



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ HENRIQUE FRANCISCO ROMA

EPIDEMIOLOGIA E PERFORMANCE DE ENSAIOS MOLECULARES DE CASOS
SUSPEITOS DE FEBRE DO ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA NA REGIÃO
SUDESTE DE MATO GROSSO

CAMPINAS

2022

JOSÉ HENRIQUE FRANCISCO ROMA

EPIDEMIOLOGIA E PERFORMANCE DE ENSAIOS MOLECULARES DE CASOS
SUSPEITOS DE FEBRE DO ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA NA REGIÃO
SUDESTE DE MATO GROSSO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área
de Clínica Médica.

ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA MARIANGELA RIBEIRO RESENDE
CO-ORIENTADORA: PROFESSORA DOUTORA JULIANA HELENA C. PAVONI

Este trabalho corresponde à versão final da Dissertação
defendida pelo aluno José Henrique Francisco Roma e orientado
pela Prof^a. Dr^a. Mariângela Ribeiro Resende e coorientado pela
Prof^a. Dr^a. Juliana Helena Chavez Pavoni.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Patricia de Paula Ravaschio - CRB 8/6426

R66e Roma, José Henrique Francisco, 1981-
Epidemiologia e performance de ensaios moleculares de casos suspeitos de febre do zika, dengue e chikungunya na região sudeste de Mato Grosso / José Henrique Francisco Roma. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Mariângela Ribeiro Resende.
Coorientador: Juliana Helena Chavez Pavoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
Em regime interinstitucional com: Universidade Federal de Rondonópolis.

1. Epidemiologia molecular. 2. Arbovirus. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Sensibilidade e especificidade. 5. Sorologia. I. Resende, Mariângela Ribeiro, 1966-. II. Pavoni, Juliana Helena Chavez. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Epidemiology and performance of molecular assays from zika, dengue and chikungunya fever suspected cases in the southeastern region of Mato Grosso

Palavras-chave em inglês:

Molecular epidemiology

Arboviruses

Polimerase chain reaction

Sensitivity and specificity

Serology

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Mariângela Ribeiro Resende [Orientador]

Clarice Weis Arns

Ludiele Souza Castro

Data de defesa: 28-07-2022

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7990-6750>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7159197591375236>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JOSÉ HENRIQUE FRANCISCO ROMA

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE

COORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. JULIANA HELENA CHAVEZ PAVONI

MEMBROS:

1. Dr^ª. Mariângela Ribeiro Resende

2. Dr^ª. Clarice Weis Arns

3. Dr^ª. Ludiele Souza Castro

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data da Defesa: 28/07/2022

Dedico este estudo à minha família, minha mãe
Aparecida, minhas irmãs **Carla e Paula** e meus
sobrinhos **Isac e Théo**, minha inspiração para seguir.
A eles, todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que me apoiaram e contribuíram para a realização desse estudo.

As minhas orientadoras, Prof^ª. Dr^ª. Juliana Helena Chavez Pavoni e Prof^ª. Dr^ª. Mariângela Ribeiro Resende, pela orientação, paciência, compreensão e atenção dispensadas, pela presença constante, pelo conhecimento compartilhado e pela oportunidade de qualificação profissional. Meus sinceros agradecimentos pelo suporte durante todo o percurso desse mestrado.

Aos(as) Professores(as) Dr^ª. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann, Dr. Aristides José da Silva Júnior e Dr. Graciano Almeida Sudré por oportunizar este Mestrado Interinstitucional.

Aos(as) colegas Rachel, Tuti e Bruno pelo conhecimento compartilhado e apoio durante esta jornada.

Aos que partilharam o mesmo percurso, os colegas de Mestrado, meus agradecimentos pelo apoio e companheirismo.

Aos colegas de trabalho pela importância que tiveram neste percurso.

A minha família, pela incondicional compreensão, estímulo e suporte.

A sociedade científica, pela inestimável dedicação e esforço na busca da descoberta e do aprimoramento científico.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 432056/2016-5 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT), processo nº 0226317/2017.

RESUMO

Introdução: As arboviroses representam um problema de saúde pública em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento, causando síndromes febris agudas semelhantes com graves prejuízos à saúde humana e mortalidade. Neste sentido, a notificação adequada e o diagnóstico preciso tem sido um desafio em países endêmicos para o vírus Dengue (DENV), especialmente após a introdução dos vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). **Objetivos:** Este estudo teve como objetivo analisar as características clínicas, epidemiológicas e sorológicas de pacientes com síndrome febril aguda e suspeita das arboviroses dengue, zika e chikungunya, notificados durante a primeira epidemia de ZIKV no Brasil, ocorrida nos anos de 2015 e 2016, na região Sudeste de MT. Além disso, avaliou-se a performance de protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa (nested-RT-PCR) em um cenário de epidemia de ZIKV considerando a RT-qPCR como teste de referência. **Metodologia:** As características epidemiológicas e clínicas das arboviroses foram analisadas em uma coorte retrospectiva descritiva com 197 participantes. A determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios moleculares nested-RT-PCR e RT-qPCR para ZIKV, DENV e CHIKV e a avaliação sorológica por detecção de anticorpos IgM e IgG anti-ZIKV foram realizadas em 179 amostras de soro. **Resultados:** Dos 197 pacientes participantes do estudo, 63% eram do sexo feminino, oito estavam grávidas. A média de idade foi de 32 anos, com 44% entre 19-59 anos; 28% eram brancos, 34% tinham instrução educacional e 58,9% eram residentes urbanos. Cerca de 61% dos casos ocorreram durante as estações chuvosas, sendo 12,1% em três regiões da área de estudo. Distúrbios musculoesqueléticos foram as principais queixas (22,8%), seguidas de exantema e petéquias (12,6%), febre (13,7%), cefaleia (11,7%), prurido (10%), manifestações oftalmológicas (6,1%) e gastrintestinais (5,6%). Ensaios moleculares detectaram 8,9% e 3,3% das amostras positivas para os vírus zika e dengue, respectivamente. Os ensaios sorológicos para Zika mostraram 10,6% de amostras positivas para IgM e 55,8% para IgG. Pelos protocolos moleculares, na RT-qPCR, 3 (1,67%) amostras foram positivas para DENV e 16 (8,94%) foram positivas para ZIKV, enquanto no RT-PCR 5 (2,79%) amostras foram determinadas como positivas para DENV e 3 (1,67%) para ZIKV. O RNA de CHIKV não foi detectado nas amostras testadas. A sensibilidade e especificidade da nested-RT-PCR para DENV foram 66,66% e 98,29%, respectivamente; A detecção de RNA do ZIKV teve 18,75% de sensibilidade e 100% de especificidade com o protocolo nested-RT-PCR, com acurácia de 97,76% e 92,74% para DENV e ZIKV, respectivamente. **Conclusão:** Este estudo fornece perfil clínico, epidemiológico e de performance laboratorial de relevância singular para a compreensão da circulação desses arbovírus na região estudada por seu caráter inédito para o local, em uma emergência do ZIKV e cenário de alta endemicidade do DENV. O estudo nos permite compreender a introdução e ocorrência concomitante de uma arbovirose emergente, além de estabelecer o ensaio de RT-qPCR como o método mais confiável para diagnosticar casos suspeitos de dengue e febre zika, fornecendo resposta laboratorial precisa e oportuna para o manejo adequado dos pacientes.

Palavras-chave: arbovírus; epidemiologia molecular; sorologia; reação em cadeia da polimerase; sensibilidade e especificidade.

ABSTRACT

Introduction: Arboviruses represent a public health problem worldwide, especially in developing countries, causing similar acute febrile syndromes with serious harm to human health and mortality. These viruses cause similar acute febrile syndromes. In this sense, adequate reporting and accurate diagnosis have been a challenge in endemic countries for Dengue virus (DENV), especially after the introduction of Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses. **Objective:** This study aimed to analyze the clinical, epidemiological, and serological characteristics of patients with acute febrile syndrome and suspected of dengue, zika and chikungunya arboviruses, reported during the first ZIKV outbreak in Brazil, which occurred from 2015 to 2016 in the Southern region of MT State. In addition, the evaluation of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (nested-RT-PCR) protocols considering RT-qPCR as a reference test was performed in a ZIKV epidemic scenario. **Methods:** The epidemiological and clinical characteristics of arboviruses were analyzed in a descriptive retrospective cohort with 197 participants. Determination of sensitivity and specificity of nested-RT-PCR and RT-qPCR molecular assays for ZIKV, DENV and CHIKV and serological evaluation by detection of anti-ZIKV IgM and IgG antibodies were performed in 179 serum samples. **Results:** Of the 197 patients participating in the study, 63% were female, eight were pregnant. The mean age was 32 years, with 44% between 19-59 years; 28% were white, 34% were scholarship and 58.9% were urban residents. About 61% of the cases occurred during the rainy seasons, with 12.1% in three regions of the study area. Musculoskeletal disorders were the main complaints (22.8%), followed by rash and petechiae (12.6%), fever (13.7%), headache (11.7%), pruritus (10%), ophthalmologic (6.1%) and gastrointestinal (5.6%) manifestations. Molecular assays detected 8.9% and 3.3% of Zika and Dengue viruses, respectively. Serological assays for ZIKV showed 10.6% of samples positive for IgM and 55.8% for IgG. By molecular protocols, in RT-qPCR, 3 (1.67%) samples were positive for DENV and 16 (8.94%) were positive for ZIKV, while in RT-PCR 5 (2.79%) samples were determined as positive for DENV and 3 (1.67%) for ZIKV. CHIKV RNA was not detected. The sensitivity and specificity of nested-RT-PCR for DENV were 66.66% and 98.29%, respectively; The detection of ZIKV RNA had 18.75% sensitivity and 100% specificity with the nested-RT-PCR protocol, with an accuracy of 97.76% and 92.74% for DENV and ZIKV, respectively. **Conclusion:** This study provides clinical, epidemiological profile and laboratory performance of singular relevance to the understanding of the circulation of these arboviruses in the region studied due to their unprecedented data for the place, in a ZIKV emergency and a scenario of high DENV endemicity. The study allows us to understand the introduction and concomitant occurrence of an emerging arbovirus, in addition to establishing the RT-qPCR assay as the most reliable method for diagnosing suspected cases of dengue and zika fever, providing an accurate and timely laboratory response for the proper management of the patients.

Key words: arbovirus; molecular epidemiology; serology; Polymerase Chain Reaction; sensitivity and specificity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição da taxa de incidência de febre do Dengue por município até a semana epidemiológica 24, Brasil, 2022.....	18
Figura 2. Incidência de febre zika por município até a semana epidemiológica 21, Brasil, 2022.	19
Figura 3. Distribuição da taxa de incidência de febre chikungunya por município até a semana epidemiológica 24, Brasil, 2022.....	20
Figura 4. Organização estrutural dos vírus da família <i>Flaviviridae</i>	21
Figura 5. Organização genômica dos vírus da família <i>Flaviviridae</i>	21
Figura 6. Organização estrutural dos vírus da família <i>Togaviridae</i>	22
Figura 7. Organização genômica dos vírus da família <i>Togaviridae</i>	22
Figura 8. Representação esquemática da Reação em Cadeia da Polimerase.	27
Figura 9. Localização geográfica da área de estudo.	30
Figura 10. Avaliação in sílico de protocolo nested-RT-PCR para detecção de ZIKV.	34
Figura 11. Localização geográfica da área de estudo e distribuição das notificações por bairro.	41
Figura 12. Curvas de amplificação das amostras positivas para DENV e ZIKV por RT-qPCR.	43
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos ensaios nested-RT-PCR para DENV e ZIKV.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de gênero Flavivirus por RT-PCR.	33
Tabela 2. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de DENV por nested-RT-PCR.	34
Tabela 3. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de ZIKV por RT-PCR e nested-RT-PCR.	35
Tabela 4. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de CHIKV por RT-PCR.	35
Tabela 5. Características sociodemográficas dos casos suspeitos de arboviroses em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).	40
Tabela 6. Características clínicas de casos suspeitos de arbovirose em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).	42
Tabela 7. Desempenho do ensaio nested-RT-PCR para detecção de RNA de DENV e ZIKV em 179 amostras clínicas de soro.	43
Tabela 8. Resumo da investigação molecular e sorológica de amostras de soro de casos suspeitos de arboviroses em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	– <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	– <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CHIKV	– <i>Chikungunya virus</i>
CN	– Controle Negativo
CP	– Controle Positivo
Ct	– <i>Cycle Threshold</i>
DSA	– Dengue com Sinais de Alarme
DENV	– <i>Dengue virus</i>
DG	– Dengue Grave
DNA	– <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	– <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DO	– Densidade Óptica
ELISA	– <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GER	– <i>Germany</i>
IgG	– Imunoglobulina G
IgM	– Imunoglobulina M
LACEN	– Laboratório Central de Saúde Pública
MAYV	– <i>Mayaro virus</i>
mM	– Milimolar
M-MuLV	– <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MT	– Mato Grosso
NCBI	– <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NUPEC	– Núcleo de Pesquisas em Produção e Conservação do Cerrado
OMS	– Organização Mundial de Saúde
OROV	– <i>Oropouche virus</i>
pb	– pares de base
PCR	– <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PM	– Peso Molecular
qPCR	– <i>quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
RefSeq	– <i>Reference Sequence</i>
RFU	– <i>Relative Fluorescence Units</i>
RNA	– <i>Ribonucleic Acid</i>

RT – *Reverse Transcription*

RU – *Relative Units*

SCZ – Síndrome Congênita do Zika

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SLEV – *Saint Louis encephalitis virus*

U – Unidade

UFR – Universidade Federal de Rondonópolis

UTR – *Untranslated Region*

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1.	Histórico e Epidemiologia dos Arbovírus Dengue, Zika e Chikungunya	17
2.1.1.	Vírus Dengue no Brasil	18
2.1.2.	Vírus Zika no Brasil	19
2.1.3.	Vírus Chikungunya no Brasil	20
2.2.	Classificação Morfologia e Genoma dos Arbovírus Dengue, Zika e Chikungunya.....	20
2.2.1.	Vírus Dengue e Zika	20
2.2.2.	Vírus Chikungunya	22
2.3.	Vetor e Transmissão.....	23
2.4.	Manifestações clínicas das Arboviroses dengue, zika e chikungunya.....	23
2.5.	Diagnóstico Laboratorial.....	24
2.5.1.	Diagnóstico Sorológico.....	25
2.5.2.	Isolamento Viral.....	25
2.5.3.	Diagnóstico Molecular	26
2.6.	Prevenção e Controle	28
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	Objetivo Geral.....	29
3.2.	Objetivos Específicos.....	29
4.	METODOLOGIA	30
4.1.	Delineamento do Estudo	30
4.2.	Local do Estudo.....	30
4.3.	Amostragem	31
4.3.1.	Crítérios de Elegibilidade Amostral	31
4.4.	Análise Descritiva das Informações Demográficas e Clínicas	32
4.5.	Ensaio Laboratoriais	32
4.5.1.	Ensaio Moleculares.....	32
4.5.1.1.	Extração de RNA	32
4.5.1.2.	Transcrição Reserva (<i>RT</i>).....	33
4.5.1.3.	Multiplex-Nested-RT-PCR para Detecção de RNA de DENV	33
4.5.1.4.	Nested-RT-PCR para Detecção de RNA de ZIKV	34
4.5.1.5.	RT-PCR para Detecção de RNA de CHIKV	35
4.5.1.6.	Eletroforese dos Produtos da RT-PCR e da nested-RT-PCR	36
4.5.1.7.	Sequenciamento Nucleotídico e Análise das Sequências	36
4.5.1.8.	RT-qPCR para Detecção de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV	36
4.5.2.	Ensaio Sorológicos	37
4.6.	Avaliação Estatística	38
4.7.	Aspectos Éticos	38
4.8.	Limitações do Estudo	38

5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS.....	59
Anexo I.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus, do inglês *arthropod-born viruses*, são vírus transmitidos principalmente por hospedeiros artrópodes, como os mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus* e carrapatos, classificados como vírus zoonóticos que tiveram origem em ciclos silvestres enzoóticos e possuem ácido ribonucleico (RNA) como genoma^{1,2}.

