amostras para validação:

- I. Amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV: amostras de soro, saliva, urina, líquido e plasma foram coletadas de pacientes com sintomatologia de febre, dor de cabeça e rash cutânea entre 2016 e 2017, porém o resultado para ZIKV, DENV e CHIKV foi negativo, sendo o diagnóstico para essas amostras considerado inconclusivo. Para detecção de ZIKV foi utilizado o protocolo descrito por Lanciotti (2008), para DENV foi aplicado o protocolo desenvolvido pelo Center of Disease Control and Prevention (CDC, EUA), e para CHIKV o ensaio descrito por Lanciotti (2007);
- II. Amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV com outros vírus: foram adicionados volumes conhecidos de cultivo de células de MAYV, ZIKV, DENV, OROV e WNV em amostras negativas a fim de simular casos de co-infecção;
- III. Diluição de cultivo de células: os testes com os *primers* e sonda de MAYV foram feitos a partir do cultivo de células seguido de uma diluição seriada de 1:10 com 4 pontos em tampão de eluição;
- IV. Diluição em soro fetal bovino (SFB): foi elaborada uma diluição em SFB de células infectadas com o MAYV, para teste dos *primers* de MAYV, e RNA

derivado do plasmídeo MSW, para teste dos *primers* de SLEV. Para análise de MAYV foram utilizadas três diluições:

- Diluição 1: 498 µL SFB + 2 µL MAYV
- Diluição 2: 496 µL SFB + 4 µL MAYV
- Diluição 3: 492 µL SFB + 8 µL MAYV

Para análise dos *primers* de SLEV foi empregada uma diluição seriada com quatro pontos:

- SFB 1: 90 µL SFB + 10 µL RNA MSW
- SFB 2: 90 µL SFB + 10 µL SFB 1
- SFB 3: 90 µL SFB + 10 µL SFB 2
- SFB 4: 90 µL SFB + 10 µL SFB 3

5. RESULTADOS

5.1. DESENHO DE *PRIMERS* E SONDAS

A partir da análise de todos os *primers* e sondas possíveis de serem utilizados para MAYV, SLEV e WNV, foram selecionados aqueles com melhor compatibilidade para uso em PCR em tempo real. Em seguida, já com os *primers* e sondas definidos após análise no Oligo Analyzer, foi realizado o BLAST com o objetivo de comparar as seqüências de nucleotídeos com bancos de dados de seqüências, evitando assim uma possível reação cruzada.

Para SLEV foram selecionadas 30 seqüências depositadas no Genbank (MH899073; KM267635; DQ359217; FJ753286; NC_007580; KY825743; KY825742; KX258462; KX258461; KX258460; EF158061; EF158070; EF158067; EF158065; EF158059; EF158058; EF158057; EF158056; EF158054; EF158053; EF158052; EF158051; EF158050; EF158049; EF158048; KT823415; KF589299; FJ753287;

DQ525916; EU566860) e, após o alinhamento e análise das sequências, verificou-se que a região do genoma correspondente ao gene da RNA-polimerase RNA-dependente era o mais adequado ao desenho do *primers* e sonda devido ao seu grau de conservação. Nesta região foram selecionados os iniciadores *senso* e *antissenso* e a sonda. Foi analisada também a formação de estruturas secundárias entre os *primers* e sonda (self-dimer, hetero-dimer e hairpin) e a ocorrência de ligação cruzada dos iniciadores entre os genomas de outras arboviroses tais quais DENV, ZIKV, CHIKV, OROV, JEV, ROCV, ILHV, e vírus O'nyong O'nyong (ONNV). A comparação com o próprio genoma de SLEV foi realizada para assegurar a especificidade dos iniciadores. Os iniciadores não apresentaram semelhança com os outros genomas virais analisados, apenas com o genoma de SLEV, o que indica a especificidade das sequências selecionadas de oligonucleotídeos.

No que diz respeito a WNV, foram selecionadas 38 sequências depositadas no Genbank (NC_001563.2; NC_009942.1; KF647248.1; KF823805.1; MH021189.1; KF179639.1; KJ883348.1; KJ883344.1; KY594040.1; KJ577739.1; KJ883346.1; MF984343.1; KP789958.1; KF647250.1; KJ883350.1; KJ883342.1; JN393308.1; EF429197.1; EF429200.1; EF429199.1; KU978770.1; KM012173.1; KM012186.1; KM012188.1; KM012180.1; KM012171.1; JQ700439.1; KM012183.1; KM012178.1; KM012181.1; AF533540.1; DQ164196.1; AY646354.1; DQ164205.1; DQ164198.1; DQ164199.1; GU011992.2; AF404757.1). Após o alinhamento e análise das sequências, verificou-se que os iniciadores *senso* e *antissenso* e a sonda estavam localizados na região do genoma correspondente ao sítio 3'-UTR. Esta região está relacionada com o fim da transcrição proteica, e alterações neste local podem comprometer a funcionalidade do RNA mensageiro. A formação de estruturas secundárias (self-dimer, hetero-dimer e hairpin) também foi analisada, assim como a ocorrência de ligação cruzada dos iniciadores entre os genomas de outras arboviroses tais quais DENV, ZIKV, CHIKV, OROV, JEV, ROCV, ILHV e ONNV e, além destas, foi avaliada a especificidade com o próprio genoma de WNV. O alinhamento indicou a especificidade das sequências selecionadas para WNV e ausência de reação cruzada para os outros genomas analisados.

Para análise de MAYV foram selecionadas 72 sequências depositadas no Genbank (NC_003417.1; MH513597.1; KY985361.1; KT754168.1; KP842820.1; KY618133.1; KY618127.1; KX496990.1; KT818520.1; MK573239.1; KY618129.1;

KY618135.1; KP842818.1; AF237947.1; MK573238.1; KP842819.1; KP842812.1; KP842801.1; MK573242.1; KP842800.1; KM400591.1; KP842814.1; MK573245.1; KP842805.1; KP842811.1; KP842817.1; KP842806.1; KY026197.1; KP842794.1; KP842797.1; KP842798.1; KP842799.1; KP842796.1; KP842795.1; KY026195.1; KP842807.1; KY026198.1; KP842813.1; MK573243.1; KY026199.1; KJ013266.2; MK573244.1; KP842802.1; KY618131.1; KY618128.1; KP842804.1; KP842803.1; MK573246.1; KP842815.1; KY026200.1; KP842816.1; MK070491.1; KP842808.1; KY618136.1; KY618138.1; KY618137.1; KY618140.1; MK288026.1; DQ001069.1; MK837007.1; MK837006.1; MN138459.1; KY618130.1; KY618139.1; KY618132.1; MK573241.1; KY618134.1; KP842809.1; MK070492.1; MK573240.1; KP842810.1; MT227562.1). Posteriormente ao alinhamento e análise das sequências, verificou-se que a região do genoma correspondente ao gene da glicoproteína E1 do envelope era o mais adequado ao desenho do primers e sonda devido ao seu grau de conservação. A proteína E1 auxilia a adsorção à célula do hospedeiro. Mutações nessa região influenciam na infecciosidade do vírus, e por esta questão essas regiões se mantem conservadas (ZUCHI *et al.*, 2014)

Foi analisada a formação de estruturas secundárias (self-dimer, hetero-dimer e hairpin), e a ocorrência de ligação cruzada dos iniciadores com os genomas de outras arboviroses tais quais DENV, ZIKV, CHIKV, OROV, JEV, ROCV, ILHV e ONNV e, além destas, foi avaliada a especificidade com o próprio genoma de MAYV. A especificidade dos iniciadores com o genoma de MAYV foi confirmada, e não foram observadas reações cruzadas com os outros genomas analisados. Os iniciadores desenhados para este projeto estão descritos no quadro 3.

Quadro 3 - Iniciadores utilizados neste trabalho.

SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS E SONDAS DESENHADAS PARA O VETOR MSW

VÍRUS	INICIADOR	SEQUÊNCIA	TAMANHO
MAYV	Sonda	AGTGGGATTCCCGTATAAGGCTCATGTTGC	30 pb
	Primer F	TACGAGCACACGGCARTY	18 pb
	Primer R	CCAGGTTGAGYGTTGGCT	18 pb
SLEV	Sonda	TGGACGAGGAGGGTGGAGCTACTACTG	27 pb
	Primer F	CATGGGAAAGGTTGTTGACTTRG	23 pb
	Primer R	AGYTGCGGTTCTTCATGGC	19 pb
WNV	Sonda	GCACTATCGCAGACTGCACTCTCCGCAGA	29 pb
	Primer F	CGTCTCGGAAGGAGGACC	18 pb
	Primer R	TTGCCTTTGTTAACCCAGTCC	22 pb

Fonte: a autora

5.2. CONSTRUÇÃO DO INSERTO

Para a construção do plasmídeo MSW, após o alinhamento, foram selecionados fragmentos de sequências que: 1) contivessem as sequências referentes aos *primers* e sondas desenhados e 2) apresentassem regiões de homologia entre as cepas analisadas. Os fragmentos relacionados aos genomas de MAYV, SLEV e WNV foram selecionados e a manufatura do plasmídeo MSW ficou sob responsabilidade da FASTBIO. As sequências de nucleotídeos inseridas no plasmídeo MSW estão descritas no quadro 4. Foi utilizado o vetor pET17b, com os sítios de clonagem XbaI e NotI.

O fragmento referente ao genoma de MAYV possui 288 pares de bases e engloba uma parte do gene da glicoproteína E1 do envelope. Quanto a SLEV, a sequência selecionada para compor o plasmídeo possui 329 pares de nucleotídeos e corresponde a região do gene da RNA-polimerase RNA-dependente. Para WNV foi utilizado um fragmento de 150 pares de bases localizados na região do genoma correspondente ao sítio 3'-UTR.

Quadro 4 - Sequências inseridas no plasmídeo MSW. Na cor rosa estão representados os *primers* F e R, enquanto a cor verde representa a sonda.

MAYV	5'-TACGAGCACACGGCAATCATTCCGAACCAAGTGGGATTCCCGTATAAGGCTCATG TTGC GCGTGAAGGTTACAGTCCTTTGACCCTGCAGATGCAGGTGGTAGAAACCAGCC TTGAGCCAACACTCAACCTGGAGTATATCACTTGCGATGTCGTCTCTAAGCTCTTCCT CTGCATTGCAAGAGTTTACCACTCAGTATGTGCGAAAGTCTTTGTAGATATCGAGGCCG AGAGCCCGTTTTTAAAATCACTACAGAGAGCGTTTCCAGCATTGAAGTGGAAGTCAAA CC-3'
SLEV	5'-CATGGGAAAGGTTGTTGACTTAGGCTGTGGACGAGGAGGGTGGAGCTACTACTGT GCAACTCTAAAGCATGTTCAAGAAGTGAAAGGATTCACAAAAGGTGGACCAGGCCAT GAAGAACCGCAACTCATGCAGAGCTATGGATGGAATCTACTGGCTGTCCGAGGGATT CTCATCTTTCTGGCGACCAGCGTGCAAGCCGATTCGGGATGTGCAATTGACCTACAA CGACGACAAAAGTCGAAAAGTGGGTTCTGCGCAATCCTGGATATGCCCTAGTTGCGC TGGCGATTGGATGGATGCTAGGCAGCAACAACACACAGATCAGAAC-3'
WNV	5'-CGTCTCGGAAGGAGGACCACACGTGCTTTAGCCTCAAAGCCCAGTGTCAGACCAC GCTACGGCGTGCCAC TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGATAGTGC CCCAGGTGGACT GGGTTAACAAAGGCAAAACATCGCCCCACGCGGCCCTAG-3'

Fonte: a autora.

O inserto foi inserido em bactéria competente por transformação, foi realizada a seleção por antibiótico e, ao final do processo, foi possível obter um microtubo com DNA plasmidial. Em seguida ocorreu a transcrição *in vitro* e quantificação do número de cópias. Através da dosagem foi possível obter 4 ng/μL de RNA MSW. Esta quantidade expressa em número de cópias representa 1,77 x 10⁹ cópias. Uma diluição seriada na ordem de 1:10 foi feita utilizando tampão AVE, até que fosse possível obter 1 cópia por microlitro. O quadro 5 elucida como foi elaborada esta diluição.

Quadro 5 - Diluição seriada do RNA MSW a partir do número de cópias. Para os ensaios de qPCR foram utilizadas as diluições enumeradas de 4 a 9 ($1,77 \times 10^5$ cópias até 1 cópia, respectivamente).

DILUIÇÃO	NÚMERO DO MICROTUBO	NÚMERO DE CÓPIAS
1:1	0	$1,77 \times 10^9$
1:10	1	$1,77 \times 10^8$
1:100	2	$1,77 \times 10^7$
1:1.000	3	$1,77 \times 10^6$
1:10.000	4	$1,77 \times 10^5$
1:100.000	5	$1,77 \times 10^4$
1:1.000.000	6	$1,77 \times 10^3$
1:10.000.000	7	$1,77 \times 10^2$
1:100.000.000	8	$1,77 \times 10^1$
1:1.000.000.000	9	$1,77 \times 1$

Fonte: a autora.

5.3. PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO O PLASMÍDEO MSW

5.3.1. Ensaios com outros iniciadores

Foram utilizados 5 μ L de RNA do plasmídeo MSW nas diluições 1:10 e 1:100 como amostra em cada ensaio realizado. As amostras foram pipetadas em triplicata. O kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR foi empregado nesta etapa. As concentrações de *primers* e sondas foram adaptadas de acordo com a descrição de cada protocolo, como pode ser observado no quadro 6.

Quadro 6 - Descrição dos *primers* e concentrações finais utilizadas

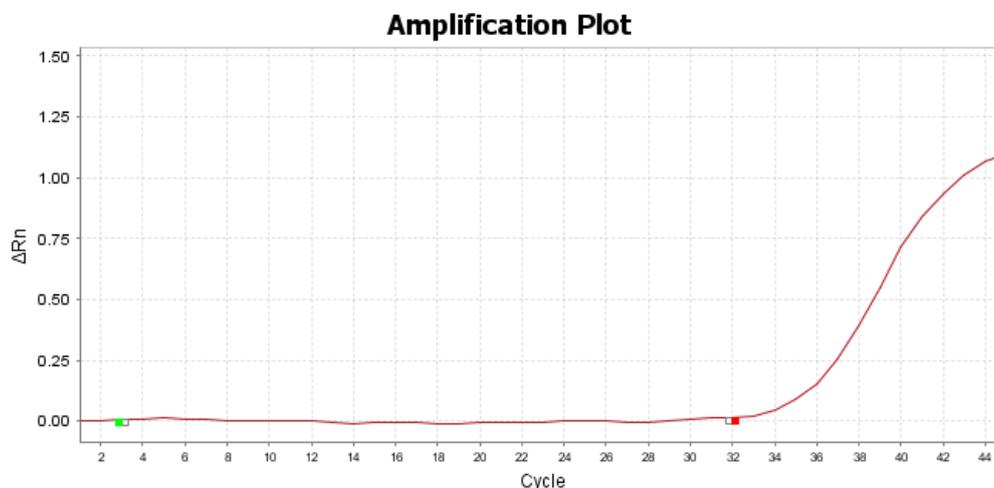
VÍRUS	INICIADOR	CONCENTRAÇÃO FINAL
MAYV Waggoner (2018)	MAYV Forward	300nM
	MAYV Reverse 1	300nM
	MAYV Reverse 2	300nM
	MAYV Sonda	200nM
ZIKV Lanciotti (2008)	ZIKV-1086	900nM
	ZIKV-1162	900nM
	ZIKV- 1107-FAM	250nM
CHIKV Lanciotti (2007)	CHIKV-6856	900nM
	CHIKV-6981	900nM
	CHIKV-6919-FAM	250nM
USUV Cavrini (2010)	USU-F	900nM
	USU-R	900nM
	USU-P	250nM

Fonte: a autora.