Existem cerca de 534 espécies de arbovírus identificados, dos quais aproximadamente 134 são considerados zoonóticos. Os arbovírus de importância médica estão classificados em cinco famílias, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, com relevante significado para a saúde pública, especialmente nas últimas décadas, pela ampla distribuição e importantes surtos epidêmicos responsáveis por síndromes febris agudas com inúmeras manifestações clínicas que incluem distúrbios neurológicos, articulares e hemorrágicos, encefalites e síndromes congênitas³⁻⁵.

Apesar da ampla distribuição geográfica, as arboviroses ocorrem principalmente em regiões com clima tropical e inúmeros fatores são fundamentais para o surgimento de novas doenças causados por esses vírus. Tanto a introdução quanto a disseminação desses agentes devem ocorrer simultaneamente para a manutenção de complexos ciclos envolvendo vetores, hospedeiros e a infecção em humanos⁶.

No Brasil, as atuais mudanças climáticas associadas ao desmatamento e as condições socioeconômicas da população representam aspectos críticos favoráveis à emergência e reemergência de arboviroses, destacando no país a ocorrência de síndromes febris agudas provocadas pelos vírus da Dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus Zika (ZIKV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), vírus Chikungunya (CHIKV), vírus Mayaro (MAYV) e vírus Oropoche (OROV)^{1,7-9}, além de outros representantes recentemente descritos mas ainda não relacionados com doenças em humanos¹⁰⁻¹².

Apesar de número significativo de infecções assintomáticas, as arboviroses são responsáveis por síndromes moderadas e graves. Além disso, a ocorrência concomitante de ZIKV, DENV e CHIKV no Brasil tem aumentado as taxas de mortalidade por manifestações atípicas, principalmente aquelas relacionadas a síndromes neurológicas e outros comprometimentos para a saúde humana¹³⁻¹⁵.

A introdução de ZIKV e CHIKV em um cenário epidemiológico de endemicidade do DENV, associada às manifestações clínicas semelhantes, especialmente nos casos leves, e indisponibilidade de vacinas, apesar dos esforços para o desenvolvimento de imunizantes seguros e eficazes, implica em condições desafiadoras para o diagnóstico clínico diferencial e

correta notificação dos casos suspeitos. Neste sentido, a notificação efetiva e uso correto do Sistema de Informação em Saúde, aliado a técnicas de diagnóstico sensíveis e específicas são essenciais para o controle epidemiológico e uma resposta laboratorial precisa e oportuna para o manejo adequado dos pacientes, representando fator impactante para a saúde pública de países em desenvolvimento¹⁶⁻¹⁹.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Histórico e Epidemiologia dos Arbovírus Dengue, Zika e Chikungunya

Historicamente, há registro da ocorrência de epidemia semelhante a dengue ainda entre 265-400 d.C., embora grandes epidemias notificadas no passado tenham ocorrido entre os anos 1779 e 1780, nos continentes Asiático, Africano e nas Américas. No entanto, acredita-se que o vírus tenha se espalhado às regiões tropicais e subtropicais do planeta entre os séculos XIX e XX, atingindo proporções de pandemia em razão dos conflitos da Segunda Guerra mundial. A partir de então, inúmeros relatos de doença clinicamente semelhante à dengue foram registrados, porém sem confirmação por isolamento e identificação do agente etiológico²⁰⁻²².

Descrito inicialmente em 1906 por Bancroft, o isolamento dos dois primeiros sorotipos do DENV, DENV-1 e DENV-2, ocorreu somente nos anos de 1943-44 em virtude de epidemia da doença no Pacífico Sul. Em seguida, na década de 1950, os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram caracterizados por Hammon e Sather²³.

De raras ocorrências nas Américas nas décadas seguintes à Segunda Guerra Mundial, o vírus passou a ser responsável por grandes epidemias na região, especialmente Américas Central e Sul, incluindo o Brasil, em razão da proliferação do principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti* e a introdução de novas cepas e sorotipos virais, principalmente nos anos 1980²⁰. Dessa forma, endêmico em menos de 10 países até a década de 1970, atualmente é considerado o vírus responsável por causar a arbovirose mais prevalente e disseminada no mundo, detectado especialmente em países tropicais e subtropicais e há décadas responsável por provocar surtos e epidemias^{24,25}. Estima-se que anualmente o DENV seja responsável por infectar aproximadamente 390 milhões de pessoas, demonstrando um aumento drástico dessa arbovirose nas duas últimas décadas, cuja incidência foi de aproximadamente 33 milhões de casos no ano de 2005²⁶.

Primeiramente descrito em 1779, o CHIKV ganhou importância em 1952 em razão de um surto de doença febril ocorrido na Tanzânia, com surtos subsequentes registrados no Sudeste Asiático e o subcontinente indiano²⁷. Após um período sem registro de novos surtos, o CHIKV foi mencionado como responsável por uma nova epidemia em 2005 na Índia com proporções maiores que as observadas anteriormente. Nesse mesmo ano, nas ilhas francesas *La Reunion*, mutações relacionadas à proteína do envelope viral (E1) do CHIKV possibilitaram ao vírus maior capacidade de transmissão pelo mosquito *A. albopictus*²⁸. Dessa forma, nos últimos

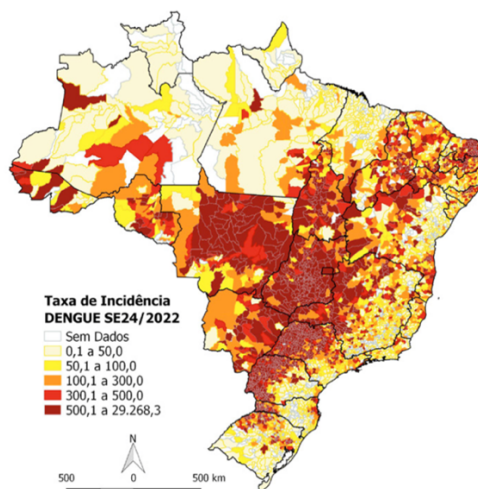
anos tem-se observado aumento significativo no número de casos dessa arbovirose, com graves consequências para a saúde pública mundial²⁹.

Outro arbovírus que ganhou destaque no cenário mundial por causar agravo à saúde humana foi o ZIKV. Apesar de inicialmente descrito em 1947 após isolamento da partícula viral em macacos *Rhesus* na Floresta Zika, Uganda, o primeiro relato da identificação em soro humano ocorreu somente no ano de 1952^{30,31}. A partir do ano de 2007, após surto epidêmico na ilha de Yap, na Micronésia, a infecção pelo ZIKV passou a ser considerada uma arbovirose emergente³².

2.1.1. Vírus Dengue no Brasil

Apesar de descrito e identificado somente no século XX, o primeiro relato da ocorrência de febre do Dengue no Brasil remete-se ao ano de 1685 à cidade de Recife e à epidemia em Salvador em 1692. Posteriormente, a partir do século XIX, epidemias foram descritas na região Sudeste do país, nas cidades de Rio de Janeiro e São Paulo²². Após um período sem relatos da ocorrência dessa arbovirose em território nacional e a provável erradicação da doença no país, o vírus foi reintroduzido e voltou a provocar epidemias a partir de Roraima, atingindo as regiões Sudeste e Nordeste e se disseminando por todo o país, conforme observado na **Figura 1**. Atualmente, os 4 sorotipos de DENV são endêmicos no Brasil, sendo responsáveis por surtos epidêmicos sazonais com elevado número de notificações e ocorrência a cada 3 ou 5 anos^{22,33,34}.

Figura 1. Distribuição da taxa de incidência de febre do Dengue por município até a semana epidemiológica 24, Brasil, 2022.



Fonte: SVS/MS - Boletim Epidemiológico Vol.53 nº 24.

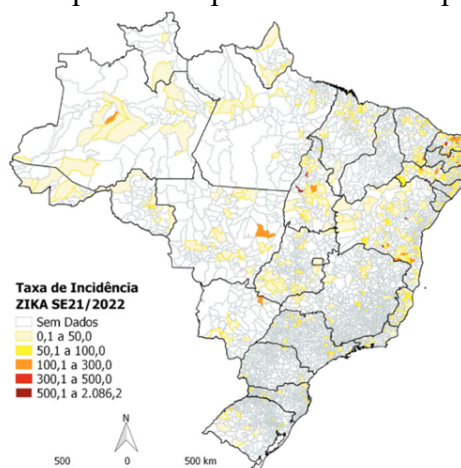
Os casos prováveis de dengue são notificados em níveis elevados anualmente de forma contínua. De acordo com o Boletim Epidemiológico 53, os dados registrados até a semana epidemiológica 24/2022, foram notificados 1.172.882 casos prováveis de dengue, cuja taxa de incidência foi de 549,8 casos para cada 100 mil habitantes, sendo 960 casos de Dengue Grave (DG), 12.158 casos de Dengue com Sinais de Alarme (DSA) e 585 óbitos provocados pela doença. A região Centro-Oeste foi considerada a recordista nacional no número de notificações, com taxa de incidência de 1.629,9 casos/100 mil habitantes. Neste mesmo período, foram notificados 30.505 casos e uma taxa de incidência de 855,1 casos para cada 100 mil habitantes no Mato Grosso³⁴.

2.1.2. Vírus Zika no Brasil

No Brasil, um dos primeiros relatos de infecção por ZIKV ocorreu em março de 2015 no estado da Bahia, quando o vírus foi detectado em pacientes com síndrome semelhante a dengue através de ensaio de biologia molecular em amostra de sangue³¹. A circulação e transmissão autóctones do ZIKV foram confirmadas no país nos meses de abril e maio do mesmo ano³⁵. Estima-se que ocorreram entre 440.000 e 1.300.000 casos de febre do zika somente no ano de 2015³⁶.

No cenário atual, até a Semana Epidemiológica 21/2022 (**Figura 2**), foram notificados 5.699 casos prováveis da doença no país, com taxa de incidência de 2,7 casos para cada 100 mil habitantes, cujos dados representam aumento de cerca de 118,9% em relação ao mesmo período do ano anterior. Nesta situação epidemiológica, Mato Grosso apresenta incidência de 2,2 casos para cada 100 mil habitantes³⁴.

Figura 2. Incidência de febre zika por município até a semana epidemiológica 21, Brasil, 2022.



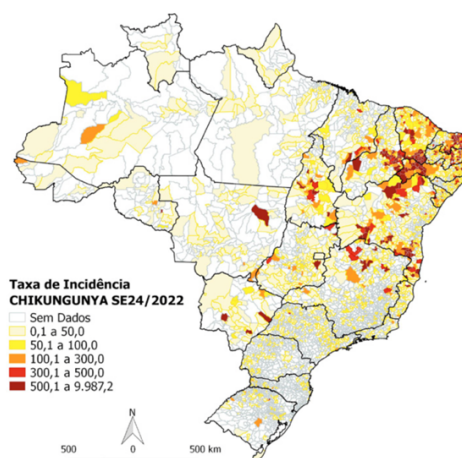
Fonte: SVS/MS - Boletim Epidemiológico Vol.53 nº 24.

2.1.3. Vírus Chikungunya no Brasil

No Brasil, os primeiros casos suspeitos de febre do Chikungunya foram notificados no ano de 2014 nos estados do Amapá e Bahia, regiões norte e nordeste do país, respectivamente. A partir de 2015, o vírus continuou se espalhando para outros estados brasileiros, abrangendo todo o território nacional no ano de 2016, chegando a mais de 250 mil casos notificados³⁷⁻³⁹.

Dados sobre a ocorrência de febre chikungunya mostram que até a semana epidemiológica 24/2022 (**Figura 3**), foram notificados 122.075 casos prováveis da doença no país, com taxa de incidência de 57,2 casos para cada 100 mil habitantes, representando um aumento de 93,7% em relação ao mesmo período do ano anterior e com 23 óbitos confirmados. Neste cenário epidemiológico, a região Centro-Oeste figura-se com o segundo maior número de casos prováveis, com 4.818 notificações e taxa de incidência de 28,8 casos para cada 100 mil habitantes³⁴.

Figura 3. Distribuição da taxa de incidência de febre chikungunya por município até a semana epidemiológica 24, Brasil, 2022.



Fonte: SVS/MS - Boletim Epidemiológico Vol.53 nº 24.

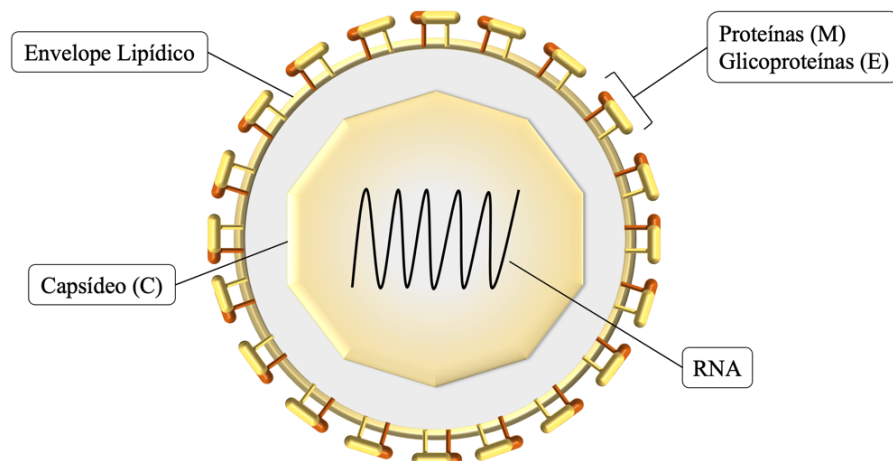
2.2. Classificação Morfologia e Genoma dos Arbovírus Dengue, Zika e Chikungunya

2.2.1. Vírus Dengue e Zika

Os arbovírus DENV e ZIKV, pertencem à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, que compreendem representantes que apresentam genoma constituído por RNA de fita simples⁴⁰.

A partícula viral dos flavivírus é constituída por capsídeo proteico (C) em formato icosaédrico envolto por envelope lipídico e proteínas de membrana (M) e glicoproteínas (E). A estrutura possui cerca de 40 e 60 nm de diâmetro (**Figura 4**)⁴¹.

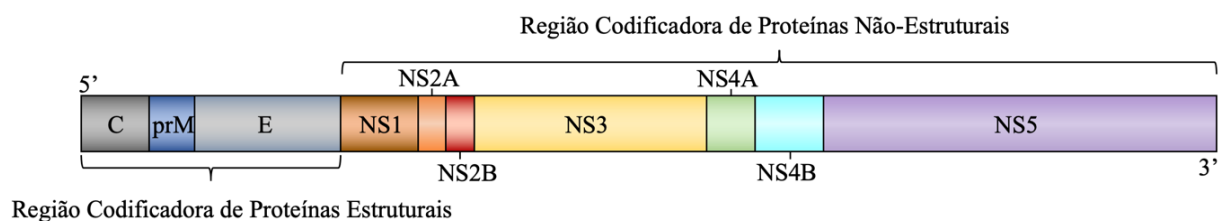
Figura 4. Organização estrutural dos vírus da família *Flaviviridae*.



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

O genoma dos flavivírus é composto por 2 regiões distintas, sendo uma região codificadora de 3 Proteínas Estruturais (C, prM e E) e outra região codificadora de 7 Proteínas não Estruturais (NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B, NS5), conforme observado na **Figura 5**⁴¹.

Figura 5. Organização genômica dos vírus da família *Flaviviridae*.



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

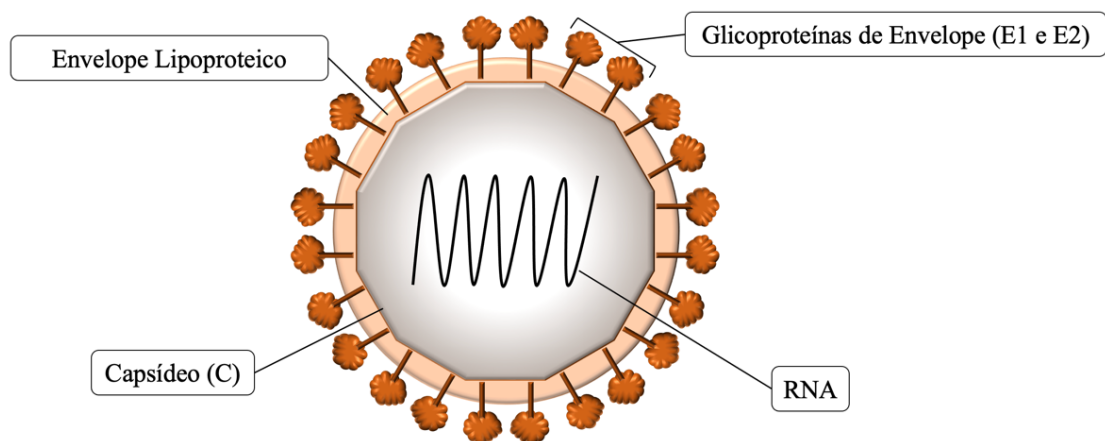
Neste gênero, o DENV apresenta quatro sorotipos geneticamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4) com cerca de 60 a 80% de semelhança entre si⁴².

2.2.2. Vírus Chikungunya

O arbovírus CHIKV pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. Assim como os Flavivírus, este gênero é composto por representantes que apresentam genoma constituído por RNA de fita simples⁴³.

A partícula viral dos *Alphavirus* é constituída por capsídeo proteico (C) em formato icosaédrico envolto por envelope lipídico e as glicoproteínas de membrana E1 e E2. A estrutura possui cerca de 60 e 70 nm de diâmetro (**Figura 6**)⁴⁴.

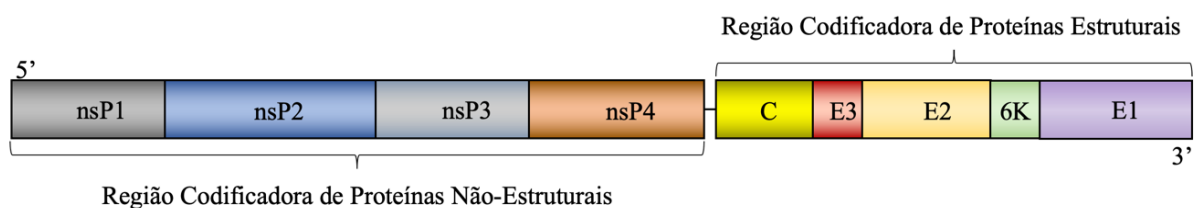
Figura 6. Organização estrutural dos vírus da família *Togaviridae*.



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

O genoma dos *Alphavirus* é composto por 2 regiões distintas, uma região codificadora de 5 Proteínas Estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) e outra região codificadora de 4 Proteínas não Estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), conforme observado na **Figura 7**⁴⁴.

Figura 7. Organização genômica dos vírus da família *Togaviridae*.



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

2.3. Vetor e Transmissão

As epidemias de arboviroses nos centros urbanos ocorrem principalmente através da propagação do vírus durante o repasto sanguíneo de mosquitos culicídeos, dos gêneros *Culex* e *Aedes*. Fatores relacionados à uma urbanização precária em países emergentes e a globalização favorecem a rápida disseminação desses vírus entre populações distintas ao redor do mundo, inclusive à países desenvolvidos, contribuindo para a morbimortalidade mundial e caracterizando-as como emergências internacionais de saúde pública, especialmente pela capacidade de amplificação direta em seres humanos sem a necessidade do ciclo enzoótico^{2,45,46}.

Os principais vetores de arboviroses possuem predileção por regiões tropicais e subtropicais do planeta. Nesse contexto, o perfil sociodemográfico, características ambientais e climáticas, fazem de grande parte do território nacional um ambiente que abriga qualidades ideais para a proliferação dos vetores e consequentemente, dos arbovírus, culminando com a ocorrência de uma variedade dessas zoonoses⁴⁷.

2.4. Manifestações clínicas das Arboviroses dengue, zika e chikungunya

Com período de incubação de 2 a 7 dias, a infecção pelo DENV, quando sintomática, causa uma doença sistêmica e dinâmica de amplo espectro clínico, variando desde formas oligossintomáticas até quadros graves, podendo levar o paciente ao óbito. A severidade da doença pode variar levando em consideração diversos fatores, como coinfeções, idade, carga viral, além da reinfeção pelo DENV². Apesar de apresentar taxa de incidência relativamente baixa, as formas graves de dengue podem ser fatais em até 24% dos casos^{24,25}.

Em razão das diferenças genotípicas e fenotípicas entre os 4 sorotipos de DENV, o indivíduo adquire imunidade vitalícia ao sorotipo que o infectou, entretanto permanece susceptível aos demais. Ainda assim, alguns estudos afirmam que há um indicativo de uma possível proteção imunológica cruzada entre os diferentes sorotipos por curto período. Outro fator importante em relação a variação antigênica é a ausência de tratamentos com fármacos antivirais eficazes, assim como a dificuldade em produzir vacinas capazes de garantir imunidade simultânea aos sorotipos existentes, destacando a baixa efetividade dos imunobiológicos disponíveis e a dificuldade em implementar programas de imunização capazes de evitar os recorrentes surtos e epidemias da doença²⁴⁻²⁶.

Em relação ao ZIKV, apesar de causar uma infecção oligo ou assintomática na maioria dos casos, o paciente sintomático acometido apresenta quadro clínico clássico semelhante a outras arboviroses, com febre, poliartralgia, mialgia, erupção maculopapular e cefaleia⁴⁸. A gravidade e a relevância da infecção por este arbovírus se deve ao seu tropismo por células neurais de fetos, logo a infecção em gestantes pode resultar em uma síndrome denominada Síndrome Congênita do Zika (SCZ), caracterizada por inúmeras anormalidades congênitas, como microcefalia, artrogripose, restrição do crescimento intrauterino e alterações otológicas e oftalmológicas que afetam o desenvolvimento neuropsicomotor dos bebês acometidos^{4,45,49}.

Além de evidências epidemiológicas de SCZ, a identificação do genoma do ZIKV por ensaios moleculares em amostras coletadas durante a gestação e após o parto de pacientes com microcefalia, e os padrões encontrados em exames de imagem reforçaram essa associação^{50,51}. Além da síndrome congênita, alterações neurológicas em pacientes adultos, descrita com a síndrome de Guillain-Barré, tem sido associada a infecção por ZIKV⁵². A magnitude do surto e da gravidade associados à transmissão congênita levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar em fevereiro de 2016 a infecção por ZIKV como uma emergência de saúde pública de importância internacional⁵².

Nos casos de febre do Chikungunya, cerca de 75 a 95% dos pacientes são sintomáticos, caracterizando-se por febre de início súbito seguido por dores articulares que variam de moderada a severa, podendo deixar o paciente debilitado por anos^{37,45}. Além disso, um quadro preocupante de mortes devido a infecção por CHIKV tem deixado em alerta as autoridades em saúde do país^{37,39}.

2.5. Diagnóstico Laboratorial

Negligenciadas pelo poder público nos últimos 3 anos de pandemia, estando em segundo plano nas políticas públicas de atenção a saúde, os últimos dados epidemiológicos do país e da região centro-oeste reforçam a permanência, abrangência e o impacto das arboviroses, resultando no aumento exponencial no número de notificações de casos prováveis e óbitos em virtude da infecção por DENV, ZIKV e CHIKV⁵³.

Considerando as características da infecção, uma vez que diferentes vírus ativamente circulantes e endêmicos são responsáveis por sintomas clínicos semelhantes, testes diagnósticos laboratoriais conclusivos são essenciais para diferenciação e conduta adequada ao paciente acometido⁴⁵.

O diagnóstico laboratorial das arboviroses pode ser realizado por imunoenaios para identificação de antígenos ou anticorpos, isolamento viral e técnicas moleculares a partir da amplificação do ácido nucleico viral. Os ensaios sorológicos são técnicas de detecção indireta baseadas na resposta imune do paciente. No entanto, a possibilidade de ocorrência de reação cruzada em razão de semelhanças entre os vírus de mesma família pode dificultar o diagnóstico diferencial⁵⁴.

Apesar disso, a avaliação por métodos sorológicos corresponde à maioria dos exames solicitados no Brasil, com taxas recentes de 83,2% para dengue, 78,6% para chikungunya e 62,4% para o diagnóstico de febre do zika. Além disso, estes dados representam apenas 61,3% dos casos notificados⁵³.

2.5.1. Diagnóstico Sorológico

Os ensaios sorológicos consistem principalmente na detecção de anticorpos produzidos pela resposta imunológica do paciente contra um determinado agente infeccioso. A detecção de imunoglobulinas das classes IgM e IgG permite verificar exposição recente ou tardia ao antígeno⁵⁴.

Na rotina diagnóstica de casos suspeitos de arboviroses no Brasil geralmente são empregados protocolos imunoenzimáticos do tipo ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), apesar do amplo conhecimento da possibilidade de reação cruzada pelas características semelhantes entre os arbovírus, especialmente em regiões que apresentam circulação endêmica de mais de um desses agentes infecciosos⁵³.

Ademais, especificamente para o diagnóstico de casos suspeito de febre do Dengue, em geral são utilizados métodos imunocromatográficos de fluxo lateral para detecção de antígeno NS1, que representa um importante marcador da fase clínica inicial da doença. O diagnóstico realizado através desta metodologia possibilita reduzir a ocorrência de reação cruzada com outros arbovírus^{53,54}.

2.5.2. Isolamento Viral

O isolamento viral possibilita a detecção e identificação precisa do agente viral. Além disso, o isolamento permite a obtenção e manutenção dos agentes infecciosos para estudos posteriores^{10,54}.

Os protocolos de isolamento consistem na amplificação da quantidade de partículas virais. Para a técnica, geralmente são empregados protocolos de propagação *in vitro* através de cultura celular¹⁰. Apesar de menos utilizados, outros protocolos de isolamento propõem a propagação das partículas virais em camundongos ou ovos embrionados⁵⁴.

Considerado o método padrão-ouro e referência, os protocolos de isolamento viral exigem estrutura complexa, além de maior tempo para a obtenção do resultado, sendo este o principal obstáculo para a uso dessa ferramenta na obtenção de resposta oportuna necessária em conjunto à avaliação clínica do paciente⁵⁴.

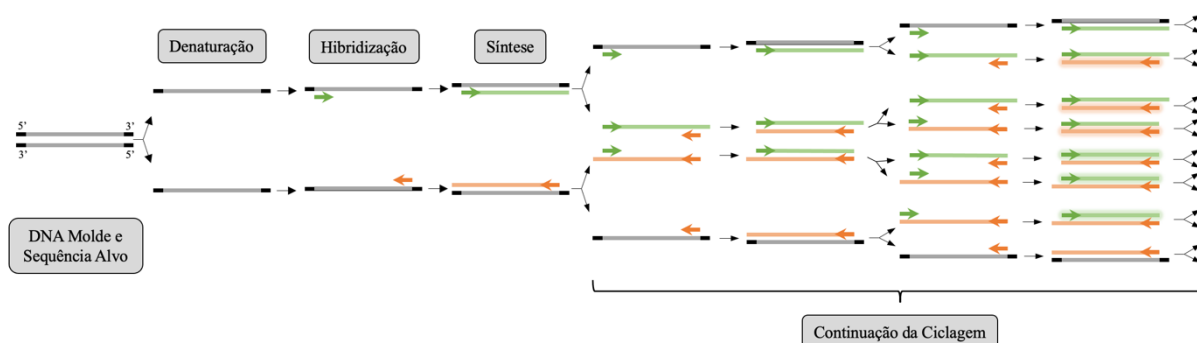
2.5.3. Diagnóstico Molecular

As técnicas moleculares têm ganhado destaque no diagnóstico de doenças provocadas por microrganismos patogênicos e inúmeros estudos propõem o aprimoramento e otimização deste método. Assim como o isolamento viral, os ensaios moleculares permitem o diagnóstico na fase aguda da doença, quando os anticorpos ainda se encontram em títulos indetectáveis pelos métodos sorológicos, possibilitando diagnóstico oportuno^{40,55-58}.