Para todas as reações foi utilizado soro padronizado pelo LABVIRO para controle negativo, e como branco (NTC) foi utilizada água no lugar da amostra durante a pipetagem da placa de qPCR. Para detecção de CHIKV foi adotado o protocolo descrito por Lanciotti (2007), e não ocorreu amplificação, sendo adotado o RNA oriundo de cultivo de células infectadas com CHIKV como controle positivo. Para ZIKV, cujo ensaio foi descrito por Lanciotti (2008), foi observada amplificação, indicando similaridade entre as sequências desenhadas para o plasmídeo e os iniciadores utilizados. Como controle positivo para ZIKV foi utilizado o RNA oriundo de cultivo de células infectadas com ZIKV. Também foram realizados os ensaios de qPCR para MAYV seguindo o protocolo de Waggoner (2018), e foi possível observar amplificação, validando que o plasmídeo possui nucleotídeos compatíveis com MAYV (figura 11). RNA oriundo de cultivo de células infectadas com MAYV foi empregado como controle positivo. Para USUV o ensaio foi realizado de acordo com o

estabelecido por Cavrini (2011), e não ocorreu amplificação dos *primers* com o RNA MSW. Não foi possível obter controle positivo para este ensaio.

Figura 11 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os *primers* descritos por Waggoner (2018).



Fonte: a autora.

5.3.2. Padronização qPCR MAYV

5.3.2.1. Concentrações de primers e sonda para MAYV

Neste primeiro experimento de qPCR foi levada em conta a variação na concentração dos *primers* e o Ct referente a cada concentração, sendo o *threshold* ajustado de acordo com o início da amplificação. Como amostra foram utilizados 5 μ L de cada diluição de RNA transcrito, sendo que cada amostra foi pipetada em triplicata na placa. Para todos os experimentos realizados com os iniciadores de MAYV, foi utilizado como controle negativo o RNA de uma amostra de soro, já padronizado como controle negativo em todos os experimentos realizados no LABVIRO e, como controle positivo, o RNA do cultivo de células infectadas com MAYV foi empregado. Para o controle em branco foi utilizada água no lugar da amostra durante a pipetagem da placa de qPCR. Para determinar qual a melhor concentração de *primers* F e R, foram elaborados 4 conjuntos: FR1 (0,5 μ L de cada *primer* F e R por reação), FR2 (1 μ L de cada *primer* F e R por reação), FR3 (1,5 μ L de cada *primer* F e R por reação) e FR4

(2 μ L de cada *primer* F e R por reação). Os valores obtidos por cada conjunto FR utilizado estão apresentados no quadro 7.

Quadro 7 - Resultado da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de *primers* para MAYV utilizados neste estudo

Conjunto	Fluoróforo	Threshold	Ct
FR1	ABY	0,12	29,382
FR2	ABY	0,12	28,906
FR3	ABY	0,12	28,294
FR4	ABY	0,12	28,315

Fonte: a autora.

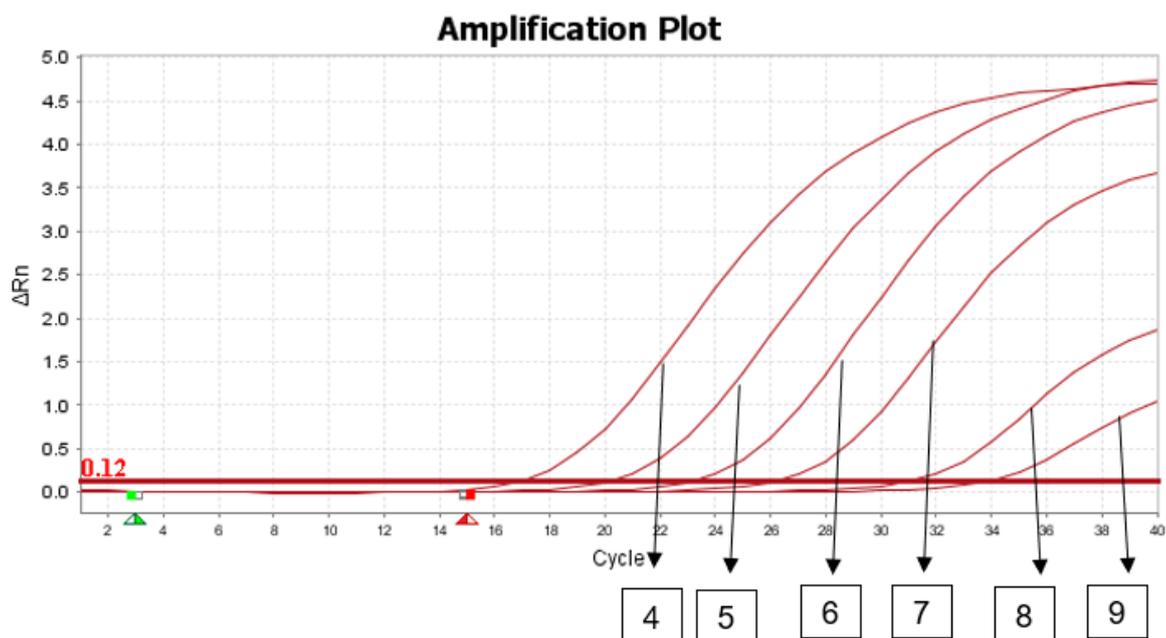
Para MAYV os conjuntos FR1 e FR2 apresentaram valores de Ct mais altos (29,382 e 28,906 respectivamente) quando comparados com os conjuntos FR3 e FR4. Estes últimos apresentaram uma diferença numérica em seus Ct relativamente pequena, porém de suma relevância em se tratando de PCR em tempo real. Levando em conta a sensibilidade do ensaio, para MAYV foi utilizado como padrão as concentrações obtidas em FR3, ou seja, foi empregada em cada reação 1,5 μ L de *primers* F e R a uma concentração de 10.000 nM.

5.3.2.2. Curva padrão com RNA MSW

Os *primers* e sonda de MAYV foram avaliados quanto a sua eficiência através de uma diluição seriada de 1:10 do RNA transcrito do plasmídeo MSW. Além de avaliar a eficiência, foi possível observar se o desenho do plasmídeo MSW, agora transcrito em RNA, condiz com os *primers* desenhados para este projeto. Como amostra foram utilizados 5 μ L de cada diluição de RNA transcrito, sendo que cada amostra foi pipetada em triplicata na placa. A amplificação do RNA derivado do plasmídeo MSW pode ser observada na Figura 122. O valor do *threshold* foi

estabelecido levando em conta o início da amplificação de acordo com a apresentação linear das curvas, e pode ser observado, juntamente com os valores de Ct, no quadro 8.

Figura 12 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os *primers* para MAYV



Fonte: a autora.

Quadro 8 – Valores de Ct para cada diluição de RNA MSW utilizada.

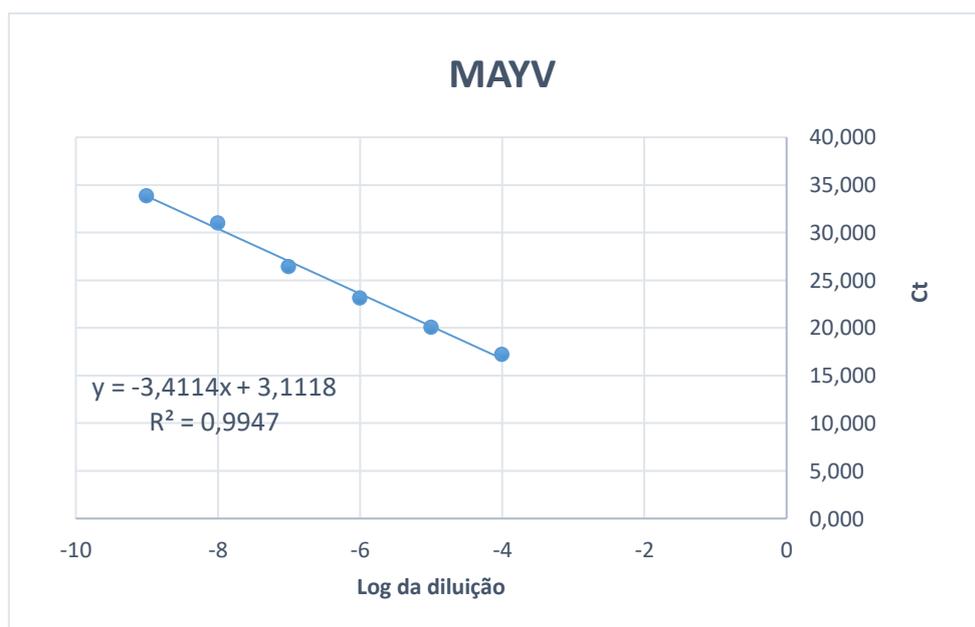
AMOSTRA	THRESHOLD	Ct
4	0,12	16,884
5	0,12	19,761
6	0,12	23,076
7	0,12	26,316
8	0,12	31,024
9	0,12	34,740

Fonte: a autora.