Os protocolos, baseados na amplificação exponencial de ácidos nucleicos, como a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), são ensaios altamente sensíveis e específicos para a detecção de RNA viral e o diagnóstico preciso dessas doenças⁴⁵. A partir de uma sequência nucleotídica conhecida utilizada como molde e a adição de iniciadores seletivos capazes de hibridizar especificamente a uma posição do genoma definido pelo pesquisador como sequência alvo da avaliação, os protocolos de PCR permitem sintetizar milhares de cópias em curto período, possibilitando detectar traços e amplificar grandes quantidades de ácido nucleico na amostra analisada⁵⁹.

A PCR é um processo cíclico realizado *in vitro* com variações de temperatura e tempo que mimetizam a síntese de ácidos nucleicos celulares (**Figura 8**). O procedimento ocorre inicialmente com a denaturação da fita dupla do DNA molde, promovendo a separação em duas fitas simples. Em seguida, etapas com denaturação, hibridização e síntese são realizadas em ciclos que variam em duração e temperatura conforme o protocolo padronizado. Em cada ciclo, após o processo de denaturação, as sequências sintéticas de nucleotídeos utilizadas, conhecidas como iniciadores (*Forward* e *Reverse*), hibridizam às duas extremidades (5' e 3') da região alvo no ácido nucleico analisado, possibilitando desta forma, a replicação (síntese) exponencial da região de interesse no DNA molde pela ação da enzima DNA Polimerase⁵⁹.

Figura 8. Representação esquemática da Reação em Cadeia da Polimerase.



Fonte: Adaptado de Alberts *et al.* Biologia Molecular da Célula. 6 ed. Artmed.

Em virtude de serem vírus que possuem RNA como material genético, os ensaios moleculares para a detecção de ácido nucleico dos arbovírus consistem na realização de protocolos em etapas distintas, com a necessidade de um processo inicial de síntese de DNA complementar (cDNA) por Transcrição Reversa (*Reverse Transcription - RT*), em virtude da instabilidade molecular do RNA viral e da especificidade de ação da enzima utilizada por alvo em molécula de DNA, seguidos de protocolos para identificação de gênero ou espécie⁶⁰.

A PCR convencional, além da detecção pela amplificação do alvo, possibilita a elucidação de variações no genoma dos patógenos através de processos de sequenciamento e análise filogenética dos produtos purificados⁶¹.

Ainda, protocolos de RT-PCR têm sido melhorados com a realização de ensaios *Nested* secundários, a partir do produto oriundo da PCR inicial, no qual são utilizados iniciadores específicos capazes de hibridizar internamente à região alvo estabelecida pela PCR primária. Neste sentido, os protocolos de Nested-PCR geram fragmentos menores e aumentam a especificidade dos ensaios⁶⁰. Em ambos os protocolos convencionais, a presença do ácido nucleico viral amplificado é detectada a partir da realização de eletroforese dos produtos das reações⁶⁰.

Além do mais, os ensaios de PCR possibilitam a identificação de diferentes patógenos em uma única reação através da realização de protocolos multiplex, para os quais são utilizados iniciadores distintos para cada espécime pesquisado, seja pela obtenção de fragmentos de amplificação com tamanhos diferentes, no caso da PCR convencional, ou mesmo pela diferenciação da fluorescência emitida pelo alvo analisado em protocolos de qPCR^{55,60}.

A qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) permite não apenas a detecção em tempo real do alvo, descartando a necessidade de eletroforese do produto amplificado, como também possibilita a determinação do número de cópias virais. Técnicas baseadas em sondas

de hidrólise ou intercalantes moleculares tem se apresentado como opção diagnóstica rápida e de qualidade, destacando-se como ferramenta essencial durante a pandemia de COVID-19⁶².

2.6. Prevenção e Controle

Apesar da possibilidade de disseminação direta entre humanos através da transmissão por via sexual, em razão da observação da presença de partículas virais de ZIKV no sêmen de pacientes infectados⁶³, a principal forma de transmissão das arboviroses ocorre acidentalmente durante o repasto sanguíneo pela picada de hospedeiros artrópodes, especialmente os mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* e *Aedes (Stegomyia) albopictus*². A habilidade desses vírus em sofrer amplificação e manutenção dos ciclos em humanos e rápida disseminação é suficiente para a ocorrência de surtos epidêmicos e sustentação de regiões endêmicas, afetando milhares de pessoas².

Apesar da implementação de eficiente controle vetorial no passado, com a extinção dos mosquitos do gênero *Aedes sp.* nas Américas, o programa de erradicação do vetor não foi suficiente para evitar sua reinfestação e ressurgimento do DENV. Da mesma forma, nos últimos anos os protocolos de controle do vetor adotados no Brasil não têm alcançado êxito e o número de notificações de casos prováveis de arboviroses continuam elevados, especialmente após a emergência do ZIKV e CHIKV²².

Na busca pela prevenção das síndromes febris agudas causadas pelos arbovírus, a comunidade científica não tem medido esforços para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, apesar das inúmeras pesquisas em curso para a produção de vacinas contra as febres zika e Chikungunya, estes imunizantes ainda não estão disponíveis. Em relação à vacina contra o DENV, apesar dos produtos oportunistas, no Brasil é autorizada a administração apenas à parcela da população que teve exposição prévia ao vírus^{17,18,64}.

Neste sentido, a compreensão dos mecanismos de adaptação dos arbovírus e seus vetores pode ser ferramenta biológica importante para o entendimento da ocorrência dos surtos e epidemias e da possibilidade de emergência de novas arboviroses em humanos, especialmente em regiões endêmicas. Aliado a isso, a implantação e manutenção de programas de vigilância epidemiológica, a partir da implementação de protocolos de controle vetorial eficientes, continua sendo o principal meio de prevenção de surtos dessas síndromes febris agudas^{11,65}.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da RT-PCR para a detecção de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV e descrever as características epidemiológicas de pacientes com síndrome febril aguda notificados na região Sudeste de MT, durante a primeira epidemia de ZIKV no Brasil.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia do diagnóstico molecular por RT-PCR para a detecção de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV em pacientes com síndrome febril aguda notificados na região sudeste de Mato Grosso, durante a primeira epidemia de ZIKV no Brasil, utilizando a RT-qPCR como teste de referência.
- Descrever as características epidemiológicas e laboratoriais de pacientes com síndrome febril aguda e suspeita clínica das arboviroses zika, dengue e chikungunya, notificados na região sudeste de Mato Grosso, durante a primeira epidemia de ZIKV no Brasil.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, experimental e descritivo de casos suspeitos notificados das arboviroses dengue, zika e febre chikungunya no município de Rondonópolis de agosto de 2015 a agosto de 2016, período de introdução e disseminação dos arbovírus ZIKV e CHIKV no Brasil.

4.2. Local do Estudo

O município de Rondonópolis está localizado na região Sudeste do estado de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil (**Figura 9**). Com uma área de aproximadamente 4.824.020 Km² e população estimada em cerca de 239 mil habitantes distribuídos em 230 bairros, o município é referência para outras 18 cidades que englobam a Região Sudeste de Saúde do Estado⁶⁶. Trata-se de uma região endêmica para DENV e com circulação concomitante de ZIKV e CHIKV. Este estudo representa uma pesquisa inédita sobre o assunto para a região.

Figura 9. Localização geográfica da área de estudo.



Mapa do Brasil, estado de Mato Grosso (MT) e município de Rondonópolis (preto).
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Amostragem

Trata-se de uma amostra por conveniência de pacientes com síndrome febril aguda e suspeita de infecção pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, atendidos pelas Unidades Básicas de Saúde dos 19 municípios de abrangência do LACEN MT-Rondonópolis, conforme divisão dos Escritórios Regionais de Saúde de Mato Grosso⁶⁷.

Para as análises moleculares e sorológicas, as amostras clínicas foram provenientes de biorepositório do Laboratório Central de Rondonópolis (LACEN MT-Rondonópolis), laboratório público da Secretaria Estadual de Saúde de Mato Grosso e coletadas na rotina de assistência dos casos notificados no período de agosto de 2015 a agosto de 2016 de pacientes com até cinco dias do início dos sintomas.

A coleta sanguínea foi realizada por punção venosa pela equipe de profissionais do LACEN MT-Rondonópolis em tubos sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas para a separação e obtenção do soro, cujas alíquotas foram acondicionadas em criotubos e armazenadas sob congelamento.

As alíquotas de soro foram cedidas ao Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Núcleo de Pesquisas em Produção e Conservação do Cerrado – NUPEC da Universidade Federal de Rondonópolis-UFR, onde foram mantidas acondicionadas em ultrafreezer à -80°C até a execução dos experimentos.

O perfil clínico-epidemiológico e sociodemográfico dos participantes da pesquisa foi realizado através dos dados contidos nas Ficha de Notificação do Sistema Nacional de Agravos de Notificação – SINAN.

4.3.1. Critérios de Elegibilidade Amostral

Um total de 197 pacientes com síndrome febril aguda e suspeita de infecção pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, residentes nos municípios de abrangência da região sudeste de saúde de Mato Grosso foram incluídos no estudo. Destes, as amostras clínicas de 179 pacientes foram selecionadas para as análises laboratoriais, considerando o período de abrangência do estudo (agosto de 2015 a agosto de 2016) e a coleta sanguínea dentro do período de viremia (até o 5º dia após o início dos sintomas).

Participantes cuja amostra biológica foi coletada fora do período determinado para o estudo, em quantidade insuficiente para a realização de todas as análises laboratoriais

propostas e armazenadas em discordância dos padrões exigidos para os ensaios moleculares, foram excluídos da avaliação diagnóstica.

4.4. Análise Descritiva das Informações Demográficas e Clínicas

A avaliação descritiva do perfil clínico-epidemiológico e sociodemográfico dos 197 participantes incluídos no estudo foi realizada através dos dados obtidos das Fichas de Notificação do SINAN. Os dados foram tabulados e analisados no Microsoft Excel® (Washington, EUA).

A distribuição espacial dos casos notificados conforme bairro de residência foi realizada por meio do *software* de código aberto *Geographic Information System* (QGIS v3.18). Os bairros do município de Rondonópolis foram classificados por densidade de notificação conforme número de casos suspeitos registrados.

4.5. Ensaios Laboratoriais

Um total de 179 amostras clínicas incluídas no estudo foram submetidas a investigação pelos métodos moleculares de RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*) e RT-qPCR, para a detecção de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV e avaliação da sensibilidade, especificidade e precisão do diagnóstico molecular. Ensaios sorológicos para a detecção de anticorpos (IgM e IgG) anti-ZIKV também foram realizados.

4.5.1. Ensaios Moleculares

4.5.1.1. Extração de RNA

O RNA total das amostras foi extraído e purificado a partir de 150 µL de soro usando o método de membrana de sílica com o kit comercial *NucleoSpin® RNA Virus* (Macherrey-Nagel, GER) de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo fornece a purificação e concentração do RNA viral em 50µL de solução, a qual foi identificada e armazenada em ultrafreezer à -80°C até o momento da utilização para os ensaios moleculares. O controle interno do ensaio RT-qPCR e amostras positivas dos três arbovírus alvos do estudo foram incluídos nesta etapa das análises.

4.5.1.2. Transcrição Reserva (RT)

Inicialmente, uma reação de Transcrição Reversa (RT) foi realizada a partir do RNA viral extraído. Foram utilizados 10 µL da solução resultante da extração contendo o RNA molde, tampão de transcrição M-MuLV e 200 U de M-MuLV RT (New England BioLabs®), 8 U de inibidor de ribonuclease (RNasin® Ribonuclease Inibidor - Promega®), 0,5 mM de cada trifosfato de desoxinucleotídeo (dNTP), 0,6 µg de primer randômico (Invitrogen®) e água livre de ribonuclease para completar o volume final da reação de 20 µL. A mistura foi incubada a 25°C por 5 min, seguido de 42°C por 60 min para a obtenção do DNA complementar. A solução resultante foi armazenada a -20°C até o momento da utilização.

4.5.1.3. Multiplex-Nested-RT-PCR para Detecção de RNA de DENV

Para a detecção molecular de RNA de DENV, foi utilizado protocolo multiplex-nested-PCR⁶⁰, possibilitando a amplificação simultânea e identificação dos 4 sorotipos virais. Primeiramente, um protocolo de PCR simples foi realizado para a obtenção de fragmento de 958 pares de base (pb) correspondente ao gênero *Flavivirus*, utilizando um conjunto de iniciadores (**Tabela 1**) direcionado a região conservada do genoma viral codificadora da proteína NS5⁶⁸.

Tabela 1. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de gênero *Flavivirus* por RT-PCR.

Ensaio	Código do Primer	Região Alvo	Sequência (5' – 3')	Posição no Genoma	Tamanho do Fragmento (pb)
PCR para gênero <i>Flavivirus</i>	FG1 (+)	NS5	TCAAGGAAGTCCACACATGAGATGTACT	8270–8297	958
	FG2 (-)		GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	9228–9258	

(+): *Forward*; (-): *Reverse*; pb: pares de base.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Posteriormente, o produto resultante da amplificação de RNA pelo protocolo para detecção de gênero *Flavivirus* foi submetido a um protocolo de multiplex-nested-PCR⁶⁰, incluindo os iniciadores específicos (**Tabela 2**) para a detecção de RNA dos quatro sorotipos de DENV.

Tabela 2. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de DENV por nested-RT-PCR.

Ensaio	Código do <i>Primer</i>	Região Alvo	Sequência (5' – 3')	Posição no Genoma	Tamanho do Fragmento (pb)
Multiplex Nested-PCR para DENV	nDEN1 (-)	NS5	CGTTTGTCTTGTGTGCGC	8653–8673	472
	nDEN2 (-)		GAACCAGTTTGTGTTDRTTTCATAGCTGCC	8488–8516	316
	nDEN3 (-)		TTCCTCGTCCTCAACAGCAGCTCTCGCACT	8822–8851	659
	nDEN4 (-)		GCAATCGCTGAAGCCTTCTCCC	8394–8415	222

(+): *Forward*; (-): *Reverse*; **pb**: pares de base; **Sequência Referência no NCBI: nDEN1 (NC 001477.1); nDEN2 (NC 001474.2); nDEN3 (NC 001475.2); nDEN4 (NC 002640.1).

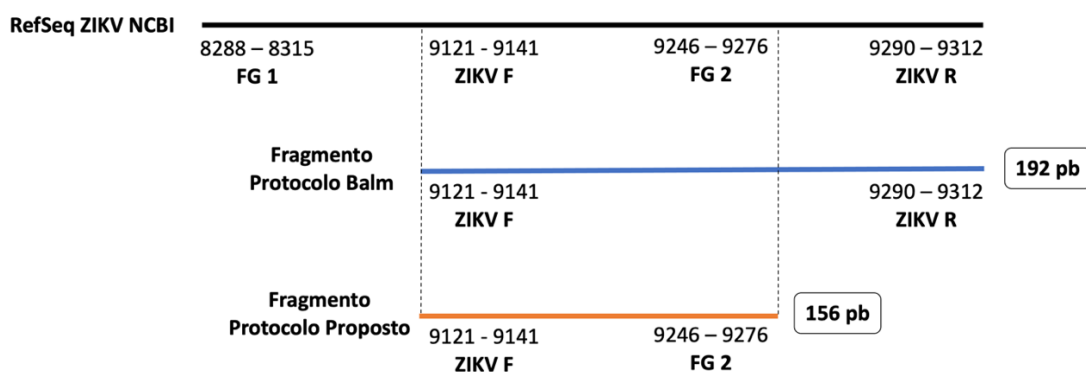
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1.4. Nested-RT-PCR para Detecção de RNA de ZIKV

A detecção do RNA do ZIKV foi realizada inicialmente por uma RT-PCR simples, conforme protocolo previamente descrito⁶⁹. O cDNA molde produto da Transcrição Reversa (6 µL) foi incubado a 94°C por 15 min como desnaturação inicial seguida por 45 ciclos de amplificação a 94°C por 15s, 57°C por 25s e a 72°C por 20s em uma mistura contendo tampão de DNA polimerase e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Uniscience®), 5 mM de cada dNTP, 0,5 µmol/L e 0,8 µmol/L de primer ZIKV direto e reverso, respectivamente (**Tabela 3**) e água livre de ribonuclease para completar o volume final da reação em 25 µL.

Posteriormente, após avaliação *in silico* (**Figura 10**) do alinhamento genético, utilizando a ferramenta *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*-MEGA versão XI, dos iniciadores descrito na literatura (**Tabela 3**) com a Sequência Referência (RefSeq) ZIKV (NC 012532.1) disponível no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi possível propor um protocolo nested-RT-PCR.

Figura 10. Avaliação *in silico* de protocolo nested-RT-PCR para detecção de ZIKV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, utilizando 1 μL do produto da RT-PCR simples, 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de ZIKVF9027⁶⁹ e 0,15 $\mu\text{mol/L}$ de FG2⁶⁸, como oligonucleotídeos conjunto de iniciadores direto e reverso, respectivamente (**Tabela 3**), o protocolo resulta em um *amplicon* de 156 pares de bases (pb) de tamanho. O ensaio dessa mistura foi realizado com as mesmas concentrações dos reagentes da PCR simples descrita acima e incubado a 94°C por 5min seguido por 25 ciclos de amplificação a 94°C por 1min, 53°C por 1min, 72°C por 2min e a 72°C C por 5min como etapa final de extensão. O conjunto de iniciadores utilizados em ambos os protocolos é direcionado a uma região conservada do RNA viral, codificadora da proteína não estrutural NS5.

Tabela 3. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de ZIKV por RT-PCR e nested-RT-PCR.

Ensaio	Código do Primer	Região Alvo	Sequência (5' - 3')	Posição no Genoma**	Tamanho do Fragmento (pb)
PCR para ZIKV	ZIKVF9027 (+)	NS5	CCTTGGATTCTTGAACGAGGA	9121–9141	192
	ZIKVR9197 (-)		AGAGCTTCATTCTCCAGATCAA	9290–9312	
Nested-PCR para ZIKV	ZIKVF9027 (+)	NS5	CCTTGGATTCTTGAACGAGGA	9121–9141	156
	FG2 (-)		GTGTCCCATCCTGCTGTGTCATCAGCATACA	9246–9276	

(+): *Forward*; (-): *Reverse*; **pb**: pares de base; **Sequência Referência no NCBI: ZIKV (NC 012532.1).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5.1.5. RT-PCR para Detecção de RNA de CHIKV

A detecção do RNA de CHIKV foi realizada por um protocolo de PCR simples utilizando iniciadores direcionados para a região do RNA viral codificadora da proteína não estrutural nsP1⁷⁰. A mistura continha tampão de PCR e 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Uniscience®), 5 mM de cada dNTP, 0,1 $\mu\text{mol/L}$ dos iniciadores direto e reverso para CHIKV (**Tabela 4**), 6 μL de molde de cDNA produto da Transcrição Reversa e água livre de ribonuclease para completar o volume final de reação em 25 μL . A solução foi incubada a 94°C por 3 min como etapa de desnaturação seguido por 35 ciclos a 94°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 30s, e a 72°C por 5 min.

Tabela 4. Sequência de Nucleotídeos dos iniciadores utilizados para a detecção de CHIKV por RT-PCR.

Ensaio	Código do Primer	Região Alvo	Sequência (5' - 3')	Posição no Genoma*	Tamanho do Fragmento (pb)
PCR para CHIKV	CHIK/nsP1-S (+)	nsP1	TAGAGCAGGAAATTGATCCC	228–247	354
	CHIK/nsP1-C (-)		CTTTAATCGCCTGGTGGTAT	562–582	

(+): *Forward*; (-): *Reverse*; **pb**: pares de base; * Sequência Referência NCBI: CHIKV (NC 004162.2).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Controles positivos de isolados gentilmente cedidos pela Dra. Renata Dezengrini Shlessarenko e negativos foram incluídos em todos os ensaios de RT-PCR e as reações foram realizadas utilizando o termociclador T100TM (BioRad, EUA).

4.5.1.6. Eletroforese dos Produtos da RT-PCR e da nested-RT-PCR

Os produtos de ambos os protocolos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose à 2% corada com brometo de etídio. O procedimento foi executado utilizando 5 µL da solução de produtos amplificados provenientes da RT-PCR e da nested-RT-PCR. A determinação da positividade da amostra foi realizada comparando o tamanho do fragmento com o *DNA Ladder* de 100 pb (Promega, EUA), sob luz ultravioleta.

4.5.1.7. Sequenciamento Nucleotídico e Análise das Sequências

Todas as amostras positivas nos protocolos de RT-PCR e nested-RT-PCR foram purificadas pelo método de purificação em coluna de sílica, utilizando o kit comercial NucleoSpin® Gel e PCR Clean-up (Macherrey-Nagel, GER) de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento de nucleotídeos foi executado pelo método de Sanger com os iniciadores direto e reverso de cada protocolo específico, utilizando o equipamento 3500 Genetic Analyzer® Applied BiosystemsTM (Life Technologies, EUA).

O alinhamento e avaliação dos cromatogramas obtidos no sequenciamento foram realizados utilizando o software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*-MEGA versão XI e as sequências de nucleotídeos foram avaliadas através do banco de dados da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool – BLAST* selecionando protocolo de busca por sequências altamente semelhantes.

4.5.1.8. RT-qPCR para Detecção de RNA de DENV, ZIKV e CHIKV

Para a detecção do RNA viral por RT-qPCR, as moléculas-alvo foram amplificadas por ensaio baseado em um protocolo de etapa única segundo método de sonda de hidrólise, utilizando o kit comercial ZDC Multiplex RT-PCR Assay® (BioRad, EUA). Conforme recomendações do fabricante, 5 µL de *template* foi adicionado à solução de reagentes e incubado a 50°C por 15 minutos para a Transcrição Reversa, seguido pela desnaturação inicial

à 94°C por 2 minutos e 45 ciclos de amplificação a 94°C por 15s, 55°C por 40s e a 68°C por 30s, utilizando o equipamento CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BioRad, EUA).

O protocolo utilizado permite realizar a detecção de RNA dos três arbovírus alvos deste estudo (ZIKV, DENV e CHIKV) em uma única reação, visando o gene ns4b para ZIKV, sequências 5'UTR para DENV e o gene nsP2 para CHIKV. As reações com valores de *Cycle Threshold* (Ct) inferiores a 40 foram consideradas como positivas.

4.5.2. Ensaio Sorológicos

A avaliação sorológica das amostras foi realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) para detecção dos anticorpos anti-ZIKV imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG), por reações semiquantitativa e quantitativa, respectivamente, com base na proteína não estrutural recombinante NS1, de acordo com as instruções do fabricante (Euroimmun AG, GER).

Para a detecção dos anticorpos IgM e IgG Anti-ZIKV, 5 µL de soro de cada participante do estudo, calibradores e controles fornecidos pelo kit foram diluídos na proporção de 1:101 em solução tampão fornecida. Em seguida, 100 µL de cada diluição foi distribuída em microplaca específica e incubada em estufa à 37°C por 60 minutos. Na sequência, os poços da microplaca foram lavados 3 vezes com 300 µL de solução de lavagem, considerando um intervalo de 30 a 60s entre cada uma das etapas do procedimento. Após, adicionou-se 100 µL de conjugado enzimático mantendo a microplaca em temperatura ambiente por 30 min. Novamente, procedeu-se o protocolo de lavagem e adicionou-se 100 µL do reagente cromogênico e incubou-se por 15 min à temperatura ambiente. Na sequência foram pipetados 100 µL de solução de parada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro para microplacas em comprimento de onda de 450nm.

A interpretação dos resultados para anticorpos IgM foi realizada pela razão entre as absorbâncias das amostras avaliadas e a absorbância do calibrador fornecido pelo kit. Para validação do teste, o ensaio deve resultar em densidade óptica (DO) > 0,140 para o calibrador, razão entre 1,2 – 3,2 para o controle positivo e DO de 0 – 0,7 para o controle negativo, sendo consideradas negativas amostras com razão < 0,8, limítrofes as amostras com razão ≥ 0,8 e ≤ 1,1, e positivas as amostras com razão ≥ 1,1.

O protocolo do ensaio para detecção de IgG anti-ZIKV utiliza 3 calibradores de concentrações conhecidas em unidades relativas por mililitro (RU/mL) de 2, 20 e 200 RU/mL,

fornecidos pelo kit. Para validação do teste, o ensaio considera DO de 0,037 como valor de referência para o calibrador com concentração de 2 RU/mL, DO > 0,140 para o calibrador com concentração de 20 RU/mL e DO > 0,700 para o calibrador com concentração de 200 RU/mL. O controle positivo deve apresentar concentração entre 69 – 129 RU/mL, enquanto o controle negativo deve apresentar concentração entre 0 – 15 RU/mL. Os resultados foram interpretados considerando o calibrador de concentração de 20 RU/mL como ponto de corte, conforme recomendações do fabricante.

4.6. Avaliação Estatística

Para avaliar o desempenho de ambas as metodologias moleculares, a análise estatística foi baseada no valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia, sensibilidade e especificidade dos testes, utilizando o software GraphPad Prism® (Califórnia, EUA). A técnica molecular de RT-qPCR foi definida como o ensaio de referência e o ensaio nested-RT-PCR o teste de índice. A significância estatística do ensaio foi medida usando o teste exato de Fisher bicaudal entre o número de amostras testadas positivas para DENV e ZIKV por nested-RT-PCR e RT-qPCR. O teste do coeficiente Kappa foi realizado para avaliar a concordância entre os ensaios realizados.

4.7. Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, Campus Universitário de Rondonópolis – CUR sob Parecer Número: 3.288.872, em 26 de abril de 2019 e dispensado de aprovação pelo CEP da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP (Parecer Número: 3.371.030) em 07 de junho de 2019.

4.8. Limitações do Estudo

É importante abordarmos algumas limitações deste estudo, sendo aquelas relacionadas à avaliação epidemiológica, especialmente à qualidade dos dados obtidos nas fichas do SINAN dos pacientes, com elevado número de informações incompletas. Quanto a avaliação da performance dos ensaios moleculares executados, diferentes etiologias infecciosas devem ser consideradas, uma vez que a inquérito foi projetado apenas para detecção molecular

de DENV, ZIKV e CHIKV e para a detecção sorológica de anticorpos anti-ZIKV. Além disso, a ausência de amostras positivas para CHIKV impossibilitou a avaliação dos ensaios direcionados à detecção deste agente etiológico. Ressalta-se ainda a possibilidade de degradação do RNA viral, considerando que as amostras foram coletadas entre os anos de 2015 e 2016, enquanto as análises moleculares foram processadas apenas nos anos de 2019 e 2020.

5. RESULTADOS

Para a avaliação do perfil clínico e epidemiológico, foram incluídos 197 pacientes participantes do estudo. De acordo com as fichas de notificação do SINAN de cada paciente, 124 (63%) eram do sexo feminino, das quais oito estavam grávidas, sendo quatro no primeiro trimestre e a outra metade no terceiro trimestre de gestação.

A média de idade dos participantes foi de 32 anos, sendo de dois meses de idade o paciente mais jovem, enquanto o mais velho tinha 70 anos. A faixa etária mais frequente observada foi de 19 a 59 anos (44,7%). Considerando a identidade étnica, 56 (28,4%) pacientes se autodeclararam brancos e três casos foram notificados como indígenas. A escolaridade foi omitida em 112 (56,9%) fichas de notificação avaliadas. Por outro lado, para 17 pacientes (8,6%), essa variável foi inaplicável de acordo com a idade. Em relação a região de residência dos participantes, 114 (57,9%) relataram residir em área urbana. Quatro pacientes residiam em área rural, sendo destes três em território indígena (**Tabela 5**). Apenas quatro notificações eram de pacientes residentes em outros municípios, ambos pertencentes à região sudeste de saúde. Portanto, 193 (98%) pacientes eram residentes no município de Rondonópolis.

Tabela 5. Características sociodemográficas dos casos suspeitos de arboviroses em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).