A inclinação obtida no

Gráfico 1 corresponde a -3,4114 e este valor aplicado na fórmula da eficiência resulta em 0,9639. Este valor foi multiplicado por 100 para obter a eficiência em porcentagem, sendo assim os *primers* apresentam uma eficiência de 96,39%, o que é aceitável de acordo com Dymond (2013).

Gráfico 1 - Diluição seriada de RNA MSW com *primers* de MAYV. No eixo Y é possível observar o Ct, enquanto no eixo X está o log da diluição.



Fonte: a autora.

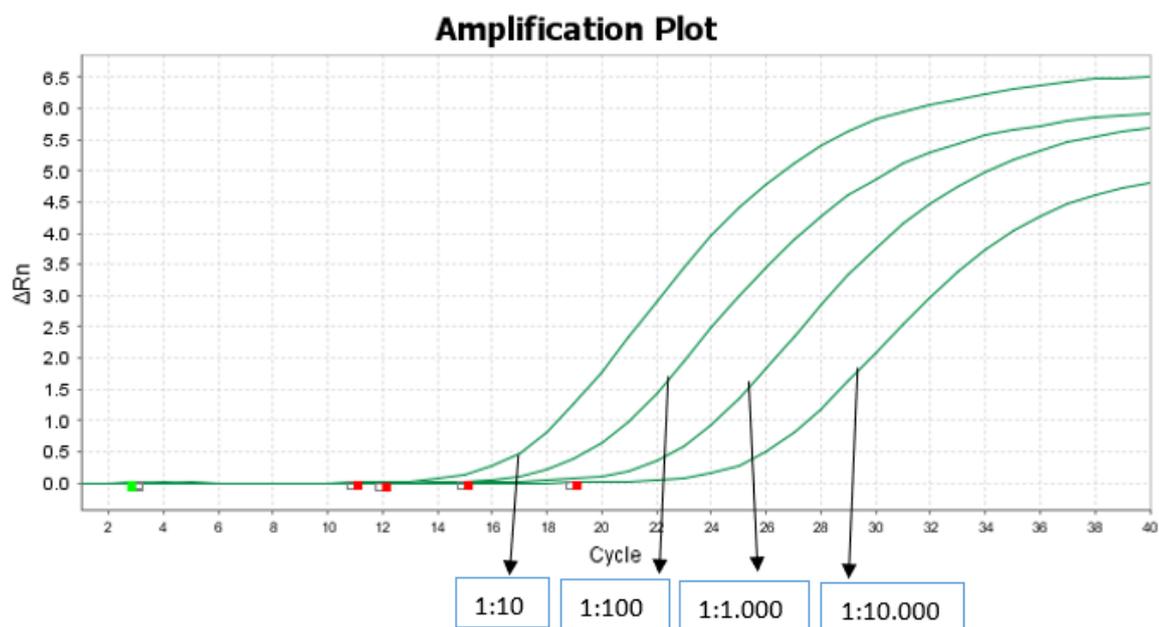
No desenvolvimento de um qPCR espera-se obter um alto nível de sensibilidade e um baixo limite de detecção (LOD). Por exemplo: com uma eficiência de 100%, uma diluição de 10x dá um Ct de 3,2 valores entre cada diluição (a cada 3,2 ciclos a quantidade de amplificação é 10 vezes maior).

Para a diluição 9 havia 1 cópia de RNA MSW, como pode ser observado no quadro 8, e o ensaio foi capaz de amplificar esta amostra nos Cts 34 e 35. O ensaio para determinação do LOD foi feito em triplicata em três momentos distintos. O LOD foi estipulado em 1 cópia de RNA, sendo assegurada a sensibilidade analítica do ensaio.

5.3.2.3. Curva de diluição de cultivo MAYV

Além de utilizar a diluição do RNA transcrito do plasmídeo MSW para testar os *primers*, foi utilizada também uma diluição seriada do RNA viral de cultivo de MAYV. Para a diluição em tampão AVE foi elaborada uma curva de diluição 1:10 com 4 pontos e em seguida foi realizado o qPCR com os *primers* e sonda desenhados para este estudo. As curvas de amplificação podem ser observadas na Figura 133, e os valores de Ct estão apresentados no quadro 9.

Figura 13 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA do cultivo MAYV.



Fonte: a autora.

Quadro 9 - Cts observados no qPCR para as diluições seriadas do cultivo de MAYV

DILUIÇÃO	Ct
1:10	15,304
1:100	17,366
1:1.000	20,588
1:10.000	23,659

Fonte: a autora.

Para todas as quatro diluições testadas, o conjunto MAYV de iniciadores e sonda, foi capaz de amplificar as amostras. Esse resultado demonstra a especificidade do conjunto MAYV assim como a sensibilidade na detecção de menores concentrações do vírus na amostra.

5.3.2.4. Ensaio para coinfeção

O objetivo do ensaio é o uso no diagnóstico de MAYV, e para isto foram testadas diferentes concentrações de vírus em amostras negativas de soro a fim de simular uma coinfeção. No ensaio para MAYV, o próprio RNA viral proveniente do cultivo foi utilizado como amostra, a fim de analisar a especificidade dos *primers*. Diferentes volumes de cultivo de MAYV foram inoculadas nessas amostras, além da adição de cultivo de outros vírus: WNV, OROV, CHIKV, ZIKV e DENV. As amostras utilizadas nesta etapa estão descritas no quadro 10.

Quadro 10 – Descrição das amostras utilizadas nos ensaios de coinfeccção para MAYV.

Código da amostra	Tipo	Vírus adicionados	Resultado (Ct)
M_R32	Soro	MAYV	26,758
M_R45	Soro	MAYV	22,591
M_R55	Soro	MAYV	24,639
M_R65	Soro	MAYV	22,475
M_R71	Soro	MAYV	23,869
MD_R32	Soro	MAYV e DENV	28,525
MD_R51	Soro	MAYV e DENV	24,827
MD_R52	Soro	MAYV e DENV	26,806
MW_R45	Soro	MAYV e WNV	26,315
MW_R71	Soro	MAYV e WNV	28,515
MDW_R52	Soro	MAYV, DENV e WNV	27,809
MZDO 5	Soro	MAYV, ZIKV, DENV e OROV	23,606
MZDO 3	Soro	MAYV, ZIKV, DENV e OROV	25,844
MO_R49	Soro	MAYV e OROV	29,435
MO_R55	Soro	MAYV e OROV	25,837
MDO_R51	Soro	MAYV, DENV e OROV	25,118
M_ZDC	Soro	MAYV, ZIKV, DENV e CHIKV	23,640
M_ZD	Soro	MAYV, ZIKV e DENV	24,943
M_ZC	Soro	MAYV, ZIKV e CHIKV	25,006

Fonte: a autora.

É possível observar que, mesmo na presença de outros vírus na mesma amostra, o ensaio conseguiu detectar MAYV. Este dado evidencia que, mesmo em situações de coinfeccção, é possível utilizar este ensaio no diagnóstico, pois o mesmo mantém sua eficiência e especificidade, independente da presença de outros vírus na mesma amostra. O ensaio foi capaz de detectar MAYV em todas as 19 amostras analisadas para coinfeccção, o que significa uma sensibilidade diagnóstica de 100%.