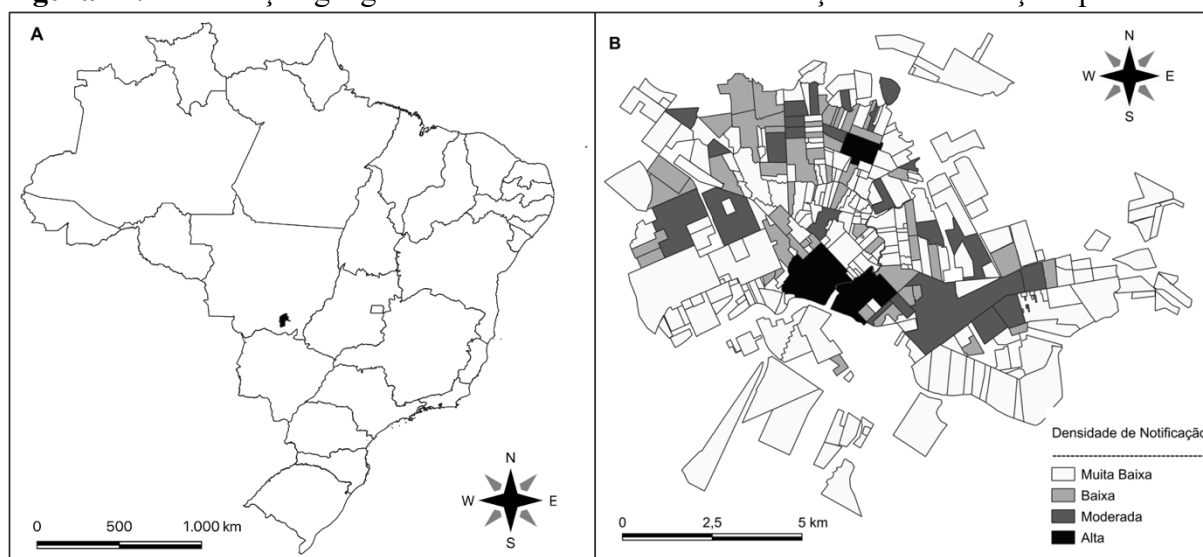
Variável		Frequência	
		n (197)	%
Gênero	Feminino	124	63.0
	Masculino	69	35.0
	Ignorado	4	2.0
Faixa Etária (Anos)	0–5	16	8.1
	5–19	14	7.1
	19–59	88	44.7
	59–70	10	5.1
	Ignorado	69	35.0
Etnia/Cor da Pele	Branca	56	28.4
	Preta	7	3.6
	Amarela	0	0
	Marrom	38	19.3
	Indígena	3	1.5
	Ignorado	93	47.2
Nível Educacional	Analfabeto	1	0.5
	EF Incompleto	19	9.7
	EF Completo	4	2.0
	EM Incompleto	6	3.0
	EM Completo	14	7.1
	ES Incompleto	5	2.5
	ES Completo	19	9.7
	Inaplicado	17	8.6
	Ignorado	112	56.9
Zona de Residência	Urbana	116	58.9
	Rural	4	2.0
	Periurbana	1	0.5
	Ignorado	76	38.6

EF, Ensino Fundamental; EM Ensino Médio; ES, Ensino Superior.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os participantes incluídos no estudo eram pacientes residentes em 79 (33%) bairros do município de Rondonópolis. A análise de geoprocessamento realizada mostrou maior densidade de casos notificados em três bairros urbanos da cidade, localizados nas regiões central e norte da cidade, conforme observado na **Figura 11**.

Figura 11. Localização geográfica da área de estudo e distribuição das notificações por bairro.



Mapas do Brasil, estado de Mato Grosso (MT) e município de Rondonópolis (preto) (A); Distribuição espacial dos casos notificados de ZIKV, DENV e CHIKV por densidade de notificação entre os bairros urbanos do município de Rondonópolis (B), durante a primeira epidemia brasileira de ZIKV (2015-2016).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto aos dados relativos aos sinais e sintomas clínicos apresentados pelos participantes, apenas 46 (23,3%) fichas de notificação continham alguma informação. Os distúrbios musculoesqueléticos como artralgia, edema articular e mialgia foram relatados por 45 (22,8%) pacientes que apresentaram pelo menos um desses sintomas, representando as principais queixas. Febre (13,7%), cefaleia (11,7%), prurido (10%) e sintomas relacionados a distúrbios hematológicos, como exantema e petéquias (12,6%), também foram registrados. Outros sintomas relatados foram manifestações oftalmológicas (6,1%) e gastrointestinais (5,6%), conforme **Tabela 6**.

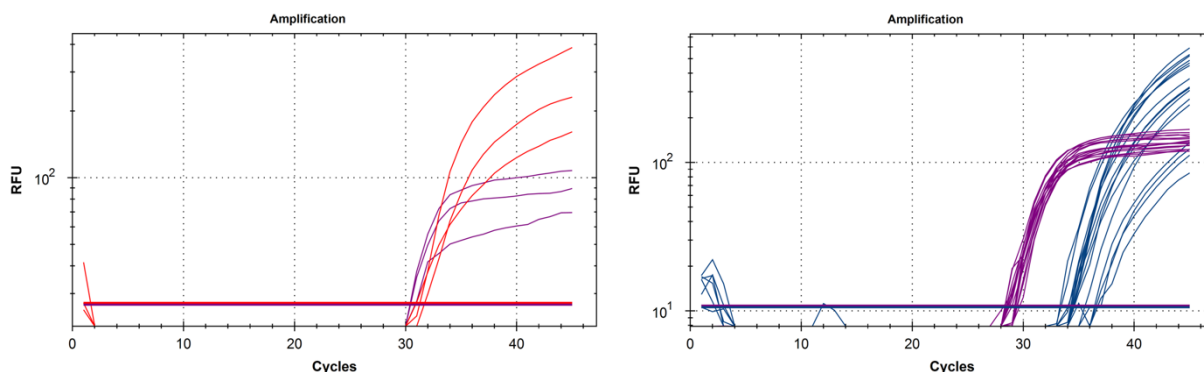
Tabela 6. Características clínicas de casos suspeitos de arbovirose em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).

Sinais e Sintomas Clínicos	Frequência	
	n (197)	%
Sistêmicos		
Febre	27	13.7
Cocceira	20	10.1
Cefaleia	23	11.7
Gastrointestinais		
Vômito		
Náuseas	11	5.6
Dor abdominal		
Diarreia		
Musculoesqueléticos		
Artralgia		
Dor articular	45	22.8
Mialgia		
Hematológicos		
Petéquias	25	12.6
Rash cutâneo		
Oftalmológicos		
Dor retro orbital	12	6.1
Hiperemia de conjuntiva		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quanto aos ensaios laboratoriais, foram avaliadas a especificidade e sensibilidade da nested-RT-PCR (teste de índice) em comparação com os ensaios de RT-qPCR (teste de referência). Conforme critérios de elegibilidade amostral, foram consideradas 179 amostras de soro de pacientes com sintomas de síndrome febril aguda e diagnóstico clínico associado aos vírus da dengue, zika ou chikungunya. As amostras foram coletadas pelo Laboratório Central do município de Rondonópolis durante o primeiro surto de ZIKV no Estado de Mato Grosso, que ocorreu entre os anos de 2015-2016.

Para os ensaios de RT-qPCR, 3/179 (1,67%) amostras foram positivas para DENV e 16/179 (8,94%) amostras positivas para ZIKV (**Figura 12**). Em relação aos ensaios nested-RT-PCR, o RNA de DENV foi detectado em 5/179 (2,79%) amostras, todas caracterizadas como sorotipo DENV-2, sendo o RNA de ZIKV detectado em 3/179 (1,67%) amostras. Não houve detecção de RNA de ZIKV através do protocolo de RT-PCR simples. Da mesma forma, não houve detecção de RNA de CHIKV nos ensaios das metodologias RT-PCR e RT-qPCR avaliadas.

Figura 12. Curvas de amplificação das amostras positivas para DENV e ZIKV por RT-qPCR.

Vermelho, amplificação de amostras positivas para DENV; **Azul**, amplificação de amostras positivas para ZIKV. **Lilás**, amplificação de Controle Interno da reação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A sensibilidade e especificidade do protocolo nested-RT-PCR para detecção de RNA de DENV foram 66,66% e 98,29%, respectivamente. Em relação à detecção do RNA do ZIKV pelo protocolo nested-RT-PCR proposto, foram observados 18,75% de sensibilidade e 100% de especificidade.

O ensaio nested-RT-PCR mostrou concordância moderada ($\kappa = 0,49$) para DENV e concordância razoável ($\kappa = 0,29$) para a detecção de ZIKV. Os protocolos nested-RT-PCR apresentaram valores preditivos positivos e negativos de 40,00% e 99,42% para DENV, e 100% e 92,61% para ZIKV. Todas as associações mostradas na **Tabela 7** foram significativas ($p\text{-Valor} < 0,05$, teste exato de Fisher), e a acurácia diagnóstica dos ensaios nested-RT-PCR para detecção de RNA de DENV e ZIKV foram de 97,76% e 92,74%, respectivamente.

Tabela 7. Desempenho do ensaio nested-RT-PCR para detecção de RNA de DENV e ZIKV em 179 amostras clínicas de soro.

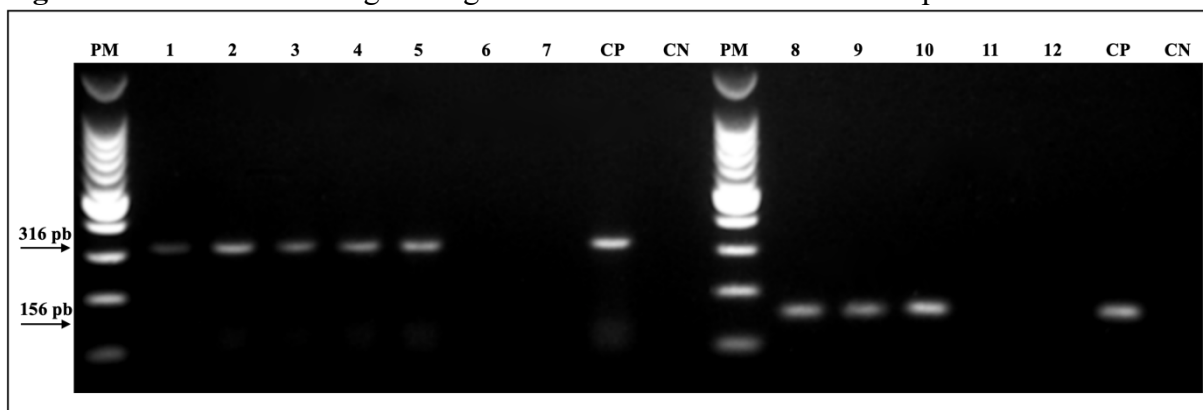
		ZDC Multiplex RT-PCR Assay® (Teste Referência)			Kappa	VPP %	VPN %	p-Valor
		P	N	Total				
DENV Nested-RT-PCR (Teste Índice)	P	2	3	5	0.49	40.00	99.42	0.0019
	N	1	173	174				
	Total	3	176	179				
ZIKV Nested-RT-PCR (Teste Índice)	P	3	0	3	0.29	100	92.61	0.0006
	N	13	163	176				
	Total	16	163	179				

P, Positivo; **N**, Negativo; **VPP**, Valor Preditivo Positivo; **VPN**, Valor Preditivo Negativo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todas as amostras positivas nos ensaios nested-RT-PCR tiveram diagnóstico confirmado por sequenciamento de nucleotídeos. A **Figura 13** mostra a amplificação de DENV e ZIKV por nested-RT-PCR.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose dos ensaios nested-RT-PCR para DENV e ZIKV.



Linhas 1 a 5, amostras positivas para DENV-2 (316 pb). Linhas 8 a 10, amostras positivas para ZIKV (156 pb). Linhas 6, 7, 11 e 12, amostras negativas. **PM**, Peso Molecular (DNA Ladder, 100 pb). **CN**, Controle Negativo. **CP**, Controle Positivo.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Resumidamente, conforme **Tabela 8**, os ensaios moleculares revelaram seis (3,3%) pacientes infectados pelo DENV. Além disso, 16 (8,9%) pacientes tiveram resultados positivos para ZIKV, e o RNA do CHIKV não foi detectado em nenhuma amostra clínica. Portanto, um total de 22 pacientes testaram positivo nos ensaios moleculares realizados pelo estudo, dos quais 21 (95,4%) eram mulheres. Em relação aos ensaios sorológicos para ZIKV, os anticorpos IgM foram detectados em 19 (10,6%) amostras, enquanto 100 (55,8%) amostras apresentaram índices de positividade para IgG.

Tabela 8. Resumo da investigação molecular e sorológica de amostras de soro de casos suspeitos de arboviroses em Rondonópolis, Brasil, durante a epidemia brasileira de ZIKV (2015–2016).

	Ensaio Molecular Positivo/n	Ensaio Sorológico (ZIKV) Positivo/n	
		IgM	IgG
DENV	6/179 (3.3%)	NDi	NDi
ZIKV	16/179 (8.9%)	19/179 (10.6%)	100/179 (55.8%)
CHIKV	ND	NDi	NDi

IgG: imunoglobulina G; **IgM:** imunoglobulina M; **NDi:** não disponível; **ND:** não detectado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6. DISCUSSÃO

A introdução dos arbovírus ZIKV e CHIKV nas Américas e sua disseminação mundial associada à alta prevalência do DENV representa um problema de saúde pública^{15,30}. O diagnóstico diferencial entre essas arboviroses tem sido um desafio para os clínicos e impactado a saúde pública no Brasil, principalmente pela semelhança de sinais e sintomas clínicos, resultando em diagnósticos equivocados⁷¹.

Neste estudo, foram avaliados os dados clínicos e epidemiológicos de uma coorte de 197 casos notificados suspeitos de infecção pelas arboviroses dengue, zika e chikungunya, dos quais, 179 tiveram suas amostras clínicas de soro avaliadas por ensaios laboratoriais sorológicos e moleculares. Ambos os participantes do estudo são residentes de municípios brasileiros localizados na região sudeste de MT, no Centro-Oeste do Brasil, endêmica para DENV e com ocorrência concomitante de ZIKV e CHIKV. Nesse sentido, este estudo representa uma pesquisa inédita sobre esse assunto para a região⁶¹.

Rondonópolis é o município referência para outras 18 cidades pertencentes à Região Sudeste de Saúde do estado de Mato Grosso. Durante o período de 2015–16, a cidade registrou 8.597 notificações de dengue, 535 de zika e 70 de febre chikungunya, apresentando elevada incidência de dengue e febre do zika no mesmo período^{66,72-74}.

Nos anos de 2015 e 2016, casos de febre do zika e chikungunya foram notificados em cerca da metade de todos os 5.568 municípios brasileiros, enquanto casos prováveis de dengue foram registrados em todos eles⁷⁵. Portanto, o Brasil e, consequentemente, o Estado de Mato Grosso registraram elevado número de notificações de casos suspeitos de DENV, ZIKV e CHIKV devido à introdução e expansão dos arbovírus emergentes recentemente associados à persistência e endemicidade do DENV. O aumento do número de notificações ocorreu principalmente durante as estações chuvosas, segundo registros do SINAN. Os presentes dados corroboram essa observação, onde cerca de 61% das amostras positivas nos ensaios moleculares avaliados foram oriundas de notificações que ocorreram entre dezembro de 2015 e abril de 2016, denotando baixo impacto na redução da ocorrência de casos por meio das campanhas educativas para controle de vetores implementadas pelas autoridades de saúde brasileiras⁶⁵.

Na introdução do ZIKV e o início do surto em 2015 no Brasil, diagnósticos laboratoriais precisos não estavam disponíveis para o estado de Mato Grosso, como na maior parte do país, sendo os primeiros casos positivos confirmados e divulgados apenas em fevereiro de 2016 pelo programa de vigilância epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso. No entanto, o ZIKV foi detectado em uma amostra clínica humana coletada em agosto

de 2015 no município de Tapurah, situado à região norte de MT, evidenciando a circulação desse arbovírus e sua transmissão por longo período antes da confirmação e divulgação pelas autoridades sanitárias locais⁶¹.

Os primeiros casos positivos em gestantes também foram confirmados em fevereiro de 2016 em residentes de Primavera do Leste, município pertencente à regional de saúde avaliada neste estudo⁷⁶. No entanto, outro estudo relata a notificação do primeiro caso suspeito de Síndrome Congênita do Zika nesta região do país, cuja ocorrência se deu em junho de 2015, o que confirmaria a circulação do ZIKV em MT em meados daquele ano⁴. Da mesma forma, o primeiro caso de febre chikungunya confirmado laboratorialmente por ensaios moleculares foi notificado apenas em março de 2016⁷⁴.

Nesse sentido, o seguimento dos protocolos e preenchimento adequado das fichas de notificação disponibilizados pelas autoridades sanitárias brasileiras é essencial para a implementação dos programas de vigilância epidemiológica, principalmente quando há a introdução de novas arboviroses em áreas endêmicas para DENV, como observado nos surtos de casos de ZIKV e CHIKV ocorridos nos últimos anos¹⁶. Portanto, o elevado número de variáveis ausentes em diferentes campos das fichas de notificação avaliadas neste estudo, evidenciam a necessidade do preenchimento adequado da ficha de notificação para casos suspeitos, uma vez que o diagnóstico clínico foi primordial na introdução dessas arboviroses no Brasil, principalmente pela ausência de disponibilidade de diagnósticos sorológicos ou moleculares.

No que tange as análises sociodemográficas realizadas, as pacientes do sexo feminino representaram cerca de 63% do total de casos avaliados no estudo, sendo que oito delas estavam grávidas no momento da notificação. Esse índice é semelhante e comumente observado em outras pesquisas, o que provavelmente se deve ao fato de que as mulheres representem o grupo de cidadãos que buscam assistência à saúde com maior frequência do que os homens, pelo menos para investigação de arboviroses, e devido ao maior risco de exposição a picadas de mosquitos por causa de seus hábitos domésticos. Pode ser ressaltado também outro fato relevante sobre esses dados, os quais podem estar intimamente relacionados ao protocolo estabelecido pelas autoridades brasileiras, o qual teve as mulheres como foco principal de vigilância, principalmente durante o período de gestação, em virtude da ocorrência da SCZ, especialmente durante os anos de 2015 e 2016. Esta observação pode ter sido gatilho motivador para as pessoas do sexo feminino buscarem mais assistência à saúde, resultando em maior número de casos positivos, conforme observado neste estudo^{13,75}.

O maior número de notificações foi observado em pacientes da faixa etária entre 19 e 59 anos, que representa a população economicamente mais ativa. Embora a ocupação profissional não tenha sido avaliada no estudo, esse perfil representa um importante alerta para a economia local, pois as arboviroses comumente afetam a produtividade do paciente, em razão dos sintomas clínicos provocados, com impacto crítico nas rotinas diárias de trabalho. Padrões semelhantes tem sido elucidado em outros estudos de perfil epidemiológico realizados no Brasil^{75,77}.

Os dados mostram que as notificações foram concentradas em áreas urbanas com elevada densidade populacional e, portanto, com maior risco de infecção por essas síndromes. Esse fato reforça e corrobora as características urbanas dos arbovírus ZIKV, DENV e CHIK, os quais são transmitidos ao homem através da picada de artrópodes antropofílicos, que atuam como hospedeiros de amplificação e manutenção do ciclo enzoótico dessas arboviroses críticas à saúde pública⁷⁸.

Embora apenas três notificações tenham sido registradas em território indígena, essas áreas rurais estão próximas às áreas urbanas de Rondonópolis e podem representar potencial zona de risco para futuros surtos, dependendo das condições ecológicas. Portanto, os casos suspeitos notificados nos pacientes indígenas destacam a importância de considerar o território indígena nos programas de vigilância epidemiológica do município.

Características epidemiológicas e condições climáticas e ecológicas, como períodos de chuvas associados a altas temperaturas, podem anunciar epidemias de arboviroses. Essas características acompanhadas de crescimento urbano desordenado, superpopulação e condições sanitárias precárias combinadas com programas ineficientes de controle de vetores resultam em mais criadouros de mosquitos e fornecem condições propícias para maior proliferação de vetores de doenças infecciosas, como os arbovírus. Nesse sentido, o baixo nível socioeconômico e a menor escolaridade são fatores importantes para os indivíduos e, consequentemente, podem aumentar o risco familiar de contrair essas síndromes febris. Além disso, as diferenças ambientais entre todos os bairros urbanos podem influenciar a alta incidência dessas doenças^{78,79}.

As três arboviroses investigadas neste estudo estão intimamente relacionadas e causam sinais e sintomas clínicos semelhantes. Além disso, o amplo espectro de manifestações clínicas observadas nas arboviroses podem dificultar o diagnóstico clínico diferencial, resultando na classificação errônea dos arbovírus que está acometendo o paciente. Portanto, a circulação concomitante de ZIKV, CHIKV, vírus Mayaro (MAYV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e vírus da febre amarela (YFV) em área endêmica ao DENV, onde nem sempre

os exames laboratoriais estão disponíveis para confirmação imediata, e que por sua vez interfere na obtenção do diagnóstico preciso, o que o torna um desafio para as autoridades de saúde pública e principalmente para os profissionais de saúde^{9,61,80,81}.

Nesse cenário, é evidente a importância do diagnóstico laboratorial através de ensaios moleculares como suporte à avaliação clínica, propiciando diagnóstico específico e diferencial ainda no início dos sintomas da infecção. O diagnóstico laboratorial dessas síndromes febris agudas é realizado pela atenção primária à saúde do sistema público de saúde brasileiro. Atualmente, baseia-se principalmente na detecção de antígenos NS1 para DENV e ensaios sorológicos para detecção de anticorpos IgM contra esses arbovírus.

Os ensaios sorológicos possibilitam a ocorrência de reações cruzadas e resultados falso-positivos em virtude da síntese de anticorpos em pacientes previamente expostos a algum *Flavivírus* heterólogo, inúmeras vezes conduzindo a diagnósticos inconclusivos⁴⁰. Além disso, os ensaios sorológicos não permitem a determinação do sorotipo de DENV circulante, dado de considerável relevância principalmente em situações epidêmicas^{75,82}. Portanto, testes diagnósticos diferenciais precisos com resposta laboratorial adequada e rápida a surtos epidêmicos de arboviroses podem melhorar o manejo clínico dos pacientes.

É importante ressaltar que ensaios moleculares e sorológicos devem ser realizados em diferentes estágios da síndrome febril aguda provocada pelos arbovírus. Ensaios moleculares só são viáveis durante os estágios de viremia, o qual corresponde a aproximadamente cinco dias após o início dos sintomas. A sorologia é um método que deve ser conduzido após a síntese de anticorpos pelo organismo do paciente, os quais são detectáveis no final do estágio de viremia. Os ensaios reportaram uma amostra positiva para DENV nas avaliações moleculares realizadas, assim como a detecção de anticorpos IgM anti-ZIKV nos ensaios sorológicos conduzidos. Esta observação pode ser atribuída à provável reatividade cruzada entre *Flavivírus* heterólogos. Cabe ressaltar que anticorpos IgM anti-ZIKV não foram detectados em outras sete amostras positivas para ZIKV nos ensaios de RT-qPCR, provavelmente por apresentarem concentração sérica em níveis abaixo do limite de detecção para o protocolo ELISA executado.

Os novos vírus descobertos recentemente no bioma Pantanal em MT são indicadores da possibilidade de interações com humanos^{10; 12}. Curiosamente, observou-se que apenas 2% (4) dos pacientes avaliados foram submetidos a algum teste diagnóstico laboratorial pelos serviços públicos de saúde de Rondonópolis durante a avaliação clínica, e todos apresentaram resultados negativos para a infecção aguda pela análise sorológica realizada. No entanto, cerca de 12,3% dos pacientes recrutados neste estudo tiveram a detecção de RNA

positiva nesta investigação molecular. Taxas semelhantes foram observadas em pesquisas relacionadas, apontando a possibilidade de infecções por outros agentes etiológicos notificadas clinicamente como síndromes febris agudas suspeitas de arboviroses⁵⁵.

Em relação à performance dos ensaios moleculares avaliados neste estudo, o teste de referência resultou em 16 amostras positivas para RNA de ZIKV, enquanto apenas três delas tiveram o material genético detectado por nested-RT-PCR. Assim, o diagnóstico molecular do ZIKV realizado por ensaios de sonda de hidrólise é consideravelmente mais sensível quando comparado ao teste de índice. Além disso, observou-se que o protocolo de detecção do RNA do ZIKV por uma RT-PCR simples não demonstrou sensibilidade nos ensaios realizados. No entanto, a detecção molecular do ZIKV foi viável quando realizada por um protocolo nested-RT-PCR.

Portanto, o protocolo de RT-PCR simples executado foi insuficiente para detectar o RNA do ZIKV, mesmo utilizando iniciadores altamente específicos, evidenciando a limitação dessa técnica e a importância em priorizar o ensaio RT-qPCR para o diagnóstico desse arbovírus. Os resultados encontrados corroboram com outros estudos, sugerindo que pacientes infectados pelo ZIKV apresentam baixos níveis de cópias virais circulante no sangue, exigindo ensaios moleculares de alta sensibilidade para um diagnóstico preciso^{62,69,83}. Esses achados provavelmente poderiam afetar o diagnóstico molecular, uma vez que todas as amostras deste estudo foram representadas por soro obtido de amostras de sangue. Além disso, estudos indicam que níveis mais altos de cópias virais do ZIKV foram observados em outras amostras biológicas humanas, como urina, saliva e sêmen, denotando a persistência do ZIKV em outros fluidos por períodos mais longos de tempo após o início da sintomatologia da infecção, aumentando a janela de detecção mesmo após o período virêmico^{62,63,84}. Por outro lado, embora tenha sido observada baixa sensibilidade, a acurácia global (92,74%) do diagnóstico para infecção por ZIKV através do protocolo nested-RT-PCR mostrou que este ensaio pode ser útil como teste diagnóstico confirmatório.

Da mesma forma, foi observada sensibilidade relativamente baixa e elevada especificidade para detecção de RNA de DENV pelo protocolo nested-RT-PCR em comparação com o ensaio de RT-qPCR, apesar da alta acurácia geral constatada. Em contraste com os resultados observados, outro estudo relatou que a sensibilidade do ensaio nested-RT-PCR para detecção de RNA de DENV pode ser superior quando comparado ao teste de diagnóstico padrão-ouro⁵⁷. Curiosamente, três amostras positivas para RNA de DENV detectado por nested-RT-PCR não apresentaram amplificação pelo teste de referência. Portanto, é importante

menção que o protocolo nested-RT-PCR usado neste estudo é capaz de detectar RNA do DENV em amostras de soro, conforme confirmado por sequenciamento genético.

O RNA do CHIKV não foi detectado em ambos os ensaios realizados provavelmente devido à baixa incidência de casos suspeitos notificados nos dezoito municípios pertencentes a área de estudo durante o período de amostragem⁷².

Apesar da alta acurácia analítica geral e do custo relativamente menor em comparação com os ensaios de RT-qPCR com sonda de hidrólise, os protocolos nested-RT-PCR podem ser inviáveis para diagnósticos de rotina nos serviços de saúde, especialmente durante surtos epidêmicos, quando elevado número de amostras biológicas é processado. Além disso, os recentes avanços dos ensaios de RT-qPCR, incluindo a detecção simultânea desses três arbovírus e a possibilidade de sorotipagem do DENV, tem resultado em uma resposta laboratorial oportuna e precisa^{55,85,86}. No entanto, protocolos nested-RT-PCR podem ser ferramentas fundamentais para estudos e pesquisas de vigilância epidemiológica molecular.

Nesse contexto, os casos negativos para as arboviroses avaliadas podem ser atribuídos a outros patógenos não investigados durante o acompanhamento clínico. Considerando o total de notificações no período estudado, é possível inferir que critérios epidemiológicos e clínicos são insuficientes para diagnósticos precisos. Além disso, o diagnóstico laboratorial preciso pode ter implicações para o manejo e evolução clínica dos pacientes, como tratamento eficaz, destacando a importância dos ensaios moleculares para a detecção precoce e confirmação definitiva das etiologias das síndromes febris agudas^{55,71}.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, os testes laboratoriais executados demonstraram a limitação do ensaio nested-RT-PCR para detectar RNA de DENV e ZIKV em comparação com aos protocolos de RT-qPCR, embora elevada especificidade tenha sido demonstrada. Portanto, o diagnóstico molecular pelo ensaio RT-qPCR é o método mais confiável para diagnosticar casos suspeitos de dengue e febre zika, principalmente em países com circulação concomitante desses arbovírus.

Considerando que a possibilidade de coinfeção é real nessas áreas, o uso dessa ferramenta de diagnóstico molecular é essencial, visto que não há vacina eficaz para prevenir surtos e nenhum programa de vigilância epidemiológica eficiente tem sido capaz de controlar a disseminação mundial dessas arboviroses.

Em relação aos aspectos clínicos e epidemiológicos avaliados, apesar da baixa qualidade das informações disponíveis nas fichas de notificação, este estudo reporta dados de extrema relevância para a compreensão da circulação desses arbovírus na região estudada, especialmente por seu caráter inédito para o local.

Portanto, o estudo realizado fornece informações locais singulares sobre a avaliação clínica e laboratorial de pacientes com suspeita de infecção por arbovírus durante o primeiro surto de ZIKV e CHIKV no Brasil, em uma região que tem apresentado elevada incidência de casos de dengue, representando uma contribuição relevante para o entendimento da ocorrência concomitante dessas síndromes febris agudas.