Nenhuma reatividade cruzada foi observada para o teste de especificidade analítica, que incluiu WNV, OROV, CHIKV, ZIKV e DENV. Sendo assim, não foram detectadas amostras falso-positivas.

5.3.2.5. Ensaios com amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV

Foram testadas amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV do próprio LABVIRO coletadas entre 2016 e 2017. Os *primers* e sonda específicos para MAYV foram utilizados. Os dados referentes a essas amostras estão apresentados no quadro 11:

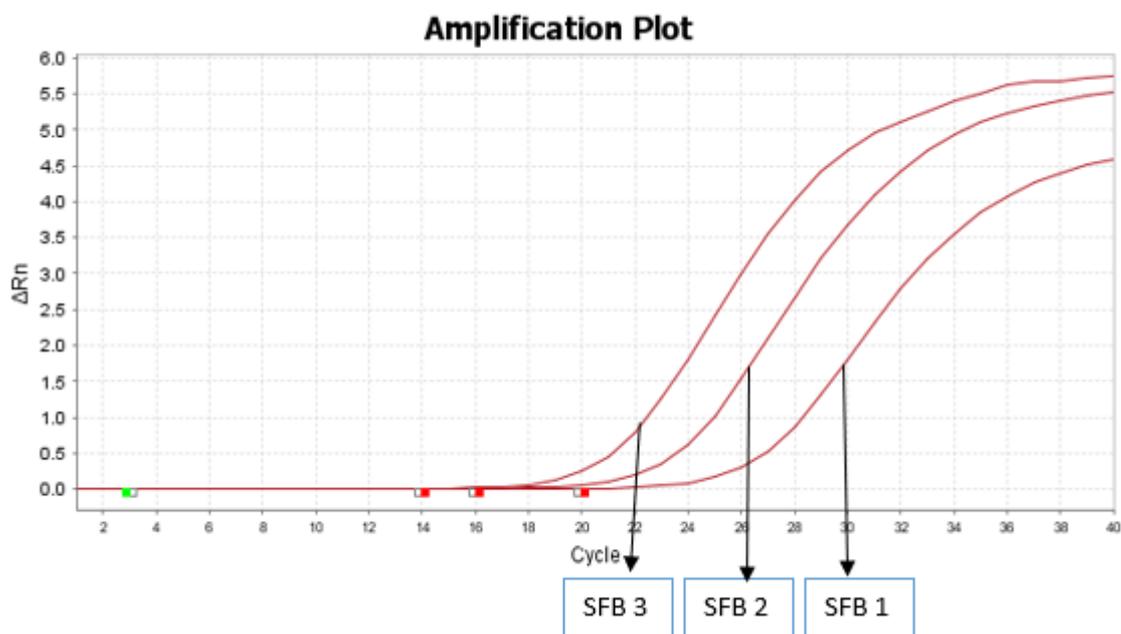
Quadro 11 - Descrição dos tipos de amostra e quantidade de amostras utilizadas nesse estudo.

TIPO DE AMOSTRA	QUANTIDADE	RESULTADO
Líquor	32	Negativo
Soro	53	Negativo
Saliva	5	Negativo
Urina	7	Negativo
Plasma	3	Negativo

Fonte: a autora.

Como pode ser observado no quadro 11, até o momento não foram encontradas amostras positivas para MAYV. As curvas de amplificação provenientes do qPCR com SFB em três diluições distintas podem ser observadas na Figura 14 :

Figura 14 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de MAYV em SFB.



Fonte: a autora.

5.3.3. Padronização qPCR SLEV

5.3.3.1. Concentrações de primers e sonda para SLEV

Para definir qual a melhor concentração de *primers* de SLEV por reação foi levada em conta a variação na concentração dos *primers* e o Ct referente a cada concentração, sendo o *threshold* ajustado de acordo com o início da amplificação. Como amostra foram utilizados 5 μ L de cada diluição de RNA transcrito, sendo que cada amostra foi pipetada em triplicata na placa. Para todos os experimentos realizados com os iniciadores de SLEV, foi utilizado como controle negativo o RNA de uma amostra de soro, já padronizado como controle negativo em todos os experimentos realizados no LABVIRO e, como controle positivo, o RNA do próprio plasmídeo MSW foi empregado. Para o controle em branco foi utilizada água no lugar da amostra durante a pipetagem da placa de qPCR. Os resultados numéricos referentes a este experimento podem ser observados no quadro 12:

Quadro 12 - Resultado da PCR em tempo real para análise das diferentes concentrações de *primers* para SLEV utilizados neste estudo.

VÍRUS	Conjunto	Fluoróforo	Threshold	Ct
SLEV	FR1	VIC	0,30	27,172
SLEV	FR2	VIC	0,30	26,852
SLEV	FR3	VIC	0,30	26,645
SLEV	FR4	VIC	0,30	26,447

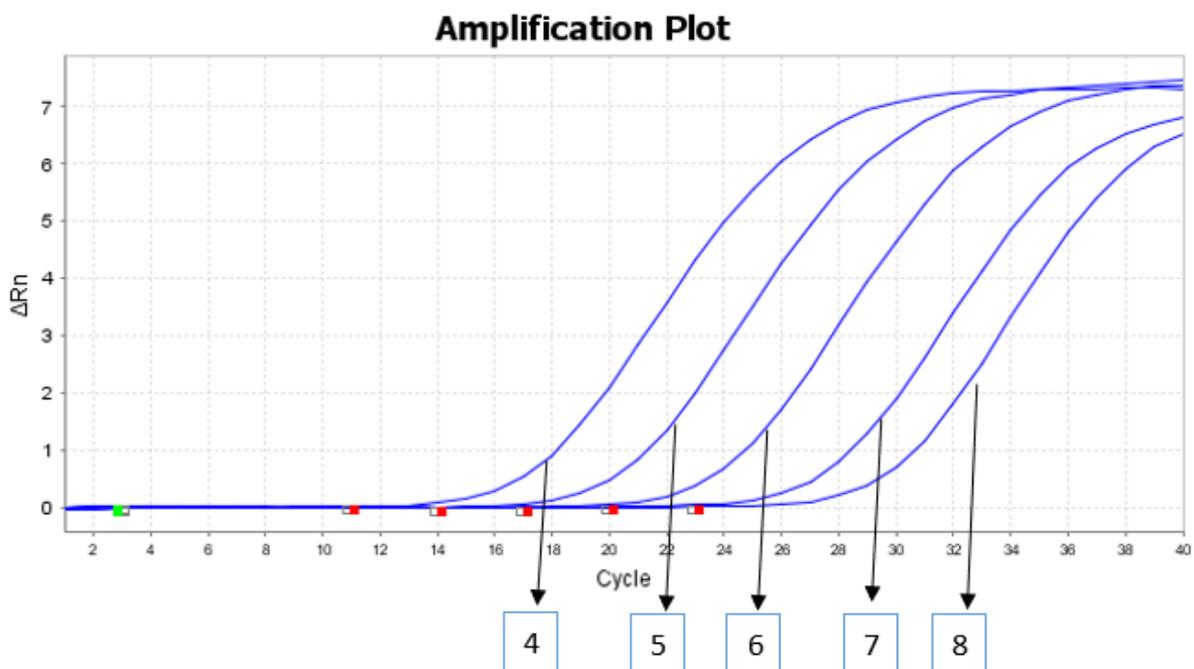
Fonte: a autora.

Em relação a SLEV, foi observado resultado similar a MAYV: os conjuntos FR1 e FR2 apresentaram valores de Ct mais altos em relação aos conjuntos FR3 e FR4, o que por si só torna inviável o desses conjuntos na rotina laboratorial. O conjunto FR4 apresentou menor Ct do que FR3 (26,447 e 26,645 respectivamente), indicando que a concentração de *primers* em FR4 possibilita a detecção de material genético precocemente. Definidas as concentrações ideais de *primers* F e R a serem utilizadas em cada reação, foi realizada em seguida a padronização do PCR em tempo real para SLEV.

5.3.3.2. Curva padrão com RNA MSW

Os *primers* e sonda para SLEV foram avaliados quanto a sua eficiência através da diluição seriada de 1:10 do RNA transcrito do plasmídeo MSW. Também foi possível observar com este ensaio se o desenho do plasmídeo MSW condiz com os *primers* desenhados. A amplificação do RNA derivado do plasmídeo MSW pode ser observada na Figura 155. O valor do *threshold* foi estabelecido levando em conta o início da amplificação de acordo com a apresentação linear das curvas.

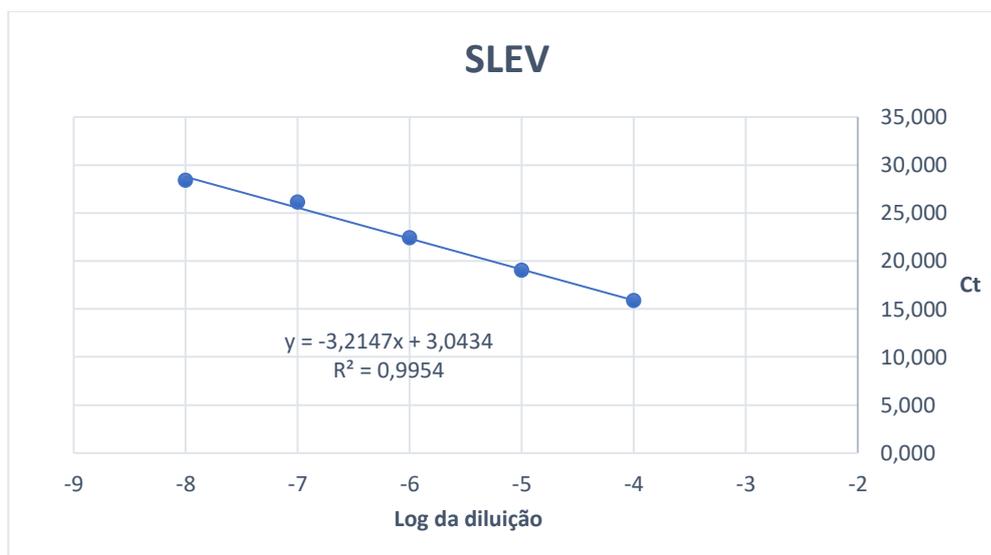
Figura 15 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de RNA MSW com os *primers* e sonda para SLEV



Fonte: a autora.

No gráfico 2 é possível observar a inclinação de -3,2147 e este valor aplicado na fórmula da eficiência resulta em 1,04678. Para calcular a eficiência em porcentagem, este valor foi multiplicado por 100, sendo assim os *primers* apresentam uma eficiência de 104,67%, dentro do range aceitável.

Gráfico 2 - Diluição seriada de RNA MSW com *primers* de SLEV. No eixo Y é possível observar o Ct, enquanto no eixo X está o log da diluição



Fonte: a autora.

Para determinação do LOD de SLEV foi utilizada a diluição 9 do RNA MSW, o qual continha 1 cópia de RNA (quadro 5). O ensaio foi feito em triplicata em três momentos distintos. Ocorreu amplificação da amostra nos Ct 34, sendo estipulada a detecção de 1 cópia de RNA como limite para o ensaio.

5.3.3.3. Ensaio para coinfeção

Devido à ausência de cultivo de células de SLEV, os ensaios para coinfeção foram realizados baseado na detecção do próprio RNA transcrito do plasmídeo MSW em meio contendo outros vírus. As amostras, assim como o Ct de cada uma, estão descritas no quadro 13.

Quadro 13 - Descrição das amostras utilizadas nos ensaios de co-infecção para SLEV.

Código da amostra	Tipo	Vírus adicionados	Resultado
S_R32	Soro	DENV	28,171
S_R49	Soro	OROV	25,338
S_R51	Soro	MAYV	25,048
S_R52	Soro	WNV e DENV	25,313
S_R71	Soro	WNV	25,060
S_Q1160	Soro	ZIKV, DENV e CHIKV	26,213
S_Q1162 200	Soro	CHIKV e WNV	26,146
S_Q1162 400	Soro	CHIKV e ZIKV	37,287

Fonte: a autora.

É notável que ocorreu amplificação mesmo na presença de outros vírus dentro da mesma amostra. Este dado evidencia que, mesmo em situações de coinfecção, é possível utilizar este ensaio no diagnóstico, pois o mesmo mantém sua eficiência e especificidade, independente da presença de outros vírus. Os valores de Ct indicam que a amplificação ocorreu nos ciclos 25, 26 e 28, o que significa a detecção do RNA MSW em um momento relativamente precoce da reação. Ou seja: o ensaio não apenas detectou o fragmento, como apresentou uma boa sensibilidade.

5.3.3.4. Ensaios com amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV

As amostras negativas para ZIKV, CHIKV e DENV do LABVIRO, coletadas entre 2016 e 2017, foram testadas com os *primers* e sonda de SLEV desenhados para este estudo. Os dados referentes a essas amostras estão apresentados no quadro 14:

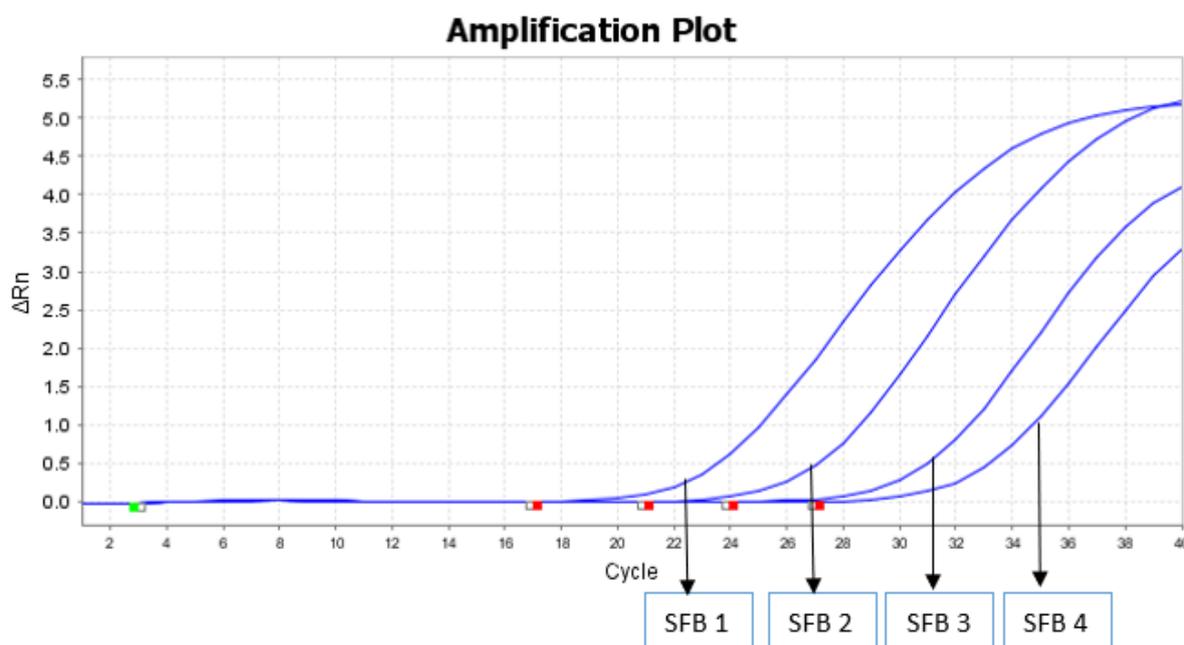
Quadro 14 - Descrição dos tipos e quantidade de amostras utilizada nesse estudo.

TIPO DE AMOSTRA	QUANTIDADE	RESULTADO
Líquor	32	Negativo
Soro	53	Negativo
Saliva	5	Negativo
Urina	7	Negativo
Plasma	3	Negativo

Fonte: a autora.

Como pode ser observado no quadro 14, até o momento não foram encontradas amostras positivas para SLEV. Para detecção em SFB foi realizada uma diluição seriada 1:10 com quatro pontos. As curvas de amplificação provenientes do qPCR podem ser observadas na figura 16:

Figura 16 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação da diluição seriada de SLEV em SFB



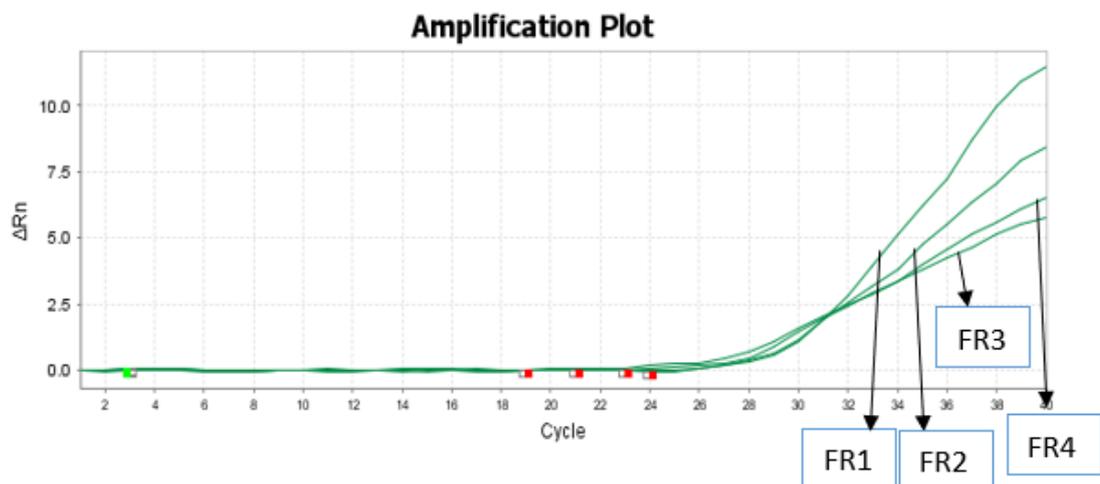
Fonte: a autora.

Os resultados observados na figura 17 permitem observar a detecção de cultivo de MAYV em SFB utilizando os primers desenhados para este estudo. Foi possível observar a formação das fases exponencial e platô nas curvas de amplificação em SFB, provando mais uma vez que o ensaio se mostra sensível.

5.3.4. Padronização qPCR WNV

Foram desenhados *primers* e sondas específicos para WNV. Para definir qual a melhor concentração de *primers* de WNV por reação foram utilizados 5 μ L de cada diluição de RNA transcrito. Para os experimentos realizados com os iniciadores de WNVV foi utilizado o RNA de uma amostra de soro como controle negativo, já padronizado como controle negativo em todos os experimentos realizados no LABVIRO e, como controle positivo, o RNA do cultivo de células infectadas com WNV foi empregado. Para o controle em branco foi utilizada água no lugar da amostra durante a pipetagem da placa. Ao analisar o qPCR, foi possível observar o seguinte resultado (Figura 177):

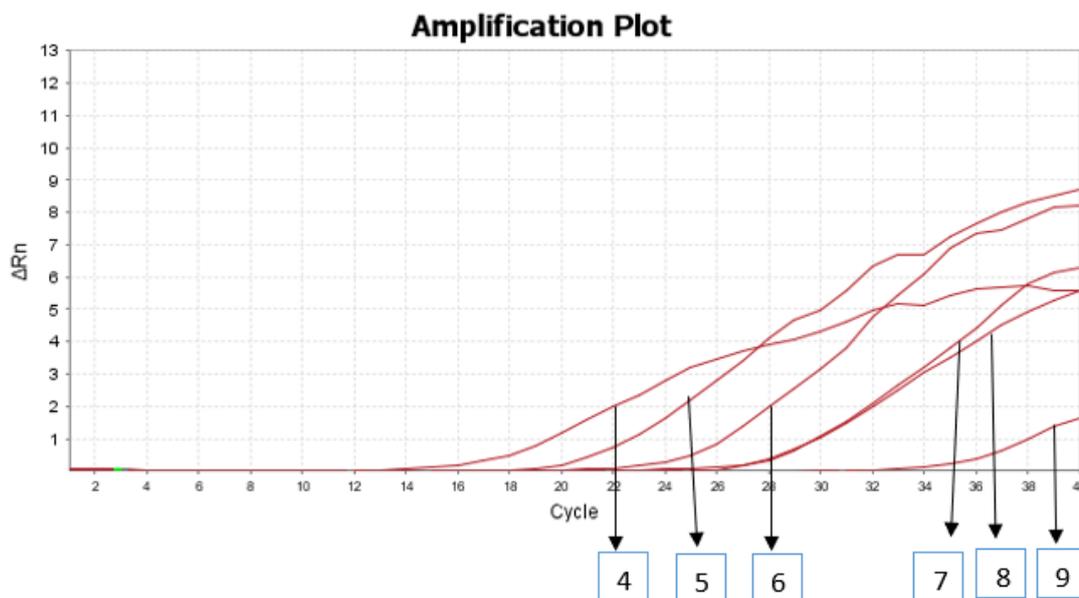
Figura 17 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação do RNA MSW com diferentes concentrações de *primers* para WNV



Fonte: a autora.

Como se pode observar na figura 18, o ensaio para WNV apresentou um padrão distinto em suas curvas, diferentemente do que foi observado para MAYV e SLEV. Não foi possível observar as fases exponencial e platô, tampouco estabelecer um *threshold* com segurança. Além disso, as curvas para MAYV e SLEV apresentaram uma variação de fluorescência, representada pelo ΔRn , inferior ao que foi apresentado para WNV. Esta variação se deu em virtude da ausência da referência passiva Mustang Purple. Por conta das condições atípicas dos anos 2020 e 2021, em decorrência da pandemia do COVID-19, não foi possível a obtenção em tempo hábil do corante fluorescente supracitado. Foi feito um ensaio com os *primers* e sonda para WNV, porém sem ROX na reação. Como amostra foram utilizadas as diluições seriadas de RNA MSW. O resultado pode ser observado na figura 18.

Figura 18 - Representação pelo software QuantStudio da amplificação do RNA MSW com *primers* para WNV.



Fonte: a autora.

A partir dos experimentos representados nas figuras 18 e 19 foi possível observar que as curvas não obtiveram o perfil esperado para WNV. Devido à ausência do Mustang Purple durante a execução deste projeto, não foi possível realizar a padronização.

6. DISCUSSÃO

A vigilância epidemiológica se faz necessária no Brasil. O estudo acerca da diversidade genética dos vírus em circulação se mostra essencial, pois através deste é possível vislumbrar o desenho de vacinas e melhorar os métodos de diagnóstico molecular disponíveis. Informações sobre quando e onde um vírus entrou no país levam a melhores estimativas das datas de introdução em cada região. Desse modo, é possível traçar quais as tendências e os vetores da disseminação do vírus nos estados e municípios brasileiros.

No que tange aos métodos diagnóstico, as aplicações da PCR em tempo real são inúmeras e, diante da pandemia do COVID-19, esta metodologia tem sido de extrema utilidade na detecção viral. A relevância deste tipo de ensaio é notável, especialmente no que se refere a especificidade e sensibilidade. Para os vírus testados neste estudo foi possível analisar sensibilidade analítica e diagnóstica e especificidade analítica e diagnóstica.

De acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde (2017), o manejo clínico pode se dar de duas formas: direta ou indireta. O modo direto ou molecular ocorre a partir da detecção de RNA viral nas amostras através de qPCR. O modo indireto ou sorológico busca anticorpos específicos para o vírus no soro do paciente. Ambos os métodos, molecular e sorológico, são eficazes, porém o qPCR se mostra rápido e confiável, sendo possível um acompanhamento real da disseminação de arboviroses. O qPCR permite que regiões-alvo de pequenas quantidades de DNA sejam amplificadas exponencialmente, gerando grandes quantidades da região-alvo.

Os *primers* e sonda utilizados para detecção de MAYV se mostraram eficazes e, por conta disto, foi possível obter um ensaio com alta especificidade e sensibilidade. Os iniciadores foram desenhados a partir do gene da glicoproteína E1 do envelope, sendo esta região muito utilizada para desenho de primers por conta de sua conservação. No que diz respeito à especificidade analítica, nenhuma reatividade cruzada foi observada no ensaio de co-infecção, que incluiu amostras com WNV, OROV, CHIKV, ZIKV e DENV. Não foram detectadas amostras falso-positivas, ou seja, não foi detectado nenhum outro vírus a não ser o próprio MAYV presente na amostra, o que garante a especificidade do método. O ensaio foi capaz de detectar

MAYV em todas as 19 amostras analisadas para coinfeção, o que significa uma sensibilidade diagnóstica de 100%.

Para determinar a sensibilidade analítica foi calculado o LOD, definido como o número mínimo de cópias detectável em um ensaio. O qPCR de MAYV foi capaz de detectar uma única cópia de RNA, sendo assegurada assim uma alta sensibilidade para o ensaio. A diluição de cultivo de células de MAYV também apresentou resultados satisfatórios no qPCR, sendo possível detectar amplificação para cada uma das diluições a partir dos *primers* desenhados para este ensaio. De acordo com Waggoner e colaboradores (2018), a sensibilidade do ensaio pode ser particularmente importante para a detecção de MAYV, pois a viremia só é detectável por 3-5 dias após o início dos sintomas.

Em comparação com os ensaios desenvolvidos por outros autores, os *primers* para MAYV descritos por Naveca e colaboradores (2017) apresentaram uma eficiência de 98,64%, enquanto os iniciadores descritos neste trabalho indicaram 96,39% de eficiência. De acordo com Dymond (2013), a eficiência dos *primers* deve ser entre 95 - 110%, logo os *primers* para MAYV estão de acordo com o padrão.

Os *primers* de SLEV apresentaram eficiência de 104,67%, o que está dentro do padrão de acordo com Dymond (2013). O limite de detecção para SLEV foi de 1 cópia de RNA MSW, sendo então um ensaio de alta sensibilidade. Para os ensaios de coinfeção foi utilizado o próprio RNA MSW como padrão, pois não foi possível obter a cultura de SLEV. Numa mesma amostra de soro foi adicionado RNA MSW juntamente com outros vírus e em seguida foi realizado o qPCR. Das 8 amostras testadas, ocorreu amplificação em 100% dos casos, sendo todas detectadas pelos *primers* e sonda de SLEV, o que assegura uma alta especificidade. Também foi inoculada como amostra no qPCR o cultivo de WNV, OROV, ZIKV, CHIKV e DENV, a fim de detectar possíveis reações cruzadas. Não ocorreu amplificação dos cultivos descritos, o que ratifica a especificidade do ensaio.

De acordo com Lanciotti (2003), é possível observar uma redução na sensibilidade ao usar *primers* degenerados quando comparados aos *primers* não degenerados específicos para vírus. Como os ensaios para SLEV e MAYV possuem bases degeneradas nos iniciadores F e R, a sensibilidade poderia ser comprometida.

De acordo com os experimentos realizados, a sensibilidade do ensaio não foi comprometida pelos iniciadores degenerados.

O protocolo desenvolvido possui algumas limitações, dentre elas o pequeno número de amostras testadas. O volume de amostras negativas para ZIKV, DENV e CHIKV é enorme e seria necessário um maior tempo para testar todas para MAYV e SLEV.

7. CONCLUSÃO

As conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho são:

- Os *primers* e sonda para MAYV e SLEV apresentaram boa eficiência;
- O ensaio de qPCR para MAYV e SLEV se mostrou específico e sensível, sendo possível o seu uso na rotina diagnóstica;
- Não foram encontradas amostras positivas para MAYV e SLEV durante a execução deste projeto;
- Os *primers* e sonda para MAYV e SLEV não amplificaram outro vírus, assegurando sua especificidade.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-LUIS, M. A. et al. A silent public health threat: emergence of Mayaro virus and co-infection with Dengue in Peru. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 29, 21 jan. 2021.
- AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 1–6, 18 set. 2015.
- BAILLIE, G. J. et al. Phylogenetic and evolutionary analyses of St. Louis encephalitis virus genomes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 717–728, maio 2008.
- BIORAD. The Ultimate qPCR Assay Design Guide. **Bulletin 6894 Ver B | 19-2076 NASD**, p. 1–4, 2019.
- BITTAR, C. et al. Lack of serological and molecular evidence of arbovirus infections in bats from Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0207010, 7 nov. 2018.
- BUSCH, M. P. et al. Virus and Antibody Dynamics in Acute West Nile Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 984–993, out. 2008.
- BUSTIN, S. A. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays** *Journal of Molecular Endocrinology*. [s.l.: s.n.].
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CATENACCI, L. S. et al. Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **EcoHealth**, v. 15, n. 4, p. 777–791, dez. 2018.
- CAVRINI, F. et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Virology**, v. 50, n. 3, p. 221–223, mar. 2011.
- COIMBRA, T. L. M. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 221–224, ago. 2007.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.
- DYMOND, J. S. **Explanatory chapter: Quantitative PCR**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 529
- FARIA, N. R. et al. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, p. 97, dez. 2016.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, abr. 2007.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. O vírus do Nilo Ocidental. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 604–612, 31 out. 2008.

- FONSECA, L. M. DOS S. et al. Oropouche Virus Detection in Febrile Patients' Saliva and Urine Samples in Salvador, Bahia, Brazil. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 73, n. 2, p. 164–165, 2020.
- GIOVANNI DE-SIMONE, S. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, 2 set. 2014.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1–13, 1 dez. 2017.
- HONÓRIO, N. A. et al. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida Aedes Albopictus Populations. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 353, 17 abr. 2019.
- JALALI, M.; ZABOROWSKA, J.; JALALI, M. **The Polymerase Chain Reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. FEB, p. 1–9, 2017.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.
- LANCIOTTI, R. S. Molecular Amplification Assays for the Detection of Flaviviruses. In: **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, 2003. v. 61p. 67–99.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.
- LEON, F. et al. An Innovative Multiplexed and Flexible Molecular Approach for the Differential Detection of Arboviruses. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2019.
- LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, fev. 2018.
- LEVI, J. E. Arbovirus epidemics and blood safety in Brazil. **ISBT Science Series**, v. 12, n. 1, p. 233–238, 2017.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 0, 2016.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, fev. 2014.
- LUSTIG, Y. et al. Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2421, 2018.
- MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2 jul. 2019.
- MADEWELL, Z. J. Arboviruses and Their Vectors. **Southern Medical Journal**, v. 113, n. 10, p. 520–523, out. 2020.

- MARQUES, R. E. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA. p. 97, 2016.
- MARTÍN-ACEBES, M. A. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. **World Journal of Virology**, v. 1, n. 2, p. 51, 2012.
- MONDINI, A. et al. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 176–178, jan. 2007.
- MORALES, M. A. et al. Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005351, 10 fev. 2017.
- MORELI, M. L. et al. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n. 1, p. 139–142, jan. 2002.
- MOTA, M. T. DE O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, set. 2015.
- MUSSO, D. et al. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e355–e361, 1 nov. 2018.
- 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, jul. 2017.
- NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G. DE; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, n. 5, p. 358–363, nov. 2007.
- NOGUEIRA, R. M. R.; DE ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, jun. 2011.
- PEREIRA SERRA, O. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–29, 2016.
- RÉ, V. et al. Reliable detection of St. Louis encephalitis virus by RT-nested PCR. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 1, p. 10–15, jan. 2008.
- ROCCO, I. M. et al. ST. LOUIS ENCEPHALITIS VIRUS: FIRST ISOLATION FROM A HUMAN IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL. p. 5, [s.d.].
- SAATKAMP, C. J. et al. Mayaro virus detection in the western region of Pará state, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e0055-2020, 2021.

SANTOS, C. L. S. DOS et al. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 57–63, fev. 2006.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, 2011.

VEDOVELLO, D. et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. **Archives of Virology**, v. 160, n. 5, p. 1189–1195, maio 2015.

WAGGONER, J. J. et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, p. 1–4, 1 jan. 2018.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 1 maio 2009.

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

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 820–823, 19 ago. 2014.