8. REFERÊNCIAS

- ¹ JONES, R. et al. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0220753, 2020. ISSN 1932-6203.
- ² WEAVER, S. C. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. **Antiviral Res**, v. 156, p. 80-84, Aug 2018.
- ³ WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328-45, Feb 2010. ISSN 0166-3542.
- ⁴ ROMA, J. H. F. et al. Descriptive study of suspected congenital Zika syndrome cases during the 2015-2016 epidemic in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, p. e20190105, Jul 18 2019. ISSN 0037-8682.
- ⁵ GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 951, p. 13-24, Dec 2001. ISSN 0077-8923.
- ⁶ FIGUEIREDO, L. T. How are so many foreign arboviruses introduced in Brazil? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 6, p. 665-667, Nov-Dec 2016. ISSN 0037-8682.
- ⁷ CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 745-54, Sep 2015. ISSN 0074-0276.
- ⁸ ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-3, Sep 2014. ISSN 0074-0276.
- ⁹ HEINEN, L. B. et al. Saint Louis Encephalitis virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 215-20, May-Jun 2015. ISSN 0036-4665.
- ¹⁰ MAIA, L. M. S. et al. Novel Viruses in Mosquitoes from Brazilian Pantanal. **Viruses**, v. 11, n. 10, Oct 17 2019. ISSN 1999-4915.
- ¹¹ LARA PINTO, A. Z. et al. Novel viruses in salivary glands of mosquitoes from sylvatic Cerrado, Midwestern Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 11, p. e0187429, 2017. ISSN 1932-6203.
- ¹² DE CARVALHO, M. S. et al. Viola phlebovirus is a novel Phlebotomus fever serogroup member identified in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* from Brazilian Pantanal. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 405, Jul 11 2018. ISSN 1756-3305.
- ¹³ FRANÇA, G. V. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891-7, Aug 27 2016. ISSN 0140-6736.

- ¹⁴ NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Med**, v. 13, p. 102, Apr 30 2015. ISSN 1741-7015.
- ¹⁵ NUNES, P. C. G. et al. 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. **BMC Public Health**, v. 19, n. 1, p. 329, Mar 21 2019. ISSN 1471-2458.
- ¹⁶ PAVÃO, A. L. B. et al. The role of Brazilian National Health Information Systems in assessing the impact of Zika virus outbreak. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 4, p. 450-457, Jul-Aug 2017. ISSN 0037-8682.
- ¹⁷ WILDER-SMITH, A. Dengue vaccine development: status and future. **Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz**, v. 63, n. 1, p. 40-44, Jan 2020. ISSN 1436-9990.
- ¹⁸ MORABITO, K. M.; GRAHAM, B. S. Zika Virus Vaccine Development. **J Infect Dis**, v. 216, n. suppl_10, p. S957-s963, Dec 16 2017. ISSN 0022-1899.
- ¹⁹ GAO, S.; SONG, S.; ZHANG, L. Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus. **Front Microbiol**, v. 10, p. 2881, 2019. ISSN 1664-302X.
- ²⁰ GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-96, Jul 1998. ISSN 0893-8512.
- ²¹ HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infect Genet Evol**, v. 3, n. 1, p. 19-28, May 2003. ISSN 1567-1348.
- ²² SALLES, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 1, p. 264, Apr 24 2018. ISSN 1756-3305.
- ²³ HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, n. 4, p. 376-96, Oct 1990. ISSN 0893-8512.
- ²⁴ UNO, N.; ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 167, Oct 10 2018. ISSN 2222-1751.
- ²⁵ BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013. ISSN 0028-0836.
- ²⁶ LAURETI, M. et al. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. **Front Immunol**, v. 9, p. 2180, 2018. ISSN 1664-3224.
- ²⁷ ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203.
- ²⁸ ENSERINK, M. Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. In: (Ed.). **Science**. United States, v.311, 2006. p.1085. ISBN 1095-9203.

- 29 PAUL, B. J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatol Ther**, v. 5, n. 2, p. 317-326, Dec 2018. ISSN 2198-6576.
- 30 CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. In: (Ed.). **Emerg Infect Dis**, v.21, 2015. p.1885-6. ISBN 1080-6059.
- 31 DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 24, p. 2536-43, Jun 11 2009. ISSN 0028-4793.
- 32 ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-72, Jun 2015. ISSN 0074-0276.
- 33 BRATHWAITE DICK, O. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 584-93, Oct 2012. ISSN 0002-9637.
- 34 BRASIL. Boletim Epidemiológico, SVS-MS. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022., 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no24/view> >.
- 35 _____. Confirmação do Zika Vírus no Brasil. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/17702-confirmacao-do-zika-virus-no-brasil> >.
- 36 HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, n. 2, p. 116-20, Feb 28 2016. ISSN 1972-2680.
- 37 BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 585-589, Sep-Oct 2017. ISSN 0037-8682.
- 38 CAVALCANTI, L. P. G. et al. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 583-585, Aug 2017. ISSN 0074-0276.
- 39 COLLUCCI, C. Brazilian health authorities on alert after rise in deaths from chikungunya. **Bmj**, v. 355, p. i6360, Nov 24 2016. ISSN 0959-8138.
- 40 LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 1232-9, Aug 2008. ISSN 1080-6040.
- 41 WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 523-40, Jul 2009. ISSN 1567-1348.
- 42 FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **J Clin Virol**, v. 43, n. 1, p. 96-101, Sep 2008. ISSN 1386-6532.
- 43 LANCIOTTI, R. S.; LAMBERT, A. J. Phylogenetic Analysis of Chikungunya Virus Strains Circulating in the Western Hemisphere. **Am J Trop Med Hyg**, v. 94, n. 4, p. 800-3, Apr 2016. ISSN 0002-9637.

- 44 MOTA, M. T. D. O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109-1122, 2015. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl.15.76> >.
- 45 WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. e101-e106, Mar 2017. ISSN 1473-3099.
- 46 DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saude Publica**, v. 51, p. 30, Apr 10 2017. ISSN 0034-8910.
- 47 LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 50, Jun 27 2016. ISSN 0034-8910.
- 48 GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J Gen Virol**, v. 97, n. 2, p. 269-273, Feb 2016. ISSN 0022-1317.
- 49 CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **J Autoimmun**, v. 68, p. 1-13, Apr 2016. ISSN 0896-8411.
- 50 COFRÉ, F. [Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?]. **Rev Chilena Infectol**, v. 33, n. 1, p. 96, Feb 2016. ISSN 0716-1018.
- 51 MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, v. 374, n. 10, p. 951-8, Mar 10 2016. ISSN 0028-4793.
- 52 WHO. WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome., Geneva, SWI., 2016. Disponível em: < <https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barré-syndrome> >.
- 53 BRASIL. Boletim Epidemiológicos, SVS-MS. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 19 de 2022., 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no19/view> >.
- 54 SANTOS, N. S. D. O. et al. **Virologia Humana**. 4th. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 2021.
- 55 VIEIRA, D. S. et al. Epidemiological profile of Zika, Dengue and Chikungunya virus infections identified by medical and molecular evaluations in Rondonia, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 61, p. e40, Aug 19 2019. ISSN 0036-4665.
- 56 RIBEIRO, M. O. et al. Analytical and clinical performance of molecular assay used by the Brazilian public laboratory network to detect and discriminate Zika, Dengue and Chikungunya viruses in blood. **Braz J Infect Dis**, v. 25, n. 2, p. 101542, Mar-Apr 2021. ISSN 1413-8670.

- ⁵⁷ COLOMBO, T. E. et al. Performance of CDC Trioplex qPCR during a dengue outbreak in Brazil. **J Clin Virol**, v. 121, p. 104208, Dec 2019. ISSN 1386-6532.
- ⁵⁸ LOPEZ-JIMENA, B. et al. Development and Validation of Real-Time RT-LAMP Assays for the Specific Detection of Zika Virus. **Methods Mol Biol**, v. 2142, p. 147-164, 2020. ISSN 1064-3745.
- ⁵⁹ ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. Grupo A 2017. E-book. 9788582714232. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582714232/>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- ⁶⁰ DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005. ISSN 0095-1137.
- ⁶¹ DE SOUZA COSTA, M. C. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016. **Acta Trop**, v. 190, p. 395-402, Feb 2019. ISSN 0001-706x.
- ⁶² JUDICE, C. C. et al. Efficient detection of Zika virus RNA in patients' blood from the 2016 outbreak in Campinas, Brazil. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 4012, Mar 5 2018. ISSN 2045-2322.
- ⁶³ MATHERON, S. et al. Long-Lasting Persistence of Zika Virus in Semen. In: (Ed.). **Clin Infect Dis**. United States, v.63, 2016. p.1264. ISBN 1537-6591.
- ⁶⁴ STAPLEFORD, K. A.; MULLIGAN, M. J. A New Vaccine for Chikungunya Virus. In: (Ed.). **Jama**. United States, v.323, 2020. p.1351-1352. ISBN 1538-3598.
- ⁶⁵ WEAVER, S. C. et al. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**, v. 69, p. 395-408, Jan 29 2018. ISSN 0066-4219.
- ⁶⁶ Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. 2021. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/mt/rondonopolis.html> >.
- ⁶⁷ Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso. 2022. Disponível em: < <http://www.saude.mt.gov.br/cib/arquivos/605/regioes-de-saude> >.
- ⁶⁸ FULOP, L. et al. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **J Virol Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179-88, Oct 1993. ISSN 0166-0934.
- ⁶⁹ BALM, M. N. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **J Med Virol**, v. 84, n. 9, p. 1501-5, Sep 2012. ISSN 0146-6615.
- ⁷⁰ HASEBE, F. et al. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Med Virol**, v. 67, n. 3, p. 370-4, Jul 2002. ISSN 0146-6615.

- ⁷¹ FAHSBENDER, E. et al. Plasma virome of 781 Brazilians with unexplained symptoms of arbovirus infection include a novel parvovirus and densovirus. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0229993, 2020. ISSN 1932-6203.
- ⁷² BRASIL. Mato Grosso. Secretaria de Estado de Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 35 SE 50/2016. Monitoramento dos casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika. 2016. Disponível em: < <http://www.saude.mt.gov.br/suvsa/arquivos/526/boletins-epidemiologicos?page=2> >. Acesso em: December 10.
- ⁷³ _____. Mato Grosso. Secretaria de Estado de Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 45 SE 52/2017. Monitoramento dos casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika. 2017. Disponível em: < <http://www.saude.mt.gov.br/suvsa/arquivos/526/boletins-epidemiologicos?page=1> >. Acesso em: December 10.
- ⁷⁴ _____. Mato Grosso. Secretaria de Estado de Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 9 SE 11/2016. Monitoramento dos casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika. 2016. Disponível em: < <http://www.saude.mt.gov.br/suvsa/arquivos/526/boletins-epidemiologicos?page=3> >. Acesso em: December 10.
- ⁷⁵ VEGA, F. L. R. et al. Emergence of chikungunya and Zika in a municipality endemic to dengue, Santa Luzia, MG, Brazil, 2015-2017. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, p. e20180347, Jan 14 2019. ISSN 0037-8682.
- ⁷⁶ BRASIL. Mato Grosso. Secretaria de Estado de Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 5 SE 07/2016. Monitoramento dos casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre pelo vírus Zika. 2016. Disponível em: < <http://www.saude.mt.gov.br/suvsa/arquivos/526/boletins-epidemiologicos?page=3> >. Acesso em: December 10.
- ⁷⁷ ALMEIDA, J. F. P. D.; ALVES, W. A. Descriptive profile of the occurrence of arboviruses in Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil. **J. Health Biol Sci**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2020.
- ⁷⁸ RODRIGUES, N. C. P. et al. Risk factors for arbovirus infections in a low-income community of Rio de Janeiro, Brazil, 2015-2016. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198357, 2018. ISSN 1932-6203.
- ⁷⁹ CRUZ, L. et al. Influence of climatic variables on the *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* populations in Mato Grosso, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, p. e20190185, 2020. ISSN 0037-8682.
- ⁸⁰ SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20-9, Jan 2016. ISSN 0074-0276.
- ⁸¹ OLIVEIRA, J. F. et al. Interdependence between confirmed and discarded cases of dengue, chikungunya and Zika viruses in Brazil: A multivariate time-series analysis. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0228347, 2020. ISSN 1932-6203.

- ⁸² FRITZELL, C. et al. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 7, p. e0006533, Jul 2018. ISSN 1935-2727.
- ⁸³ COLOMBO, T. E. et al. Zika detection: comparison of methodologies. **Braz J Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 144-147, Jan-Mar 2018. ISSN 1517-8382.
- ⁸⁴ BINGHAM, A. M. et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 65, n. 18, p. 475-8, May 13 2016. ISSN 0149-2195.
- ⁸⁵ LI, L. et al. Development of a direct reverse-transcription quantitative PCR (dirRT-qPCR) assay for clinical Zika diagnosis. **Int J Infect Dis**, v. 85, p. 167-174, Aug 2019. ISSN 1201-9712.
- ⁸⁶ SILVA, S. et al. Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 4494, Mar 14 2019. ISSN 2045-2322.

ANEXOS

Anexo I

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal Mato Grosso – UFMT, Campus Universitário de Rondonópolis – CUR em 26 de abril de 2019 sob parecer nº. 3.288.872. Aprovação de Emenda (E1) ao projeto inicial em 04/05/2021, Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Rondonópolis – UFR.

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DAS ARBOVIROSES DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM PACIENTES COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA NA REGIÃO SUL DO ESTADO DE MATO GROSSO Pesquisador Responsável: Juliana Helena Chavez Pavoni Área Temática: Versão: 1 CAAE: 10767319.8.0000.8088 Submetido em: 21/03/2019 Instituição Proponente: Câmpus Universitário de Rondonópolis - Curso de Medicina Situação da Versão do Projeto: Aprovado Localização atual da Versão do Projeto: Universidade Federal de Rondonópolis - UFR Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
	
Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1312516	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título Público: DESEMPENHO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DAS ARBOVIROSES DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM PACIENTES COM SÍNDROME FEBRIL AGUDA NA REGIÃO SUL DO ESTADO DE MATO GROSSO Pesquisador Responsável: Juliana Helena Chavez Pavoni Contato Público: Juliana Helena Chavez Pavoni Condições de saúde ou problemas estudados: Descritores CID - Gerais: Descritores CID - Específicos: Descritores CID - da Intervenção: Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 04/05/2021	
	
DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE	
Nome da Instituição: Câmpus Universitário de Rondonópolis - Curso de Medicina Cidade: RONDONÓPOLIS	
DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
Comitê de Ética Responsável: 126 - Universidade Federal de Rondonópolis - UFR Endereço: AVENIDA DOS ESTUDANTES, 5055 Bloco Administrativo da UFR, terreo, sala 1 Telefone: (66)3410-4153 E-mail: cep@ufr.edu.br	
CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA	
CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA	