UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

THAYANE DA ENCARNAÇÃO SÁ GUIMARÃES

DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM

RIO DE JANEIRO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

THAYANE DA ENCARNAÇÃO SÁ GUIMARÃES

DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

RIO DE JANEIRO

2018

da Encarnação Sá Guimarães, Thayane
DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM / Thayane da Encarnação Sá Guimarães. -- Rio de Janeiro, 2018.
73 f.

Orientadora: Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2018.
1. qPCR. 2. Zika vírus. 3. SYBR Green. 4. Detecção viral. I. Ferreira Moreira Carvalho Cardoso, Mônica, orient. II. Título.

THAYANE DA ENCARNAÇÃO SÁ GUIMARÃES

DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

_____

Prof. Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso, Instituto de Química/ Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Cristiane Dinis Ano Bom, Instituto de Química / Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. Maite Vaslin de Freitas Silva, Instituto de Microbiologia / Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Prof. José Nelson dos Santos Silva Couceiro, Instituto de Microbiologia / Universidade Federal do Rio de Janeiro

_____

Dr. Márcia Regina Soares da Silva, Instituto de Química / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Agradecimentos

Agradeço a minha família por toda paciência, compreensão e apoio.

Em especial à minha mãe, que virou muitas noites comigo, enquanto eu escrevia, escutou todas as minhas reclamações, me dando todo apoio psicológico (afinal, tem que fazer valer o diploma né).

Ao meu namorado Alan, a pessoa mais paciente que eu conheço, sempre disponível para me ouvir. É quase um santo. Não me deixou surtar, coitado deve ter meditado muito no processo.

A minha orientadora, Professora Mônica, que sempre está disponível, nos horários mais exóticos inclusive, não só para falar sobre ciência como para tantas outras coisas.

A professora Ana Cláudia por todo apoio nesse processo.

As minhas 3 cadelas, que são ótimas fontes de calor durante as noites frias e que sempre me obrigam a fazer as tão necessárias pausas na escrita.

A todos do os companheiros de bancada do LABBMOVE, que foram essenciais para desenvolver os experimentos e tornaram tudo muito mais divertido o processo, com várias doses de risadas. Em especial ao Tiago Salles, que me ensinou muita coisa desde a graduação.

As minhas amigas da Microbiologia Mariana, Priscylla e Jacqueline, quem mais compartilharia a minha revolta aos absurdos lidos na internet sobre a nossa profissão?!

Ao pessoal do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia, que sempre cobram a minha presença nas festinhas...

E por fim, ao suporte financeiro da CAPES e FAPERJ, por que sem dinheiro ninguém trabalha.

" Costumávamos pensar que nosso futuro estava nas estrelas.
Agora sabemos que ele está nos nossos genes"
James Dewey Watson

Resumo

DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS: PADRONIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE PCR CONVENCIONAL E QUANTITATIVO POR SYBR GREEN NA REGIÃO GENÔMICA C-prM

Thayane da Encarnação Sá Guimarães
Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

O vírus Zika (ZIKV) é o agente etiológico da febre zika, uma arbovirose transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. Além do mosquito, o ZIKV pode ser transmitido por via sexual, materno-fetal e transfusão de sangue. Esse arbovírus, integra a família *Flaviviridae*, seu genoma é composto por RNA de fita simples e polaridade positiva. Até o momento, sua patogênese não é bem estabelecida, todavia, sabe-se que o vírus é detectado em alguns tipos de amostras como: sangue, saliva, urina, líquido amniótico e sêmen de pacientes. Cerca de 80% dos infectados com ZIKV são assintomáticos, esta doença é autolimitante dura de 2 a 7 dias, apresentando como principais sintomas: febre, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema, conjuntivite e mal-estar, alguns casos podem chegar a complicações neurológicas como síndrome de Guillain-Barré e malformações como a microcefalia. A recomendação da OMS é a realização do diagnóstico molecular do genoma viral para a confirmação da doença, utilizando ensaios da reação de cadeia de polimerase: RT-PCR e PCR quantitativo (qPCR). Esse projeto teve como objetivo desenvolver um protocolo qualitativo e quantitativo para detecção da carga viral do ZIKV, que inclui novos pares de iniciadores para diagnóstico, localizados na junção entre os genes do capsídeo e da pré-Membrana (C-prM). Esta região gênica foi escolhida por ser mais divergente entre os genomas virais da família *Flaviviridae* do que a região da proteína E, proposta por Lanciotti *et al.*, 2008 para detectar o ZIKV. Para isso, foram utilizados os métodos de extração de RNA por TRIzol, síntese de cDNA, PCR convencional (*hemi-nested*), qPCR (SYBR Green), clonagen da sequência do vírus em vetor de expressão e sequenciamento. Foram desenhados e testados pares de iniciadores para detecção do ZIKV utilizando como *template* um plasmídeo sintético, e o cDNA do vírus, proveniente de células Vero. Dois pares de iniciadores foram testados e apenas um se apresentou mais específico e foi utilizado para detecção de ZIKV. O par selecionado foi testado por biologia computacional contra o banco de dados do NCBI utilizando as palavras chaves: *"Zika virus" [porgn: _txid64320] AND genome NOT partial NOT nearl"*. No banco foram encontradas 1.123 sequências completas de ZIKV e o par de iniciadores foi capaz de reconhecer todas. O protocolo do RT-PCR foi validado com as amostras de pacientes com aparente quadro clínico de febre zika, a saber: saliva (14) e urina (5), como controle negativo amostras de saliva de pacientes sem a presença do quadro clínico (protocolo de ética: 80709 HUCFF/FM/UFRJ). Das 19 amostras testadas, 15 delas apresentaram resultado positivo, utilizando para detecção o par GTZK-F/STZK-R na técnica de PCR convencional. No ensaio de qPCR, este par de iniciadores apresentou uma eficiência de 94% para o cDNA do vírus e 97% para o plasmídeo sintético. Na análise das curvas de dissociação foi observado um alto grau de especificidade do par de iniciadores, GTZK-F/STZK-R, tendo aparecido um pico em ≈81 ºC, característico da temperatura de *Melting*, nas duas amostras controles. Também foi testado a possibilidade reconhecimento cruzado com

outros arbovírus pelo par de iniciadores tanto no ensaio de PCR convencional quanto no qPCR, o par de iniciadores não reconheceu os outros arbovírus. O cDNA de duas amostras biológicas, uma de saliva e uma de urina do mesmo paciente, foram amplificadas com o par de iniciadores, GTZK-F/STZK-R, e os produtos de PCR foram purificados, clonados em pGEM-T Easy Vector e sequenciados na plataforma de DNA PDTIS/FIOCRUZ. Os resultados do sequenciamento apontaram a cepa ZIKV, da República Centro-Africana, com maior similaridade. Na validação dos iniciadores no qPCR com as amostras clínicas, 4 amostras de saliva foram amplificadas e quantificadas, validando esses iniciadores nesta técnica. Os resultados obtidos demonstram que a metodologia utilizada no presente trabalho é capaz de realizar o diagnóstico do vírus Zika sem reconhecimento cruzado com outros vírus e pode ser usada nas detecções rotineiras de laboratórios públicos e privados.

Palavras-chave: qPCR, Zika vírus, SYBR Green, Detecção viral

Abstract

ZIKA VIRUS DIAGNOSIS: STANDARDIZATION OF CONVENTIONAL AND QUANTITATIVE PCR TECHNIQUES BY SYBR GREEN IN THE GENOMIC REGION C-prM

Thayane da Encarnação Sá Guimarães
Mônica Ferreira Moreira Carvalho Cardoso

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Zika virus (ZIKV) is the etiological agent of zika fever, an arbovirose transmitted mainly by mosquito *Aedes* genus. In addition to the mosquito, ZIKV can be transmitted sexually, maternal-fetal and blood transfusion. This arbovirus, is part of the *Flaviviridae* family, its genome is composed of single-stranded RNA and positive polarity. To date, its pathogenesis is not well established, however, it is known that the virus is detected in some types of samples such as: blood, saliva, urine, amniotic fluid and semen of patients. About 80% of those infected with ZIKV are asymptomatic; this disease is self-limiting for 2 to 7 days, presenting as main symptoms: fever, arthralgia, myalgia, headache, rash, conjunctivitis and malaise, some cases can reach neurological complications such as Guillain-Barré syndrome and malformations such as microcephaly. The WHO recommendation is to perform the molecular diagnosis of the viral genome to confirm the disease, using polymerase chain reaction assays: RT-PCR and quantitative PCR (qPCR). This project aimed to develop a qualitative and quantitative protocols for the detection of ZIKV viral load, which includes new pairs of primers for diagnosis, located at the genes junction between the capsid and pre-Membrane (C-prM). This gene region was chosen because it is more divergent among the viral genomes of the *Flaviviridae* family than the region of the prM-E proteins, proposed by Lanciotti *et al*., 2008 to detect ZIKV. For this, the methods were used of extracting RNA by TRIzol, cDNA synthesis, conventional PCR (hemi-nested), qPCR (SYBR Green), cloning of the virus sequence into expression vector and sequencing. Primer pairs were designed and tested for ZIKV detection using a synthetic plasmid as template and virus cDNA from Vero cells. Two pairs of primers were tested and only one was more specific and was used to detect ZIKV. The selected pair was tested by computational biology against the NCBI database using the keywords: *"Zika virus" [porgn: _txid64320] AND genome NOT partial NOT nearl"*. In the database, 1,123 complete ZIKV sequences were found and the primer pair was able to recognize all of them. The conventional PCR protocol was validated with the samples from patients with apparent clinical signs of zika fever, namely: saliva (14) and urine (5), as negative control salivary samples of patients without the presence of the clinical picture of ethics: 80709 HUCFF/FM/UFRJ). Of the 19 samples tested, 15 of them showed a positive result, using the pair for detecting GTZK-F/R-STZK-R pair in the conventional PCR technique. In the qPCR assay, this pair of primers had showed an efficiency of 94% for cDNA of the virus and 97% for the synthetic plasmid. In the analysis of the dissociation curves a high degree of specificity of the pair of primers, GTZK-F/STZK-R, was observed, showing a peak at ≈81 ºC, characteristic of Melting temperature, in the two control samples. Also tested was the possibility of cross-recognition with other arboviruses by the primer pair in both the conventional PCR assay and the qPCR, the primer pair did not recognize the other arboviruses. The cDNA from two biological samples, saliva and urine of the same patient,

were amplified with the pair of primers, GTZK-F/STZK-R, and the PCR products were purified, cloned into pGEM-T Easy Vector and sequenced on the DNA PDTIS/FIOCRUZ platform. The results of the sequencing indicated the ZIKV strain, of the Central African Republic, with greater similarity. In the validation of the primers in the qPCR with the clinical samples, 4 saliva samples were amplified and quantified, validating these primers in this technique. The results obtained demonstrate that the methodology used in the present work is able to diagnose the Zika virus without cross-recognition with other viruses and can be used in the routine detections of public and private laboratories.

Keywords: qPCR, Zika virus, SYBR Green, Detection viral

Lista de Figuras

Pag.

Figura 1: Incidência de casos de ZIKV/100 mil habitantes, por região do Brasil nos anos 2016, 2017 e 2018. **23**

Figura 2: Vias de transmissão do vírus Zika: Ciclo silvestre e urbano e vias alternativas **29**

Figura 3: Mapa da incidência dos mosquitos *Aedes aegypti* no globo e a distribuição geográfica do relato de casos de febre zika até março de 2017. **29**

Figura 4: Mapa do plasmídeo vetor pGEM®-T *Easy Vector Systems.* **37**

Figura 5: Fluxograma: Metodologia utilizada no estudo **41**

Figura 6: Alinhamento das sequências representativas da região C-prM dos sorotipos do vírus da Dengue 1-4 e do vírus Zika feito com o programa BLASTn. **43**

Figura 7: Imagem representativa da Curva de *Melting* de amostras de cDNA de ZIKV, diluição seriada, para padronização com o par de iniciadores mD1-F/GTZK-R em ensaio de qPCR com SYBR Green. **45**

Figura 8: Figura representativa dos quadros de *Mismatches*, gerados com erro acima de 40%, no programa *Primer Search Emboss Tool* para as 1.123 sequências completas de ZIKV com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **46**

Figura 9: Ensaio de PCR convencional com cDNA de arbovírus das famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **46**

Figura 10: Gel de agarose da 2ª reação da técnica de *hemi-nested* PCR com cDNA de amostras clínicas de saliva e urina, produtos amplificados com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **47**

Figura 11: PCR convencional dos plasmídeos das amostras 5 (urina) e 6 (saliva) no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems, com os iniciadores GTZK-F/STZK-R. **49**

Figura 12: Gel de agarose de confirmação da extração dos fragmentos gerados a partir dos plasmídeos por PCR convencional com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R das amostras 5 (urina) e 6 (saliva) extraídos do gel. **49**

Figura 13: Figura representativa das sequências de ZIKV encontradas na busca, banco de dados do NCBI, com a sequência molde obtida do sequenciamento da amostra 5 (urina). **50**

Figura 14: Figura representativa das sequências de ZIKV encontradas na busca, banco de dados do NCBI, com a sequência molde obtida do sequenciamento da amostra 6 (saliva). **51**

Figura 15: Curva de regressão linear da curva de diluição seriada do cDNA de ZIKV **53**

para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green.

Figura 16: Curva de *Melting* da curva de diluição seriada do cDNA de ZIKV para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green. **53**

Figura 17: Curva de regressão linear da padronização com plasmídeo sintético de ZIKV em qPCR com SYBR Green utilizando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **55**

Figura 18: Curva de *Melting* da curva de diluição seriada do plasmídeo sintético de ZIKV para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green. **55**

Figura 19: Curva de Melting do método qPCR com SYBR Green dos arbovírus usando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **56**

Figura 20: Curva de *Melting* das amostras clínicas de saliva e urina no método qPCR com SYBR Green usando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **57**

Lista de tabelas

Pag.

Tabela 1: Iniciadores para a região alvo C-prM utilizados ne metodologia de *hemi-nested* PCR. **36**

Tabela 2: Amplificação de material viral com iniciadores desenhados na região C-prM do ZIKV em PCR convencional. **44**

Tabela 3: Resultado da PCR convencional do painel de amostras clínicas humanas com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R específico para região C-prM de Zika vírus. **48**

Tabela 4: Dosagem dos fragmentos purificados gerados a partir dos plasmídeos dos cDNAs da amostra 5 de urina e amostra 6 de saliva. **49**

Tabela 5: Desempenho do ensaio de qPCR utilizando SYBR Green e eficiência da padronização com a curva de diluição seriada de cDNA de ZIKV utilizando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. **52**

Tabela 6: Desempenho do ensaio utilizando SYBR Green, eficiência e Nº de cópias com curva de diluição seriada do plasmídeo sintético de ZIKV. **54**

Tabela 7: Número de cópias das amostras clínicas de acordo com a relação do CT com a curva padrão do plasmídeo de ZIKV. **58**

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C – Grau Celsius

AAS – Ácido acetilsalicílico

ASFV - African swine fever vírus

BLASTn - Basic Local Alignment Search Tool nucleotides

C - Proteína estrutural do capsídeo viral

cDNA – "complementary DNA", DNA complementar

CHIKV – Vírus chikungunya

cm^2 – Centímetro quadrado

CO_2 – Dióxido de carbono

CPE – Efeito citopático

CT- Cycle threshold

CZ – cDNA de ZIKV

DENV – Vírus da Dengue

DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio-padrão

E - Proteína estrutural do envelope viral

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática

FDA – "Food and Drug Administration"

Fig. – Figura

g – Grama

Hab. – Habitantes

IFA – Ensaio de imunofluorescência

IFNα – Interferon-alpha (tipo I)

IFNβ – Interferon-beta (tipo I)

IFNλ – Interferon-lambda (tipo III)

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

kb – kilobase

kDa – kilodaltons

M – Proteína estrutural da membrana

MAYV – vírus Mayaro

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

Min. – Minuto

MIQE - Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines

mL – mililitro

MM – Massa Molar

MOI – multiplicidade de infecção

MS – Ministério da Saúde

NCBI - National Center for Biotechnology Information

nm - Nanômetro

nmol - Nanomolar

nº – Número

NS – Proteínas não estruturais

NS1 – Proteína não estrutural 1

NS2A – Proteína não estrutural 2A

NS2B – Proteína não estrutural 2B

NS3 – Proteína não estrutural 3

NS4A – Proteína não estrutural 4A

NS4B – Proteína não estrutural 4B

NS5 – Proteína não estrutural 5

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – "Open Reading Frame", Fase de leitura aberta

pb – Par de base

PCR – "Polymerase Chain Reaction", Reação da polimerase em cadeia

pH – Potencial de hidrogênio

prM - Proteína estrutural de pré-membrana

PRNT - Teste de neutralização de redução de placa

PZ – Plasmídeo sintético de ZIKV

qPCR – "Polymerase Chain Reaction quantitative", reação da polimerase em cadeia quantitativa

RNA – Ácido ribonucleico

rpm - Rotações Por Minuto

RT-PCR – “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”, Transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia

RT-qPCR – “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative”, Transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia quantitativa

Seg. – Segundo

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SINV – vírus Sindbis

SLEV – Vírus da Encefalite de Saint Louis

Tab. – Tabela

Tm – “Melting Temperature”, Temperatura de Melting

U – unidade

UTR – “Untranslanted Region”, Região não traduzida

WNV – Vírus do Oeste do Nilo

YFV – vírus da febre amarela

ZIKV – vírus Zika

μg – Micrograma

μL –Microlitro

μm – micrômetro

Sumário

	Pág.
1. Introdução	**18**
1.1 Vírus	18
1.2 Arbovírus	18
1.2.1 Gênero *Flavivírus*	19
1.2.2 Zika vírus	20
1.3 Histórico do Vírus Zika	21
1.4 Distribuição geográfica de ZIKV	21
1.4.1 Distribuição de ZIKV no Brasil	23
1.5 Manifestações clínicas	24
1.5.1 Complicações relacionadas ao ZIKV	24
1.5.1.1 Microcefalia	24
1.5.1.2 Síndrome de Guillain-Barré	25
1.5.1.3 Síndrome congênita do Zika vírus	26
1.6 Métodos de Diagnóstico	27
1.7 Vias de Transmissão	28
1.8 Vetor do vírus	30
1.9 Tratamento	31
1.10 Controle e Prevenção	31
2. Objetivos	**33**
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3. Material e métodos	**34**
3.1 Coleta de amostras	34
3.2 Preparação dos vírus	34
3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA	34
3.4 Alinhamento de sequências em bando de dados (BLASTn)	35
3.5 Desenho dos iniciadores	35
3.5.1 Biologia computacional	36
3.6 Plasmídeo sintético de ZIKV e clonagem do vírus em pGEM®-T Easy Vector System	36
3.7 PCR convencional	38
3.8 PCR quantitativo (qPCR)	38
3.8.1 Análise de dados (quantificação absoluta)	39
3.9 Sequenciamento	39
4. Resultados	**42**
5. Discussão	**59**
6. Conclusão	**65**
7. Referências	**66**

1.Introdução

1.1 Vírus

Em 1957, Lwoff definiu os vírus como agentes infecciosos intracelulares, com potencial patogênico, que detém apenas um tipo de material genético, utilizando este para sua multiplicação, inapto para crescer e sofrer fissão binária e destituído de um sistema Lipmann. Sendo os menores organismos auto-replicantes filtráveis, passam através de filtros com poros de 0,22 μm. Sua essência é constituída de um pequeno segmento de ácido nucleico preservado em um envoltório de proteína simples, a cápside (Raoult & Forterre, 2008; Knipe *et al.*, 2013). A definição de Lwoff caiu em desuso, devido a descoberta de vírus gigantes, entrando em vigor uma nova definição: organismos codificadores de cápside em contraposição aos organismos celulares que codificam os ribossomos, a teoria "capsidocêntrica" (Raoult & Forterre, 2008; Forterre, 2010; Castrignano, 2016)

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus são capazes de infectar representantes dos 3 domínios (Eukarya, Bacteria e Archaea), inclusive podem ser comensais de outros vírus (Bamford, 2003; Raoult & Forterre, 2008). Sendo encontrados em todos os ambientes onde há vida, mesmo os mais hostis, levando a crer que todas as células tenham vírus associados, os níveis de associação variam do parasitismo ao mutualismo (Berliner, Mochizuki e Stedman, 2018).

1.2 Arbovírus

Os arbovírus são um ramo composto por diversos vírus, transmitidos por artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos. Muitos destes vírus se perpetuam na natureza através de ciclos complexos que envolvem vetores artrópodes hematófagos que se alimentam de animais vertebrados como mamíferos e aves. (Figueiredo, 2007; WHO, 2009; Calisher e Higgs, 2018). Seus representantes estão nas famílias *Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae* e *Rhabdoviridae,* vírus cujo genoma é o RNA (Figueiredo, 2007) e a exceção é o *African swine fever virus* (ASFV) que tem genoma de DNA e é membro da família *Asfaviridae* (Weaver & Reisen, 2010; Casseb *et al.*, 2013).

A manutenção desses vírus na natureza ocorre através da replicação em vertebrados infectados, denominados hospedeiros, produzindo uma viremia e nos tecidos de artrópodes (vetores). O ciclo de transmissão desses vírus, em geral, tem início quando um artrópode se alimenta de um hospedeiro vertebrado infectado, em seguida esses vírus vão replicar no vetor

artrópode, este ao picar outro vertebrado não infectado vai transmitir o vírus. Outra possibilidade pela qual esses vírus se perpetuam é pela transmissão vertical (transovariana) (Figueiredo, 2007; Calisher & Higgs, 2018; Venter, 2018).

1.2.1 Gênero *Flavivírus*

O gênero *Flavivírus* é constituído por vírus pequenos (40-60 nm de diâmetro) de simetria icosaédrica, seu genoma é formado por RNA de fita simples polaridade positiva com aproximadamente 11 kilobases (kb). Esse genoma dispõe de apenas uma fase de leitura aberta (ORF) que vai codificar 10 proteínas, entre estruturais e não-estruturais e duas regiões não codificantes (UTR's) que flanqueiam essa ORF. Várias cópias da proteína estrutural de capsídeo (C) vão deter essa fita de RNA formando o nucleocapsídeo (Smit *et al.*, 2011; Lopes, Nozawa & Linhares, 2014).

O nucleocapsídeo dos vírus é envolto por uma membrana lipídica procedente das células do hospedeiro, nessa membrana estão inseridas as proteínas transmembrana, proteína de membrana M (8 kDa) e as espículas de glicoproteína E (53 kDa). A proteína pré-membrana (prM) (≈21 kDa) fica ancorada na membrana por duas hélices transmembrana, esta é a forma precursora da proteína M que será clivado dando origem a proteína M (Smit *et al.*, 2011). Além das proteínas estruturais, o genoma dos *flavivírus* origina sete proteínas não-estruturais (NS) denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que vão desempenhar funções de regulação e expressão do vírus (patogenicidade, replicação e virulência) (Chambers *et al.*, 1990; Lopes, Nozawa & Linhares, 2014; Sirohi *et al.*, 2016).

A entrada desses vírus nas células hospedeiras vai ser mediada por um processo de endocitose que requer receptores para que ocorra a fusão da membrana endossomal com o envelope viral, esse processo de fusão vai ser desencadeado pelo pH do lúmen do endossomo que será levemente mais ácido que o do citosol (Smit *et al.*, 2011).

O gênero dos *flavivírus* é capaz de infectar um leque variado de espécies de vertebrados e a maioria dos representantes desse gênero também é capaz de replicar nos artrópodes. Cada um desses vírus possui uma quantidade diferente de hospedeiros (Calisher & Higgs, 2018). Alguns representantes desse grupo têm grande impacto na saúde humana, como o vírus da Febre Amarela (YFV), os 4 sorotipos do vírus da Dengue (DENV), o Vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV), o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e o vírus Zika (ZIKV) (Casseb *et al.*, 2013; Braack *et al.*, 2018).

Os *flavivírus* podem ser classificados em 4 grupos segundo seus hospedeiros: vírus de vertebrados sem vetor (chamado grupo sem vetores ou sem vetor conhecido), vírus de insetos (mosquitos) que não são capazes de se replicar em vertebrados, vírus transmitidos por mosquitos com capacidade de replicar em mosquitos e vertebrados e vírus transmitidos por carrapatos que se replicam em carrapatos e vertebrados (Kuno, 2007; Calisher & Higgs, 2018).

1.2.2 Zika vírus

Pertencente à família *flaviviridae*, gênero *flavivírus*, o vírus Zika (ZIKV) tem entre 30 e 45 μm de diâmetro, de genoma não segmentado ≈10,8 kb (3.419 aminoácidos), sendo RNA de polaridade positiva, codifica uma única ORF que origina 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E) e 7 não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Dick, 1952; Kuno & Chang, 2007; Faye *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2016). Sua ORF é flanqueada por 2 UTR's, a 5'-UTR composta de 106 nucleotídeos e 3'-UTR por 428 nucleotídeos de comprimento (Faye *et al.*, 2014; Ye *et al*., 2016).

A poliproteína viral gerada vai sofrer modificações de co-tradução e/ou pós-tradução pela ação conjunta entre NS2B/NS3, uma serina protease viral e proteases do hospedeiro, fazendo a clivagem em seus segmentos estruturais e não-estruturais (Chang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016). A NS5 é a proteína não-estrutural com maior conservação entre os flavivírus, esta exerce função de RNA polimerase dependente de RNA (porção C-terminal) e de metiltransferase (porção N-terminal) (Faye *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016).

O vírion de ZIKV é recoberto pela proteína E, a principal responsável pela resposta antigênica dos *flavivírus* o que a torna um alvo dos anticorpos neutralizantes; além de determinar a ligação e penetração em célula hospedeira, seu dobramento é controlado pela prM que é clivada pela furina para originar a proteína de membrana antes da liberação da partícula viral madura no meio extracelular, a ação da furina ocorre no Golgi (Faye *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016; Bardina *et al.*, 2017).

A neurogênese e a diferenciação celular podem ser prejudicadas pela infecção por ZIKV (Nayak *et al*., 2016; Koppolu & Raju, 2018). Isso se deve aos vários fatores de adesão, migração, proliferação e sobrevivência (ex.: AXL, DC-SIGN, Tyro3 e TIM-1) utilizados pelo ZIKV, que estão presentes em vários tipos celulares como as células endoteliais, astrócitos, células-tronco neurais, fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas. Células imunes e dendríticas produzem interferon tipo I (IFNα e IFNβ) em resposta a infecção viral, enquanto

as células de origem epitelial respondem a infecção viral produzindo IFNs tipo III, (IFNλ1–4). Mas o ZIKV consegue invadir as vias de sinalização antiviral INF tipo I e III para acessar o compartimento fetal pelos macrófagos e sinciciotrofoblastos (Nayak *et al*., 2016; Lee *et al*., 2018).

1.3 Histórico do Vírus Zika

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, durante o monitoramento de febre amarela, onde um vírus desconhecido foi identificado no sangue do macaco sentinela *Rhesus* 766 (espécie *Macaca mulatta*), este vertebrado apresentava quadro febril. O vírus isolado em questão, foi denominado vírus Zika (ZIKV) em referência ao lugar do seu isolamento que ocorreu na floresta de Zika em Uganda (Dick, Kitchen & Haddow, 1952). Em 1948, a partir de macerados de mosquitos da espécie *Aedes africanus* (usados para estudos de vigilância da febre amarela), o ZIKV voltou a ser isolado, sinalizando os mosquitos do gênero *Aedes* como vetores deste vírus (Dick, Kitchen & Haddow, 1952). Residentes da área onde o vírus foi isolado apresentavam anticorpos para ZIKV, mas não há dados de indivíduos humanos com desenvolvimento da doença (Dick, 1952).

Macnamara (1954) fez o primeiro isolamento de ZIKV a partir de um paciente, no leste da Nigéria, o vírus foi isolado de uma menina de 10 anos que apresentava febre e dor de cabeça, apontando seu papel como possível patógeno de humanos.

Análises filogenéticas feitas com diferentes cepas indicam que o surgimento do vírus Zika ocorreu entre os anos de 1892 e 1943 em Uganda (Faye *et al*., 2014). Estudos revelam a existência de 3 principais linhagens do ZIKV, duas provenientes da África, subdivididas em África Ocidental e Oriental, e a da Ásia, sendo a última responsável pela maior parte das infecções ocorridas na África, na Ásia, no Pacífico e nas Américas (Faye *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2016).

1.4 Distribuição geográfica de ZIKV

Com base nos dados filogenéticos, acredita-se que o surgimento do ZIKV em Uganda tenha ocorrido por volta de 1920 (Faye *et al*., 2014). Desde o seu isolamento em 1947 (Dick, Kitchen & Haddow, 1952) na Floresta Zika, por aproximadamente 60 anos o ZIKV se manteve no eixo África-Ásia, com poucos relatos de casos em humanos. Sendo relatado pontualmente em países da África ocidental e da Ásia (Kindhauser *et al*., 2016).

Entre as décadas de 1960 a 1980 houveram vários relatos de infecções em humanos por ZIKV, com descrição de doença febril leve, nos continentes Africano e Asiático, em países como Tanzânia (1952), Nigéria (1954), República Centro-Africana, Senegal, Paquistão, Gabão, Indonésia, Malásia, Nigéria, Costa Rica e Camboja (entre os anos 1960-1983), entre outros (Olson *et al*., 1981; Faye *et al*., 2014; Kindhauser *et al*., 2016).

Em 2007, ocorreu o primeiro relato de surto substancial em humanos na Ilha de YAP (Estados Federados da Micronésia), esta foi a primeira notícia de ZIKV fora do eixo África-Ásia e ocorreu simultaneamente um surto no Gabão (2007), momento em que começou a ser considerado um vírus emergente (Duffy *et al*., 2009; Zanluca *et al*., 2015).

O primeiro caso de transmissão sexual documentado para ZIKV ocorrreu em 2008, nos Estados Unidos. Novos surtos foram relatados entre 2013 e 2014 na Polinésia Francesa, Ilha de Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia, desde então vários países do continente americano passaram a relatar casos de ZIKV e associação com complicações neurológicas (Lanciotti *et al*., 2008; Kindhauser *et al*., 2016; Shehu *et al*., 2018).

Em 2014, o ZIKV chegou nas Américas, foram identificados os primeiros casos em Pernambuco (Brasil), com o seguinte quadro: "pessoa com erupção cutânea com ou sem febre, de etiologia desconhecida e cujo perfil clínico não se encaixa nas suspeitas de dengue, sarampo ou rubéola". O vírus se espalhou para outros Estados da Federação e em 2015, o país notificou a doença febre zika à Organização Mundial de Saúde (OMS). Mais de 30 países e territórios nas Américas e em Cabo Verde (África Ocidental) também reportaram casos de ZIKV no período de 2015 a 2017. A associação de ZIKV com o aumento de casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré, leva a OMS a declarar o ZIKV como uma "Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional" em fevereiro de 2016 (Kindhauser *et al*., 2016; PAHO/WHO, 2017).

Nos últimos anos, foi observada uma extensa disseminação do ZIKV no globo, principalmente nos trópicos, onde seu vetor é bem adaptado (Lopes, Nozawa e Linhares, 2014). Até 2015 era registrada a circulação esporádica de ZIKV nos continentes Africano (Nigéria, Tanzânia, Egito, África Central, Serra Leoa, Gabão, Senegal, Costa do Marfim, Camarões, Etiópia, Quênia, Somália e Burkina Faso), Asiático (Malásia, Índia, Paquistão, Filipinas, Tailândia, Vietnã, Camboja, Índia, Indonésia) e na Oceania (Micronésia, Polinésia Francesa, Nova Caledônia/França e Ilhas Cook). Também houve a descrição de casos importados de febre Zika no Canadá, Alemanha, Itália, Japão, Estados Unidos, Austrália e Chile (Brasil, 2015). De janeiro de 2015 a janeiro 2018 mais de 800.000 casos de ZIKV foram relatados nas Américas, incluindo casos confirmados e suspeitos (PAHO/WHO, 2017).

1.4.1 Distribuição de ZIKV no Brasil

A primeira confirmação de transmissão autóctone de febre Zika no Brasil foi no Nordeste, no ano de 2015. Das 26 Unidades da Federação, 19 confirmaram laboratorialmente autoctonia da doença, até a semana epidemiológica nº 52 (Brasil, 2015).

Do terceiro trimestre de 2015 a fevereiro de 2016, pesquisadores brasileiros verificaram um grande aumento do número de notificações de bebês nascidos com microcefalia, nos mesmos locais onde ocorreram os primeiros relatos do ZIKV. Posteriormente, em retrospectiva, na Polinésia Francesa também foi verificado um aumento anômalo no número de bebês com anomalias fetais incluindo microcefalia após o surto do ZIKV em 2013 (Petersen *et al.*, 2016a).

Após 2015, houve um aumento no número de casos no Brasil, principalmente em 2016 quando um surto foi declarado no país, com maior incidência na região Centro-Oeste com 218,2/100 mil habitantes (hab.), de acordo com os dados fornecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) (Fig. 1). Nos anos seguintes (2017 e 2018) a incidência de casos /100 mil hab. decaiu de 216.207 casos prováveis, em 2016, para 17.594, em 2017, e 5.941 em 2018 (até a semana epidemiológica de nº 28), indicando uma provável a imunidade de rebanho adquirida pela população (Brasil, 2016a; Brasil, 2017a; Brasil, 2018).

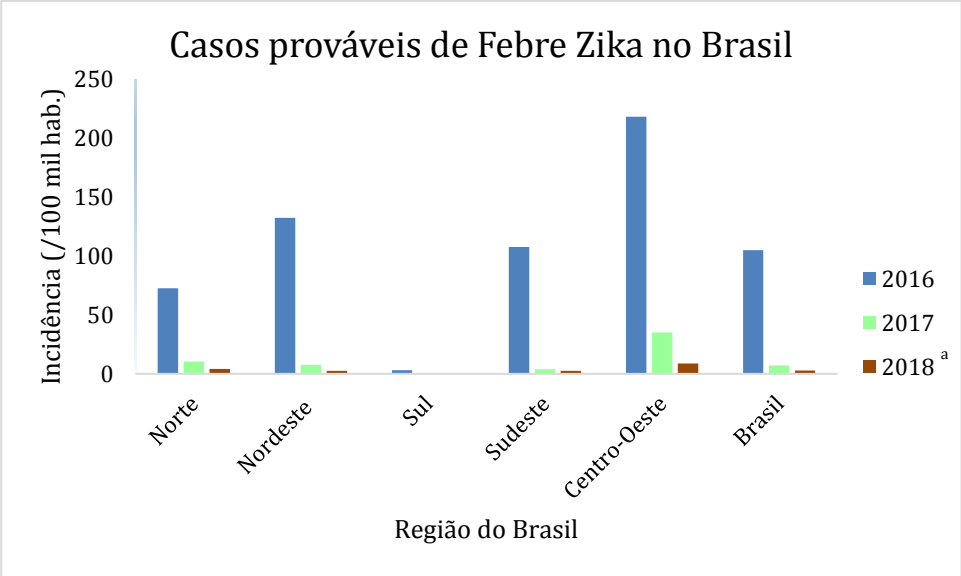


Figura 1: Incidência de casos de ZIKV/100 mil habitantes, por região do Brasil nos anos 2016, 2017 e 2018.
[a] - Incidência de Febre Zika, por região até a Semana Epidemiológica 28 de 2018, Brasil.
Fonte: Dados retirados do Ministério da Saúde, Brasil – (Brasil, 2016a; Brasil, 2017a; Brasil, 2018)

1.5 Manifestações clínicas

A infecção causada pelo ZIKV costuma ser assintomática (≈ 80%) (Duffy *et al.*, 2009; Ioos *et al*., 2014; Haddow & Woodall, 2016), esta infecção compartilha os mesmos sintomas de outras arboviroses como a dengue e a chikungunya. O tempo de incubação do ZIKV costuma ser de 3 a 4 dias, as manifestação de sintomas são leves e autolimitantes, duram entre 2 e 7 dias, com quadro de erupção cutânea, mialgia, febre leve, dor retro-orbital, artralgia, dor de cabeça, conjuntivite e artrite (Lanciotti *et al.*, 2008; Duffy *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2016; Haddow & Woodall, 2016; Brasil, 2017b). Poucos casos evoluem para quadros mais graves, requerendo hospitalização, desenvolvendo complicações, raramente chegando a óbito (Haddow & Woodall, 2016; Paixão *et al.*, 2016).

1.5.1 Complicações relacionadas ao ZIKV

A febre zika foi correlacionada em seus quadros mais graves às complicações neuropáticas, devido ao aumento do número de notificações, mais comumente descritas para esse vírus como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), na maioria das vezes manifestada em adultos, a microcefalia (em neonatos) e a síndrome congênita do Zika vírus, devido ao neurotropismo apresentado por este patógeno (Zanluca *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016).

1.5.1.1 Microcefalia

A OMS define a microcefalia como uma malformação cujo o bebê possui o perímetro cefálico menor do que o presumido para bebês do mesmo sexo e da mesma idade, podendo ser congênita ou adquirida. Seu diagnóstico é feito a partir da determinação da circunferência da cabeça do recém-nascido, essa medida vai ser usada para comparar com o padrão da população. O valor utilizado para determinar a microcefalia é menor de dois desvios-padrão (DP) abaixo da média e para a microcefalia grave o valor usado é menor que 3 DP abaixo da média nos recém-nascidos de mesma idade e sexo (CDC, 2016; WHO, 2018)

A microcefalia pode advir de fatores ambientais ou causas genéticas, em várias fases da gestação, geralmente a partir de distúrbios na proliferação e migração neuronal ou calcificações difusas (morte neuronal) (Nunes *et al*., 2016). Além dos danos no desenvolvimento neurológico, o crescimento dos componentes físicos do feto podem ser

afetados e gerar dismorfismos (microcefalias sindrômicas) (Nunes *et al*., 2016; Petersen *et al.*, 2016a).

Embora o contágio da gestante pelo ZIKV em qualquer trimestre da gestação traga riscos de desenvolvimento de complicações para o feto (Petersen *et al.*, 2016a), quanto mais próximo ao início da gravidez (1º trimestre) ocorrer a infecção, mais graves são as patologias desenvolvidas pela criança (Abushouk, Negida & Ahmed, 2016). Na maioria dos casos, as mulheres dão à luz a crianças com doenças cardíacas, oculares e neurológicas, onde o principal destaque é a microcefalia, fonte de grande preocupação. Sem tratamento específico, a microcefalia demanda inúmeros recursos devido a necessidade de programas específicos para o estímulo dessas crianças em seu desenvolvimento cognitivo, motor e neurológico, aconselhamento familiar (ensinar a cuidar da criança) e apoio psicológico aos pais (Petersen *et al.*, 2016a; WHO, 2018).

1.5.1.2 Síndrome de Guillain-Barré

A síndrome de Guillain-Barré vem sendo descrita em associação com flavivírus, dentre eles o ZIKV que começou a ser relacionado a essa síndrome através da associação do número de casos de SGB e a presença do vírus nos mesmos locais (Azevedo *et al.*, 2016; Brasil, 2016b; Dos Santos *et al.*, 2016)

A SGB pode ser estabelecida como o sistema nervoso periférico sendo atacado pelo sistema imune. Como consequência desse ataque, os nervos que controlam os movimentos musculares, as sensações de dor, temperatura e sensibilidade ao toque são afetados. Embora incomum, costuma acometer com mais frequência adultos, seguido do sexo masculino, contudo, pessoas de todas as faixas etárias podem ser acometidas. Com mais de uma origem possível, nem sempre é viável especificar a causa, mas a predominância dos casos ocorre por infecção viral (ex.: dengue), em menor fração por traumas, cirurgias e processos de imunizações (Azevedo *et al.*, 2016; WHO, 2016a; WHO, 2016b).

A SGB pode ser estabelecida como o sistema nervoso periférico sendo atacado pelo sistema imune. Como consequência desse ataque, os nervos que controlam os movimentos musculares, as sensações de dor, temperatura e sensibilidade ao toque são afetados. Embora incomum, costuma acometer com mais frequência adultos, seguido do sexo masculino, contudo, pessoas de todas as faixas etárias podem ser acometidas. Com mais de uma origem possível, nem sempre é viável especificar a causa, mas a predominância dos casos ocorre por

infecção viral (ex.: dengue), em menor fração por traumas, cirurgias e processos de imunizações (Azevedo *et al.*, 2016; WHO, 2016a; WHO, 2016b).

Os sintomas costumam durar apenas algumas semanas com recuperação sem descrição de sequelas neurológicas graves a longo prazo, apenas podendo o paciente permanecer com uma fraqueza posterior. Essa patologia é caracterizada por fraqueza e sensação de formigamento, com sintomas que normalmente começam pelos membros inferiores podendo se expandir para os superiores e a face. Essas manifestações podem chegar à paralisia dos braços, pernas ou músculos da face, em até 25% dos casos os músculos peitorais são afetados, levando a dificuldades respiratórias (Azevedo *et al.*, 2016; WHO, 2016a).

O diagnóstico é feito através dos sintomas, dos achados no exame neurológico que inclui diminuição ou perda dos reflexos mais profundos dos tendões e exame do fluido cefalorraquidiano (líquor) da medula espinhal através de punção lombar. Outras análises como exames de sangue também podem ser fundamentais para identificar a causa da síndrome. Sem cura conhecida, a melhor opção são os tratamentos que vão amenizar os sintomas e diminuir a duração, que incluem terapias imunológicas e cuidados de suporte (WHO, 2016a).

1.5.1.3 Síndrome congênita do Zika vírus

Outras manifestações com níveis de gravidade variável em neonatos expostos ao ZIKV durante a gestação também foram relatadas. Estas incluem desde malformações da cabeça, problemas de deglutição, convulsões, até anormalidades visuais e auditivas (CDC, 2018; WHO, 2018).

Esse padrão de anomalias congênitas entre os bebês infectados pelo ZIKV durante a gestação é nomeado de “Síndrome congênita do Zika vírus” que apresenta 5 principais características: 1- Microcefalia grave (colapso parcial do crânio), 2- Diminuição do tecido cerebral, o dano cerebral apresenta um padrão específico, 3- Danos no fundo do olho (ex.: cicatrização, alterações de pigmento, etc.), 4- Articulações com capacidade de movimentação limitada (ex.: pé torto) e 5- Movimento do corpo reduzido devido ao excesso de tônus muscular imediatamente após o nascimento (CDC, 2018; WHO, 2018).

1.6 Métodos de Diagnóstico

Para confirmar a infecção pelo ZIKV é feito o diagnóstico laboratorial principalmente por RT-PCR (PCR por transcrição reversa), considerado o padrão ouro para ZIKV, utilizando as amostras clínicas: sangue total, soro, plasma, urina, fluido cefalorraquidiano, fluido amniótico, sêmen e saliva para detecção de RNA viral. Para garantir a detecção do vírus, o ideal é que o material seja coletado até o 4º dia após o início dos sintomas. O período virêmico para o ZIKV ainda não foi determinado, mas está estimado em aproximadamente 7 dias após o início dos sintomas, e a detecção do vírus pode ser feita entre 4 e 7 dias. (Musso *et al.*, 2015; Brasil, 2017b; Koppolu & Raju, 2018; Shehu *et al*., 2018).

Ao longo do período da febre zika, além dos sintomas clínicos, alterações nas taxas metabólicas podem ser detectadas em exames laboratoriais em pessoas infectadas com ZIKV, incluindo trombocitopenia, leucopenia, aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios, assim como alteração dos níveis de lactato desidrogenase sérica, proteína C reativa, fibrinogênio, ferritina e gama-glutamil transferase (Chang *et al.*, 2016; Brasil; 2017b)

Apesar de extensamente utilizados os métodos sorológicos, de um modo geral, estes podem apresentar reconhecimento cruzado com outros arbovírus, sendo incapazes de diferenciar entre um indivíduo infectado pelo vírus e um que recebeu uma vacina anteriormente, como a da febre amarela. Os testes utilizados para diagnóstico são: ensaio de imunofluorescência (IFA) para detecção de anticorpos específicos, IgM e IgG do antígeno viral no soro do paciente, ELISA (ensaio de imunoadsorção enzimática), principalmente detecção de IgM para ZIKV e PRNT (teste de neutralização de redução de placa) para confirmação do resultado e para ser considerado positivo (infecção recente) para ZIKV o título deve ser >10 e <10 para os outros flavivírus testados. Para confirmação da doença a abordagem sorológica deve ter seu resultado confirmado por isolamento do vírus em culturas celulares (Ioos *et al.*, 2014; Brasil, 2017b; Chang *et al.*, 2017; Koppolu & Raju, 2018; Shehu *et al.*, 2018).

Não havendo outro arbovírus endêmico ou outro surto em curso, o diagnóstico pode ser feito a partir dos sintomas clínicos e com base no histórico recente de viagem do paciente, mas como normalmente os surtos de Zika estão relacionados com a co-circulação de outros arbovírus, isso torna a utilização de metodologias laboratoriais para o diagnóstico uma necessidade com o intuito de esclarecer a identidade do agente etiológico (Abushouk, Negida & Ahmed, 2016; WHO, 2016c).

O diagnóstico laboratorial é problemático, pois o período de viremia é curto e existe uma alta reatividade cruzada entre os flavivírus. Tanto nos métodos sorológicos (detecção de anticorpos) como nos moleculares (detecção do RNA viral), esses fatores vão dificultar a identificação do agente etiológico e seu isolamento (Cabral-Castro *et al.*, 2016; Haddow & Woodall, 2016).

1.7 Vias de Transmissão

A propagação do Zika vírus pela população acontece majoritariamente através da picada dos mosquitos do gênero *Aedes* infectados. Estes são muito bem distribuídos pelo globo, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais. Fora da África, a principal espécie vetor é o *Aedes aegypti*, também transmissor dos vírus da Dengue, da Febre Amarela e da Chikungunya (Grard *et al.*, 2014; Hills *et al.*, 2016; WHO, 2016c).

A transmissão vetorial do vírus ocorre por meio dos ciclos silvestre e urbano (Fig. 2). O mosquito vetor vai picar o animal reservatório, replicar o vírus e na próxima alimentação, quando picar outro animal não-infectado vai transmitir o vírus (ciclo silvestre). No momento em que o homem se aproxima do ambiente silvestre, o mosquito que se alimentou do sangue de um animal infectado vai picar o homem, e este ao retornar a área urbana vai ser picado por um mosquito não-infectado, estabelecendo o ciclo. O mosquito, agora infectado, replica o vírus e no ato do próximo repasto sanguíneo vai transmitir o vírus para outro homem (ciclo urbano) (Petersen *et al*., 2016a).

Devido ao grande número de casos relatados fora das áreas de distribuição geográfica dos vetores, outras vias de transmissão também foram descritas (Fig. 2), como a via de transmissão sexual, anal ou vaginal, transfusão de sangue, transplacentária e perinatal (durante o parto) e no período de amamentação (Musso *et al.*, 2015; Abushouk, Negida & Ahmed, 2016; Chang *et al.*, 2016; Haddow & Woodall, 2016; Hills *et al.*, 2016; WHO, 2016c).

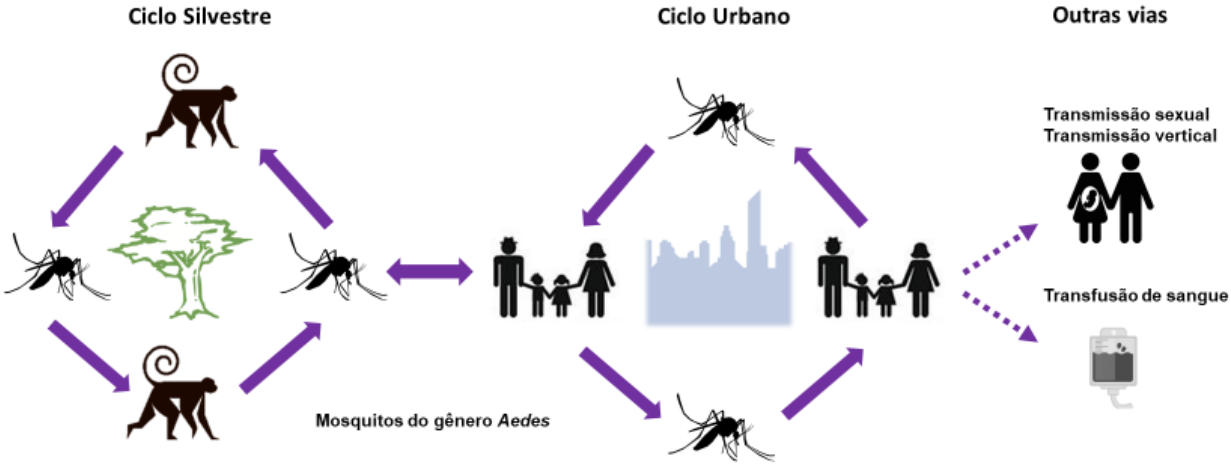


Figura 2: Vias de transmissão do vírus Zika: Ciclo silvestre e urbano e vias alternativas (elaboração própria).
Fonte: Baseado em dados da WHO, 2016 e Petersen *et al*., 2016a

A transmissão sexual está altamente relacionada com viagens, após o retorno de locais endêmicos (Fig. 3), os viajantes mantiveram relações sexuais com seus parceiros sem preservativos e os parceiros foram acometidos pela doença. O período no qual o contato sexual oferece risco de transmissão e quais os fatores de risco determinantes ainda não foram estabelecidos. (Hills *et al.*, 2016; Petersen *et al*., 2016a).

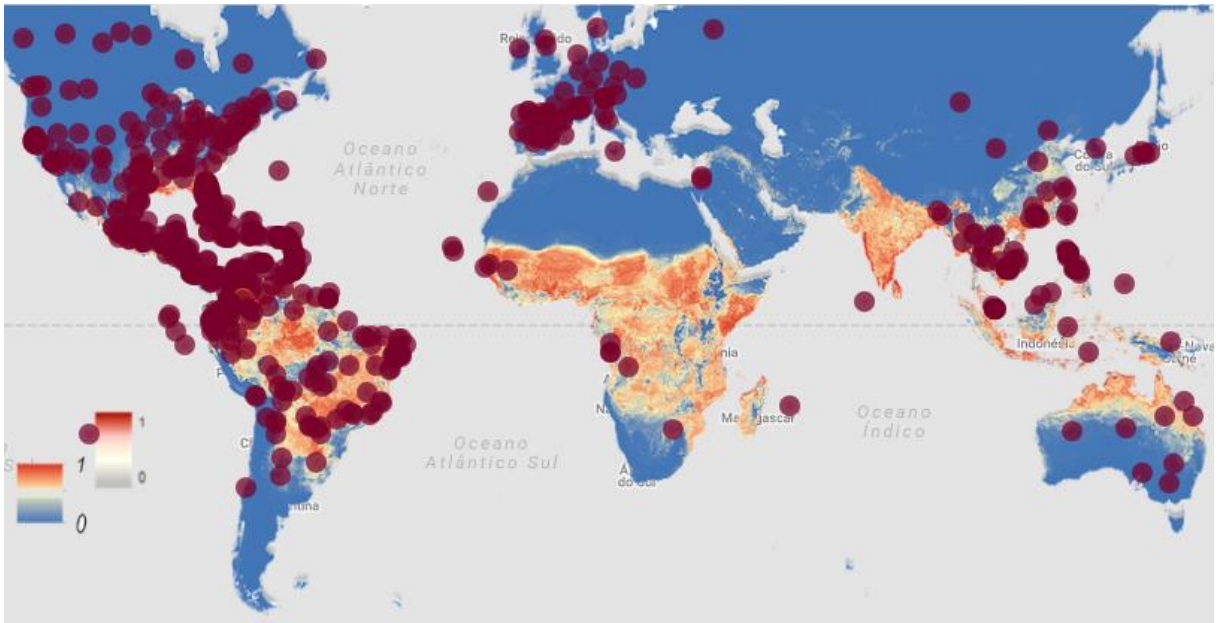


Figura 3: Mapa da incidência dos mosquitos *Aedes aegypti* no globo e a distribuição geográfica do relato de casos de febre zika até março de 2017. Áreas em azul: ausência de mosquitos; áreas em vermelho: maior população de mosquitos; círculos em vermelho escuro: áreas onde houve relatos de caso de febre zika.
Fonte: http://www.healthmap.org/zika/#timeline

1.8 Vetor do vírus

Os mosquitos do gênero *Aedes* são descritos como principais vetores de ZIKV, no entanto algumas das espécies dos gêneros *Culex, Mansonia, Anopheles* e *Eretmapodites,* também foram propostos como possíveis vetores para esse vírus (Chan *et al*., 2016; Braack *et al*., 2018).

De acordo com a literatura, o gênero *Aedes* demonstrou alta susceptibilidade a infecção por ZIKV *in vitro,* apresentando potencial de transmissão após um período de incubação extrínseco de 5-10 dias. Devido a distribuição mundial dos mosquitos *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), estes mosquitos foram considerados os vetores mais importantes no ciclo de transmissão urbana de ZIKV, fora da África (Grard *et al*., 2014; Chan *et al*., 2016; Braack *et al*., 2018).

Os reservatórios de ZIKV que mantêm o ciclo silvestre do vírus ainda não foram determinados, mas sabe-se que primatas não-humanos, como por exemplo a *Macaca mulatta, Cercopithecus aethiops, Colobus abyssinicus,* entre outros que integram o ciclo, bem como outros mamíferos são descritos como possíveis hospedeiros vertebrados de ZIKV na África e na Ásia, segundo os dados baseados evidências sorológicas e virológicas de infecção (Ioos *et al*., 2014; Chan *et al*., 2016; Braack *et al*., 2018).

O mosquito *Ae. aegypti* vem se apresentado como um grande vilão na saúde pública brasileira em função da transmissão de importantes arboviroses. Os mosquitos do gênero *Aedes* são holometábolos, seu ciclo de vida apresenta 4 estágios: ovo, larva (L1-L4), pupa e adultos, estes costumam se alimentar principalmente durante o dia. O repasto sanguíneo é hábito exclusivo das fêmeas sendo essencial para a ovogênese e os ovos apresentam certa resistência a dessecação, podendo persistir por mais de um ano no meio ambiente. A ocasião da alimentação com sangue, momento em que o mosquito faz a transmissão do ZIKV para o hospedeiro (Ooi *et al*., 2007; Petersen *et al*., 2016a; Kauffman & Kramer, 2017).

As fêmeas de *Ae. aegypti* tem sua alimentação muito adaptada em humanos, fazendo várias refeições ao dia, potencializando a transmissão do vírus. Enquanto as fêmeas de *Ae. albopictus*, são mais regradas quanto ao número de alimentações que ocorre a cada ciclo gonotrófico, dado que está espécie só se alimenta uma vez, podendo se alimentar de animais domésticos, mamíferos e humanos, reduzindo as chances de transmitir o ZIKV (Kauffman & Kramer, 2017).

1.9 Tratamento

Devido à ausência de tratamento específico para a febre zika como antivirais, fato comum aos flavivírus. O tratamento é feito de forma a combater os sintomas que inclui repouso, reposição de líquidos e medicamentos como analgésicos e anti-térmicos. Para os casos de febre e dor, o indicado é acetaminofeno (paracetamol) ou dipirona, sendo contraindicado ácido acetilsalicílico (AAS) e outros anti-inflamatórios e para as erupções cutâneas são indicados anti-histamínicos (Brasil, 2017b; Petersen *et al*., 2016a; WHO, 2016c).

Vários fármacos e medicamentos já foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) com diversos alvos e estão sendo testados como possíveis candidatos de antivirais para ZIKV com resultados promissores (Koppolu & Raju, 2018).

1.10 Controle e Prevenção

Apesar de vários estudos em andamento, ainda não há uma vacina para a febre zika (Richner & Diamond, 2018). Então a prevenção deve ser feita através de medidas anti-vetoriais com foco na proteção individual, como: prevenção de picadas de mosquitos que inclui o uso de repelentes, de mosquiteiros e de telas nas janelas, eliminação os criadouros do mosquito, bem com o uso de preservativos, para evitar a transmissão sexual e o controle dos bancos de sangue. Também devendo ser evitadas viagens para locais endêmicos do vírus, se possível (Lequime & Lambrechts, 2014; Petersen *et al.*, 2016a).

Para controlar a disseminação da doença, o método mais eficiente é através do controle do vetor. Este envolve estratégias integradas que vão desde programas de conscientização sobre a importância de se combater o mosquito vetor (Brasil, 2017b), destruindo criadouros, administrando larvicidas e inseticidas químicos, não sendo estes últimos muito efetivos para o controle, uma vez que várias populações de mosquito que já se encontram resistentes a diversos inseticidas químicos (Petersen *et al*., 2016a).

Um método alternativo para controlar do vetor é a estratégia que utiliza a bactéria *Wolbachia pipientis* para restringir a transmissão de arbovírus. Fêmeas de mosquitos *Ae. aegypti* são infectadas com *Wolbachia,* está é transmitida da mãe para a prole (auto-sustentação), reduzindo a viabilidade do mosquito e a capacidade de transmitir patógenos (Schultz, Connor & Frydman, 2018). Fatores ambientais, como a mudança climática e as ações suscitadas pelo homem, resultaram em grandes impactos econômicos e sociais: aumento das áreas urbanas, migração populacional e condições insalubres de higiene,

acúmulo de vários Esses fatores favorecem a amplificação e transmissão viral, resultando nos surtos de Zika vírus lhe dando potencial pandêmico. (Figueiredo, 2007; Lopes, Nozawa & Linhares, 2014).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer um protocolo para detecção molecular do vírus Zika em amostras clínicas humanas com iniciadores específicos, que tem como alvo a região C-prM do genoma, empregando os métodos de PCR convencional e PCR quantitativo por SYBR Green.

2.2 Objetivos específicos:

- Desenhar iniciadores específicos para o ZIKV que possam ser usados paralelamente em PCR convencional e PCR quantitativo;
- Determinar o nível de especificidade dos iniciadores desenhados por biologia computacional;
- Validar os iniciadores desenhados para detecção específica de ZIKV em amostras clínicas de pacientes como uma ferramenta de diagnóstico molecular utilizando os métodos de PCR convencional;
- Sequenciar amostras que se apresentaram como positivas para o ZIKV na técnica de PCR convencional;
- Quantificar as amostras detectadas no ensaio de PCR quantitativo por SYBR Green utilizando como padrão o plasmídeo de ZIKV;

3. Material e Métodos

3.1 Coleta de amostras

Amostras de saliva e urina de humanos, de ambos os sexos e idade entre 15 e 40 anos foram coletadas durante o surto de ZIKV nos anos de 2015, 2016 e 2017, seguindo as normas estabelecidas pelo comitê de ética em experimentação humana (protocolo de ética: 80709 HUCFF/FM/UFRJ), estas foram armazenadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL (Corning) a -20 °C, para posteriores análises moleculares.

3.2 Preparação dos vírus

Para este trabalho foram utilizados os vírus ZIKV, YFV, DENV1-4, vírus Chikungunya (CHIKV), vírus Sindbis (SINV) e vírus Mayaro (MAYV). Os vírus listados foram propagados em células epiteliais de rim de macaco verde africano (Células Vero) (multiplicidade de infecção - MOI = 0,02). As células inicialmente foram cultivadas em frascos plásticos (TPP) de 25 cm^2, posteriormente uma passagem no sistema de garrafa roladora de 750 cm^2, sendo incubadas a 37 °C por 7 dias ou até a visualização do efeito citopático (CPE). O sobrenadante de cada garrafa infectada com os vírus foi coletado, centrifugado para retirar os restos celulares e armazenado a -80 °C, para uso posterior. Em sequência, a partir desses sobrenadantes os vírus foram titulados utilizando o método da placa (Putnak *et al*., 1996) com modificações, o cultivo celular foi feito a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen), suplementado com soro fetal bovino a 2,5% (Gibco - Invitrogen) e 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/. Estreptomicina (Putnak *et al.*, 1996). Os vírus: YFV, DENV1-4, CHIKV, SINV e MAYV foram utilizados para os padrões negativos e a amostra de ZIKV como padrão positivo como *Template* nos PCR convencional e quantitativo por SYBR Green (ver itens 3.7 e 3.8).

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras clínicas e dos vírus foi extraído a partir de 200 µL dos sobrenadantes virais e das amostras clínicas coletadas (salivas e urinas), utilizando o método do TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 25 µL de água livre de nuclease (GE Healthcare – Hyclone, Utah, EUA).

A concentração de mRNA foi estimada a 260 nm (Lee & Schmittgen, 2006) usando o espectrofotômetro UV-1800 (UV-Visible Spectrophotometer, SHIMADZU, Kyoto, Japão).

Em seguida, para a síntese do cDNA, primeiro foi feito o tratamento do RNA com DNase, incubação de 8 μL da amostra de RNA viral, 1 μL de tampão 10x DNase I e 1 U DNase livre de RNase (Fermentas, Burling, Canadá) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi incubado com a enzima durante 30 min a 37 °C, a ação da enzima foi interrompida com 1 μL de EDTA 50 nmol a 65 °C durante 10 min. Foi feito o tratamento de DNase, o próximo passo foi sintetizar os cDNAs a partir do mRNAs obtidos na etapa anterior, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Por fim, a concentração dos cDNAs foi determinada a 260 nm (Lee & Schmittgen, 2006) usando o espectrofotômetro UV-1800 (UV-Visible Spectrophotometer, SHIMADZU, Kyoto, Japão).

3.4 Alinhamento de sequências em banco de dados (BLASTn)

As sequências de nucleotídeos utilizadas neste trabalho que foram obtidas no banco de dados do NCBI utilizando o programa BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). As sequências foram alinhadas com o auxílio da ferramenta Multiple Sequence Alignment do Programa CLUSTALW (http://www.genome.jp/tools/clustalw/). As sequências virais escolhidas para esse alinhamento e seus números de acesso são: DENV-1 (Hawaii) (KM204119.1), DENV-2 (16681) (KU725663.1), DENV-3 (H87) (KU050695.1), DENV-4 (H241) (KR011349.2), JEV (Sa14-14-2) (MH258852.1), SLEV (MSI-7) (DQ359217.1), WNV (NY99) (DQ211652.1), YFV (17D) (JN811140.1) e ZIKV (MR766) (AY632535.2).

3.5 Desenho dos iniciadores

Para desenhar os iniciadores foram utilizadas sequências de cDNA representativas do NCBI de cada vírus, o alinhamento foi feito (ver item 3.4 – dado não apresentado). A partir desse alinhamento foram selecionadas as sequências que apresentaram maior grau de similaridade, o segundo passo foi realizar um novo alinhamento com os vírus DENV1-4 e ZIKV (Fig. 6). Com base no segundo alinhamento, o desenho dos iniciadores comuns à DENV1-4 e ZIKV e específicos para ZIKV foram desenhados na região C-prM similar ao descrito pelos grupos Lanciotti *et al*. (1992), Chien *et al*. (2006) e Salles *et al.* (2017) (Tab. 1). Adotando os procedimentos descritos por Thornton & Basu (2011), foi selecionada a área

do alinhamento de DENV1-4 e ZIKV mais adequada ao desenho dos iniciadores específicos para ZIKV.

Tabela 1: Iniciadores para a região alvo C-prM utilizados ne metodologia de *hemi-nested* PCR

Nome do Iniciador	Sequência (5´-3´)	Tamanho (b)	Senso	Alvo	%CG
GTZK-F	GTGTAAACCCCTTGGGAGGTTT	22	F	Zika	50
GTZK-R	CAGTGATGGCTTGATTGCTGTAAAT	25	R	Zika	40
STZK-R	AAGTTGGTAGCAAAGGAGATGGC	23	R	Zika	48
mD1-F[a]	TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCG	28	F	Denv-All	46

[a] - Chien *et al*., 2006

3.5.1 Biologia computacional

Para verificar o reconhecimento pelo par iniciador GTZK-F/STZK-R das sequências de vírus ZIKV na região C-prM, primeiro foi feita uma pesquisa no banco de dados NCBI usando as palavras-chaves: *"Zika vírus" [porgn: _txid64320] AND genome NOT partial NOT nearl"*. Foram encontradas 1.123 sequências genômicas completas do ZIKV. Essas sequências foram salvas em um arquivo chamado *"zika_genomes.fasta".* No segundo passo, foi utilizada a ferramenta *Primer Search Emboss Tool* para procurar as sequências de ZIKV na base de dados de cDNA (*zika genomes.fasta*) com correspondência ao conjunto de iniciadores específico GTZK-F/STZK-R para ZIKV. Foi atribuído no programa os pecentuiais de erro de 10, 20, 30 e 40 % para os testes.

3.6 Plasmídeo sintético de ZIKV e clonagem do vírus em pGEM®-T Easy Vector System

Foi contruído um plasmídeo sintético comercial para o ZIKV de 815 pb (Epoch Life Science) a ser utilizado como controle positivo das técnica de PCR convencional e quantitativo (ver item 3.7). O material viral amplificado com iniciadores GTZK-F/STZK-R e com a enzima GoTaq® DNA polymerase (Promega), a partir de amostras de saliva e urina, foi introduzido no vetor de clonagem pGEM®-T *Easy Vector Systemns* (Fig. 4), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida a bactéria *Escherichia coli* cepa DH5-α foi transformada com o vetor de clonagem contendo o inserto viral através de choque térmico, seguindo o seguinte protocolo: Icubação do vetor de clonagem contendo o inserto e a bactéria por 30 min

a 4 °C, seguido de 90 seg a 42 °C, em seguida, 10 min a 4 °C. A seguir, foi adicionado 800µL de Caldo Luria-Bertani (LB) (Sigma-aldrich, St. Louis, EUA) para o crescimento da cultura de bactéria e incubada no Shaker (incubadora refrigerada com agitação TE-424 Tecnal, Piracicaba, Brasil) por 1 hora a 37 °C sob agitação de 120 rotações por minuto (rpm). Após essa incubação, a suspenção bacteriana foi semeada em LB sólido e incubada a 37 °C, overnight. As colônias que cresceram foram rastreadas quanto a presença do plasmídeo por PCR de colônias, utilizando os iniciadores GTZK-F/STZK-R, as colônias positivas foram então cultivadas em caldo LB adicionado de 100 µg/mL de ampicilina a 37 ºC, overnight (modificado de Figueira-Mansur et al., 2013). Em seguida os plasmídeos foram extraídos pelo Plasmid Miniprep Kit: QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante, após a extração dos plasmídeos foi feita a quantificação estimada a 260 nm (Lee & Schmittgen, 2006) usando o espectrofotômetro UV-1800 (UV-Visible Spectrophotometer, SHIMADZU, Kyoto, Japão).

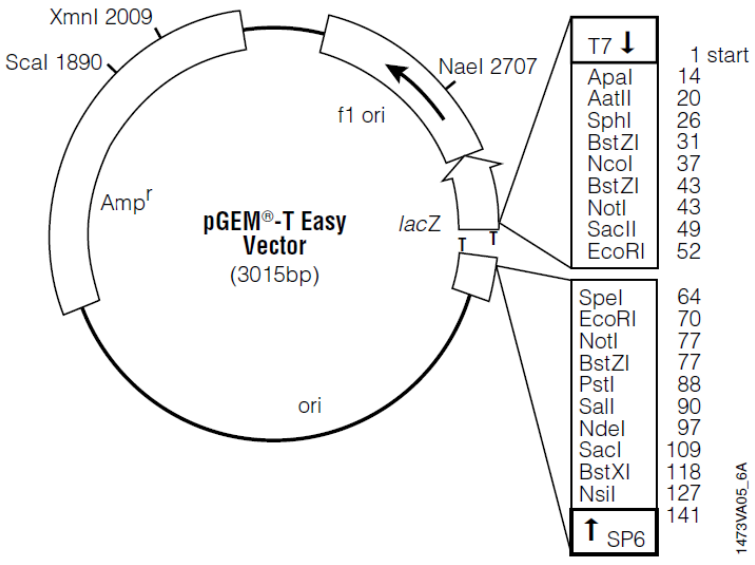


Figura 4: Mapa do plasmídeo vetor pGEM®-T *Easy Vector Systems*

3.7 PCR convencional

A detecção de ZIKV por *hemi-nested* PCR compreende duas reações de amplificação da sequência alvo, semelhante à descrita pelos grupos Lanciotti *et al*. (1992), Chien *et al*. (2006) e Salles *et al.* (2017). Na primeira reação, adicionou-se à mistura reacional de 20 µL contendo 1 µL de cDNA, 50 nmol de $MgCl_2$, 50 nmol dos iniciadores específicos mD1-F e STZK-R (para detecção geral dos DENVs e ZIKV) e reagentes do kit Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A amplificação envolveu o protocolo do termociclador que segue: 98 °C por 3 min, 35 ciclos de 98 °C por 10 seg, 54 °C por 10 seg, 72 °C por 30 seg e 72 °C por 10 min no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Na segunda reação foi utilizado o kit Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) com 1 µL do produto da reação acima e 50 nmol do par de iniciadores GTZK-F/STZK-R para detecção de ZIKV, com o volume de reação de 20 µL. A amplificação no termociclador envolveu os seguintes passos: 98 °C por 3 min, 25 ciclos de 98 °C por 10 seg, 54 °C por 10 seg, 72 °C por 30 seg e 72 °C por 10 min no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após cada amplificação, uma alíquota de 5 µL de cada produto gerado nas duas reações foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a presença do ZIKV foi determinada pela amplificação de tamanho específico tal como apresentado nos resultados (Tab. 2).

3.8 PCR quantitativo (qPCR)

Para realizar a metodologia de qPCR foram utilizados os cDNAs dos vírus ZIKV, YFV, DENV1-4, CHIKV, SINV e MAYV (ver item 3.3), sendo utilizado o par de iniciadores que amplifica a região C-prM do Zika vírus (GTZK-F e STZK-R). Nesse protocolo foi utilizada a enzima SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), seguindo as instruções e a análise posterior da amplificação recomendada pelo fabricante. Em cada poço da placa de qPCR foi utilizado o volume de 15 µL de meio reacional, combinando 5 µL de cDNA, aos 10 µL do mix de 400 nmol de iniciadores com SYBR Green. A amplificação no termociclador envolveu os seguintes passos: 98 °C por 3 min, 40 ciclos de 98 °C por 10 seg., 54 °C por 15 seg., 72 °C por 30 seg., utilizando o instrumento StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Devido ao intercalante SYBR Green poder interagir de forma

inespecífica com a dupla fita de DNA durante o PCR, a análise da curva de *melting* foi feita após a amplificação para confirmar a identidade do produto amplificado e a temperatura de *melting* (*Tm*) (Morrison, *et al.*, 1999). A análise da curva de *Tm* incluída no qPCR segue os seguintes passos: um ciclo de desnaturação a 65 °C por 5 seg., seguido de uma rampa de 95 °C a uma velocidade de 0,5 °C/10 seg. com medições contínuas de fluorescência.

3.8.1 Análise de dados (quantificação absoluta)

Após a amplificação do material viral proveniente do qPCR por ensaio de SYBR Green, utilizando os equipamentos StepOne plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) ou CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Foi feita a aquisição dos dados da curva padrão com as amostras positivas do cDNA de ZIKV a partir de cultura de células e o plasmídeo comercial de ZIKV, contendo o número de cópias expresso pela fórmula: **Nº de cópias = [DNA(g/µL) x 6,022 x 10^{23} (pb/mol)] / lenght(pb) x 660 (g/mol)]**, descrito no *Tutorials Applied Biosystems* (http://www.appliedbiosystems.com/suport/tutorials/pdf/quant_pcr.pdf) correlacionando com o número de cópias obtido por quantificação versus os valores de *Cycle Threshold* (CT), para isso os valores de CT foram exportados para uma planilha do *Microsoft Excel*. O cDNA alvo das amostras ou o número de cópias do plasmídeo comercial estão inversamente relacionados (Dhar *et al*., 2002). A curva de calibração feita com as diluições seriadas a partir do plasmídeo, a qual foi correlacionada com os valores de CT. Estes valores de CT foram então utilizados para quantificar o material genético tanto das amostras de cDNA de vírus, a partir de células Vero, quanto a presença de ZIKV nas amostras de cDNA de saliva, relacionando o número de cópias de ZIKV presente no cDNA ao valor de CT. Os valores de CT das diluições em série do cDNA e do plasmídeo foram utilizados para uma análise por regressão desses valores, para determinar a eficiência de amplificação e sensibilidade da técnica, através da fórmula: **eficiência = $10^{(-1/slope)}$ -1** descrito no *Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) Guidelines* (Bustin *et al*., 2009).

3.9 Sequenciamento

O RNA total foi extraído a partir das amostras de saliva e urina coletadas como descrito no item 3.1, os cDNAs produzidos e utilizados para amplificação e geração de produto por PCR com os iniciadores GTZK-F/STZK-R para detectar o ZIKV. O produto foi

recortado do gel de agarose 1,5% e então purificado utilizando o QIAquick gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), o produto clonado (ver item III.4) e purificado foi adicionado com o iniciador GTZK-F e com o iniciador STZK-R, separadamente. Em seguida esses produtos foram enviados para sequenciamento com o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction e o aparelho ABI PRISM DNA Analyzer 3730 (Applied Biosystems, EUA) da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ (Otto *et al.*, 2008). A partir da sequência de nucleotídeos resultantes desse sequenciamento, esta foi submetida ao programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn) - NCBI – NIH para sua identificação.

A seguir apresento um fluxograma resumindo o passo a passo da metodologia utilizada neste estudo para melhor entendimento dos processos seguidos para validação da estratégia proposta (Fig. 5).

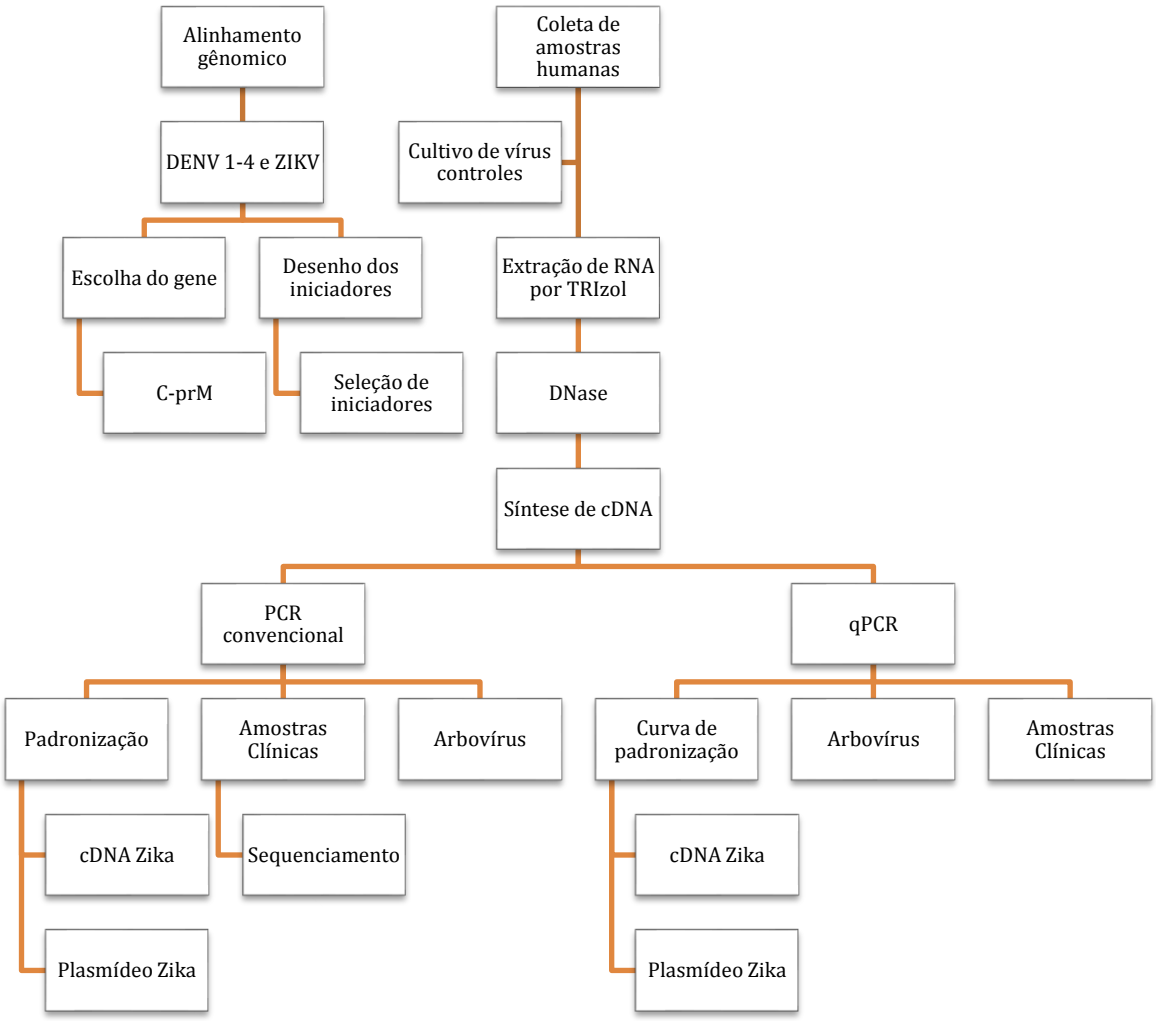


Figura 5: Fluxograma: Metodologia utilizada no estudo

4. Resultados

Na Figura 6, pode ser observado o alinhamento feito com as sequências nucleotídicas representativas dos DENV1-4 e do ZIKV obtidas no NCBI, conforme descrito no Material e Métodos, na região genômica C-prM desses vírus, os iniciadores selecionados para este trabalho estão destacados na figura abaixo, sendo o par mD1-F/GTZK-R, que corresponde a um produto de PCR amplificado com MM estimada em 152 pb, o par GTZK-F/STZK-R que gera um produto de PCR amplificado com MM estimada 386 pb, sendo esses os pares específicos de ZIKV utilizados na segunda reação de PCR convencional e o par mD1-F/STZK-R, usado na primeira reação da técnica *hemi-nested* PCR, produto de PCR amplificado com MM estimada em 415 pb.

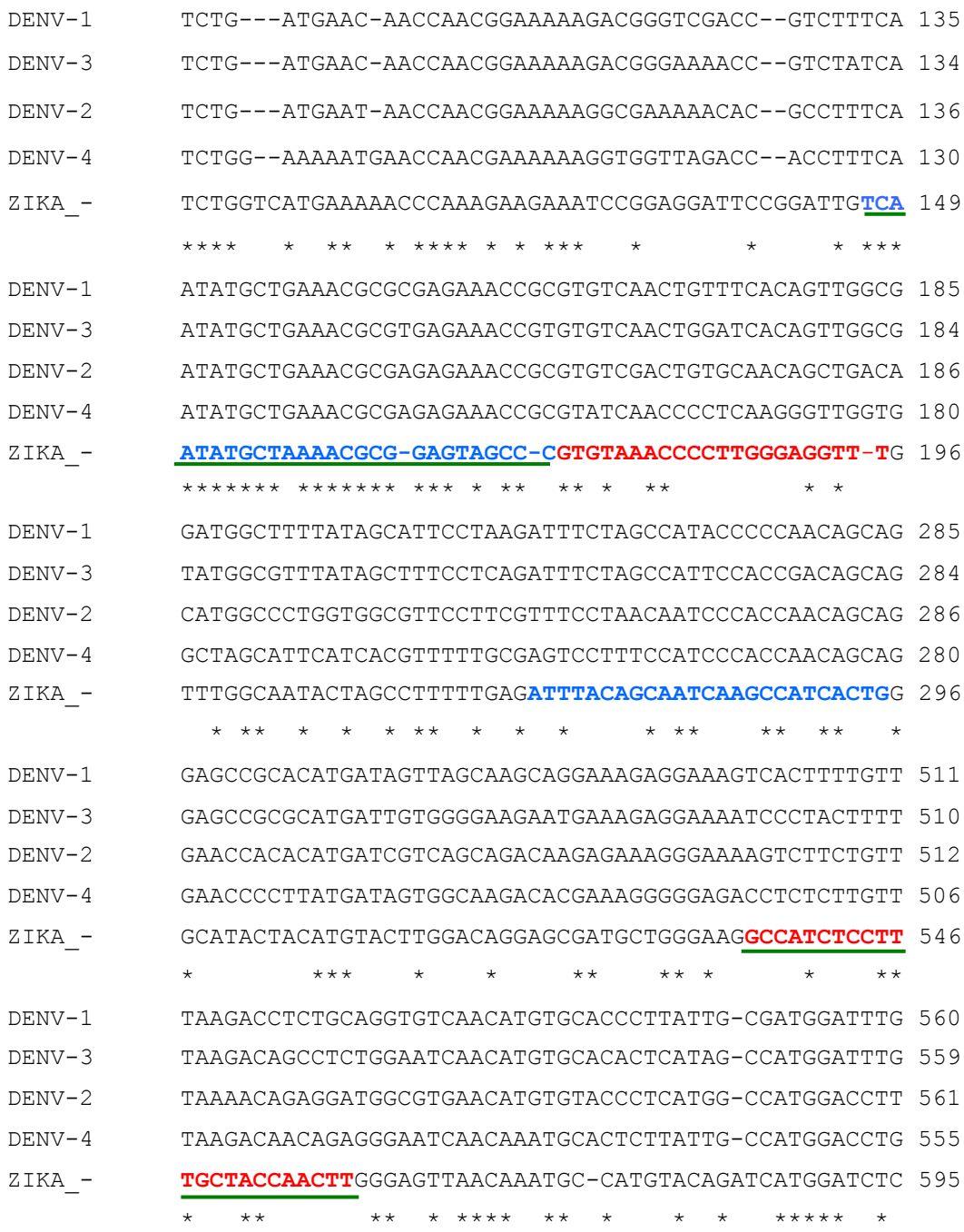


Figura 6: Alinhamento das sequências representativas da região C-prM dos sorotipos do vírus da Dengue 1-4 e do vírus Zika feito com o programa BLASTn; destacado em azul o par de iniciadores mD1-F/GTZK-R, em vermelho os iniciadores GTZK-F/STZK-R e em verde o par de iniciadores mD1-F/STZK-R utilizado na primeira reação da técnica *hemi-nested* PCR.

Em seguida, os pares de iniciadores anteriormente selecionados na região C-prM, foram avaliados na amplificação de produtos virais utilizando a técnica de PCR convencional. Na tabela 2, pode ser observado que o par de iniciadores mD1-F/STZK-R foi capaz de amplificar um fragmento de PCR com MM de 415 pb, o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R amplificou um fragmento com MM de 386 pb e o par de iniciadores mD1-F/GTZK-R um fragmento de MM de 152 pb em amostras controles positivas de cDNA de ZIKV, proveniente de células Vero e do plasmídeo sintético de ZIKV, todos os produtos amplificados estavam com a MM esperada considerando o alinhamento (Fig. 6). Os 3 pares de iniciadores também foram testados, por técnica de PCR convencional, com cDNAs dos 4 sorotipos da dengue, como controles negativos, nenhum par foi capaz de gerar produto amplificado (Tab. 2).

Tabela 2: Amplificação de material viral com iniciadores desenhados na região C-prM do ZIKV em PCR convencional.

Par de iniciadores	Tamanho do fragmento (pb)	MM	Imagem
mD1-F/STZK-R	415	500 400	
GTZK-F/STZK-R	386	400 300	
mD1-F/GTZK-R	152	200 100	

MM- Massa Molecular; B- Branco; D1- vírus da Dengue 1; D2- vírus da Dengue 2; D3- vírus da Dengue 3; D4- vírus da Dengue 4; CZ - cDNA de ZIKV e PZ - Plasmídeo sintético de ZIKV.

A seguir, foi verificado a especificidade dos 2 pares de iniciadores, mD1-F/GTZK-R e GTZK-F/STZK-R em detectar material viral, na amostra controle de cDNA de ZIKV no ensaio de qPCR com SYBR Green. A Fig. 7 mostra a curva de *Melting*, capturada do equipamento de qPCR (Applied), do par de iniciadores mD1-F/GTZK-R com diluições seriadas do cDNA de ZIKV. Pode ser observado a presença de 3 picos, um pico em 73,5 °C, outro pico em 83,5 °C e um terceiro pico em 87,3 °C, correspondentes a diferentes temperaturas de *Melting*. Este resultado indica a formação e detecção de produtos virais inespecíficos, caracterizados por 2 picos de temperaturas de *Melting*, além do pico do gene de interesse ZIKV, fazendo com que este conjunto de iniciadores fosse descartado para as próximas fases do estudo. O outro par de iniciadores foi testado e aprovado e será discutido a seguir.

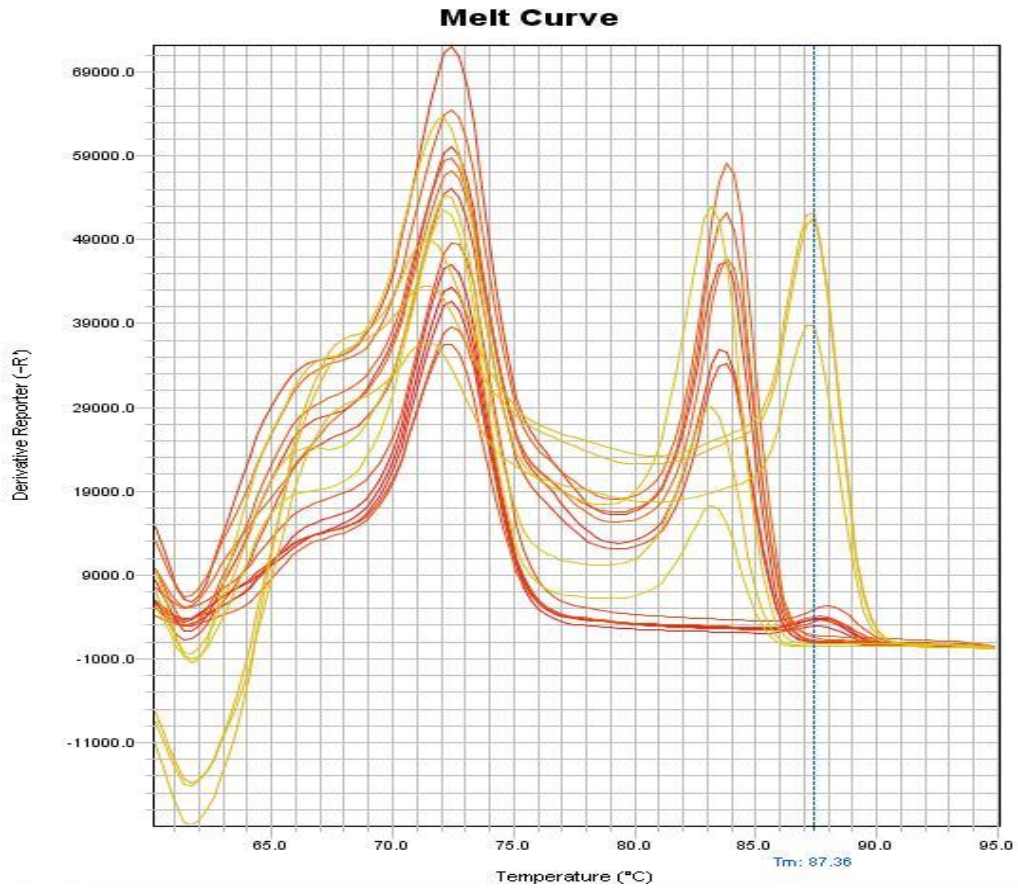


Figura 7: Imagem representativa da Curva de *Melting* de amostras de cDNA de ZIKV, diluição seriada, para padronização com o par de iniciadores mD1-F/GTZK-R em ensaio de qPCR com SYBR Green.

Para dar continuidade ao estudo, foi feita a análise por biologia computacional do outro conjunto de iniciadores específico para detecção de ZIKV, o par GTZK-F/STZK-R. Este par foi submetido a análise de biologia computacional, pelo Programa *Primer Search Emboss Tool*, para obter o grau de especificidade destes iniciadores no reconhecimento das sequências completas de ZIKV, 1.123 sequências estavam depositadas no banco de dados do NCBI no momento da análise. Como resultado, mesmo considerando um erro na ordem de 30%, o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R foi capaz de identificar todas as sequências de ZIKV depositadas no NCBI. Pode ser observado na Figura 8, a representação de incompatibilidade das sequências dos iniciadores com as sequências depositadas de ZIKV, que apresentaram *mismatches* com as sequências ZIKV do banco, só ocorre a partir do valor de erro de 40%.

```
Primer name ZIK
Amplimer 1
        Sequence: KX087102.2
        Zika virus strain ZIKV/Homo sapiens/COL/FLR/2015, complete genome
        CGTGTAAACCCCTTGGGAGGTTTG hits forward strand at 8634 with 9 mismatches
        AGGCCATCTCCTTTGCTACCAACTTG hits reverse strand at [1939] with 9 mismatches
        Amplimer length: 219 bp
Amplimer 2
        Sequence: KX087102.2
        Zika virus strain ZIKV/Homo sapiens/COL/FLR/2015, complete genome
        CGTGTAAACCCCTTGGGAGGTTTG hits forward strand at 157 with 5 mismatches
        AGGCCATCTCCTTTGCTACCAACTTG hits reverse strand at [6576] with 10 mismatches
        Amplimer length: 4059 bp
Amplimer 3
        Sequence: KX087102.2
        Zika virus strain ZIKV/Homo sapiens/COL/FLR/2015, complete genome
        CGTGTAAACCCCTTGGGAGGTTTG hits forward strand at 157 with 5 mismatches
        AGGCCATCTCCTTTGCTACCAACTTG hits reverse strand at [6140] with 10 mismatches
        Amplimer length: 4495 bp
Amplimer 4
        Sequence: KX087102.2
        Zika virus strain ZIKV/Homo sapiens/COL/FLR/2015, complete genome
        CGTGTAAACCCCTTGGGAGGTTTG hits forward strand at 157 with 5 mismatches
        AGGCCATCTCCTTTGCTACCAACTTG hits reverse strand at [3118] with 10 mismatches
        Amplimer length: 7517 bp
```

Figura 8: Figura representativa dos quadros de *Mismatches*, gerados com erro acima de 40%, no programa *Primer Search Emboss Tool* para as 1.123 sequências completas de ZIKV com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R.

Em sequência, os iniciadores GTZK-F/STZK-R foram testados com cDNA de outros arbovírus por PCR convencional. Os iniciadores apresentaram especificidade para ZIKV, sendo capaz de amplificar produtos virais apenas nas amostras controle positivas de cDNA, proveniente de células Vero, e do plasmídeo sintético de ZIKV, nenhum produto de PCR foi amplificado, na reação, com a utilização de cDNA de YFV, MAYV, SINV e CHIKV (Fig. 9).

Figura 9: Ensaio de PCR convencional com cDNA de arbovírus das famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R; MM: massa molecular; B: branco; Arbovírus testados: Vírus da Febre Amarela (YFV), Vírus Mayaro (MAYV), Vírus Sindbis (SINV) e Vírus Chikungunya (CHIKV), como controles positivos foram usados plasmídeo sintético de ZIKV (PZ) e cDNA de ZIKV (CZ).

O próximo passo foi a validação dos iniciadores GTZK-F/STZK-R, em ensaio de PCR convencional, com um painel de cDNA provenientes de amostras clínicas humanas (amostras de urina: 5 e amostras de saliva: 14), com os controles positivos, cDNA e plasmídeo sintético de ZIKV. Os resultados são apresentados na tabela 3 e na figura 10. Das 19 amostras testadas, 15 amostras foram positivas, amplificaram produtos virais de ZIKV, após a técnica de *hemi-nested* PCR com os pares de iniciadores mD1-F/STZK-R, 1ª reação (dado não apresentado) e o par de iniciador GTZK-F/STZK-R (2ª reação) (Fig. 10).

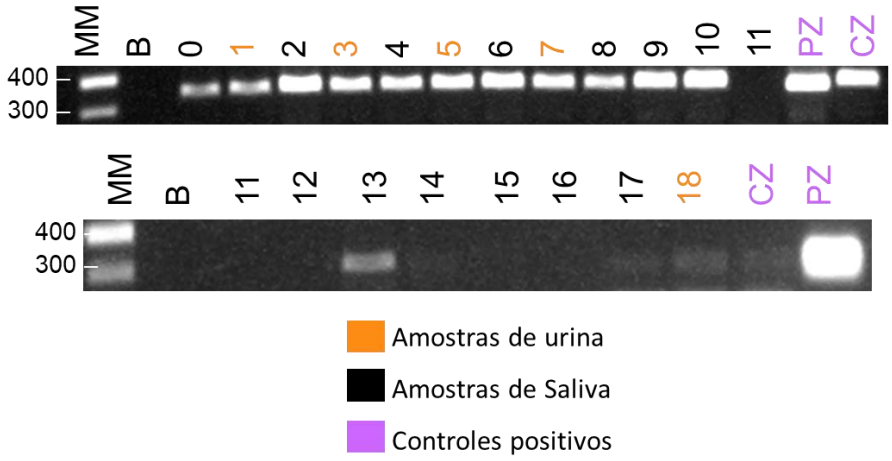


Figura 10: Gel de agarose da 2ª reação da Técnica de *hemi-nested* PCR com cDNA de amostras clínicas de saliva e urina, produtos amplificados com os par de iniciadores GTZK-F/STZK-R; amostras de urina realçadas em cor laranja, amostras de saliva em preto e controles positivos realçados em roxo, como controles positivos foram utilizados plasmídeo sintético de ZIKV e cDNA de ZIKV.

Tabela 3: Resultado da PCR convencional do painel de amostras clínicas humanas com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R específico para região C-prM de Zika vírus.

Nº da Amostra	Tipo de amostra clínica humana	Positivo / Negativo
0	Saliva	Positivo
1	Urina	Positivo
2	Saliva	Positivo
3	Urina	Positivo
4	Saliva	Positivo
5	Urina	Positivo
6	Saliva	Positivo
7	Urina	Positivo
8	Saliva	Positivo
9	Saliva	Positivo
10	Saliva	Positivo
11	Saliva	Negativo
12	Saliva	Negativo
13	Saliva	Positivo
14	Saliva	Positivo
15	Saliva	Negativo
16	Saliva	Negativo
17	Saliva	Positivo
18	Urina	Positivo

Com os resultados positivos do painel de amostras clínicas (Fig. 10 e Tab. 3), duas amostras, uma de saliva e outra de urina do mesmo paciente (amostras 5 e 6) foram escolhidas para sequenciamento, a fim de confirmar a identidade do material viral amplificado na reação de PCR convencional. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGEM®-T *Easy Vector System* como descrito em Material e Métodos. Os clones serviram de molde para uma reação de PCR convencional com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. O material amplificado foi submetido ao gel de agarose 1,5 %. Em seguida, os produtos amplificados foram extraídos do gel de agarose (Fig. 11), dosados (Fig.12 e Tab. 4), de posse das suas concentrações, estes foram enviados à plataforma de sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ.

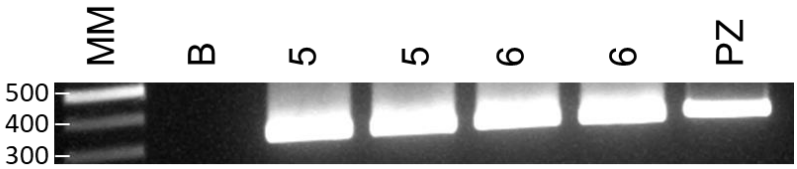


Figura 11: PCR convencional dos plasmídeos das amostras 5 (urina) e 6 (saliva) no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems, com os iniciadores GTZK-F/STZK-R. MM: massa molecular; B: banco; 5: amostra 5 e 6: amostra 6.

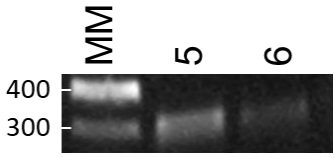


Figura 12: Gel de agarose de confirmação da extração dos fragmentos gerados a partir dos plasmídeos por PCR convencional com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R das amostras 5 (urina) e 6 (saliva) extraídos do gel. MM: massa molecular; 5: amostra 5 e 6: amostra 6.

Tabela 4: Dosagem dos fragmentos purificados gerados a partir dos plasmídeos dos cDNAs da amostra 5 de urina e amostra 6 de saliva.

Amostra	**[]ng/µL**
5	75
6	70

As sequências de nucleotídeos, provenientes da plataforma PDTIS/FIOCRUZ, das amostras de urina (amostra 5) e saliva (amostra 6) foram submetidas ao programa BLASTn na base de dados do NCBI. As sequências encontradas na busca com maior identidade com as sequências proveniente da plataforma PDTIS/FIOCRUZ, tanto para amostra de saliva quanto urina foram as sequências das cepas de ZIKV ARB7701 (KF268950.1) e ARB13565 (KF268948.1), com 100% e 92% de identidade, respectivamente (Fig. 13 e 14), isoladas da República Centro-Africana, diferente da cepa MR766(KY989511.1), a primeira cepa isolada na Uganda.

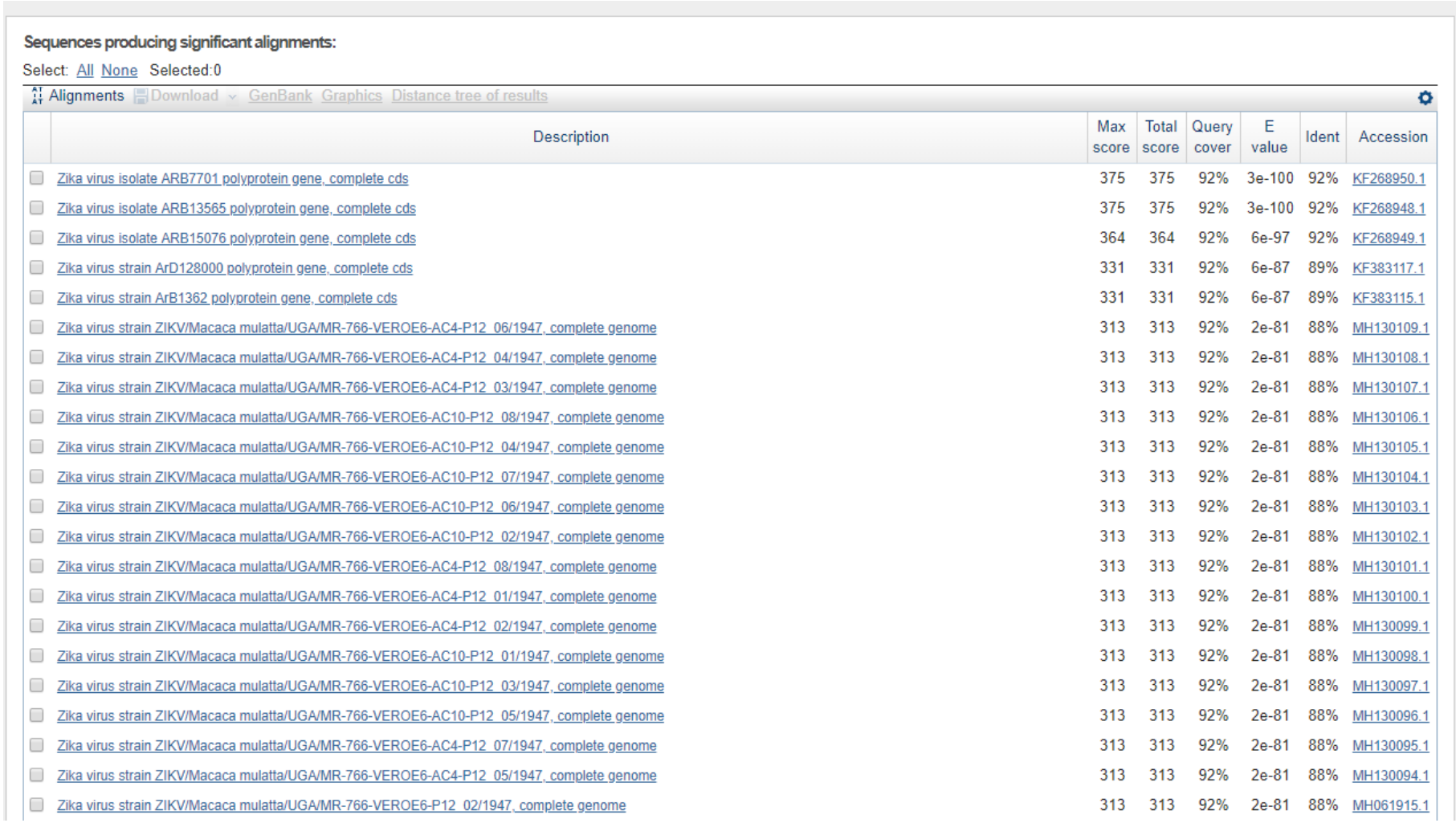
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Zika virus isolate ARB7701 polyprotein gene, complete cds	277	277	93%	7e-71	100%	KF268950.1
Zika virus isolate ARB13565 polyprotein gene, complete cds	277	277	93%	7e-71	100%	KF268948.1
Zika virus isolate ARB15076 polyprotein gene, complete cds	268	268	93%	4e-68	99%	KF268949.1
Zika virus strain MR 766, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	KY989511.1
Zika virus isolate Uganda1947_MR766 polyprotein gene, partial cds	259	259	93%	2e-65	97%	KX421193.1
Zika virus isolate ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766_SM150-V8/1947 polyprotein (GP1) gene, complete cds	259	259	93%	2e-65	97%	KU963573.2
Synthetic construct, complete sequence	259	259	93%	2e-65	97%	KX830961.1
Zika virus culture ATCC:VR-84 isolate MR776, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	KX830960.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766/1947, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	KX601169.1
Zika virus strain MR-766, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	KX377335.1
Zika virus isolate Zika virus/M.mulatta-tc/UGA/1947/MR-766, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	KU955594.1
Zika virus strain MR 766 polyprotein gene, complete cds	259	259	93%	2e-65	97%	KU720415.1
Zika virus genomic RNA, complete genome, strain: MR766-NIID	259	259	93%	2e-65	97%	LC002520.1
Zika virus strain ArD158095 polyprotein gene, partial cds	259	259	93%	2e-65	97%	KF383121.1
Zika virus strain ArD158084 polyprotein gene, complete cds	259	259	93%	2e-65	97%	KF383119.1
Zika virus strain ArD157995 polyprotein gene, complete cds	259	259	93%	2e-65	97%	KF383118.1
Zika virus isolate MR_766 polyprotein gene, partial cds	259	259	93%	2e-65	97%	HQ234498.1
Zika virus strain MR 766, complete genome	259	259	93%	2e-65	97%	AY632535.2
Zika virus strain ArD128000 polyprotein gene, complete cds	253	253	93%	8e-64	97%	KF383117.1

Figura 13: Figura representativa das sequências de ZIKV encontradas na busca, banco de dados do NCBI, com a sequência molde obtida do sequenciamento da amostra 5 (urina).



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Zika virus isolate ARB7701 polyprotein gene, complete cds	375	375	92%	3e-100	92%	KF268950.1
Zika virus isolate ARB13565 polyprotein gene, complete cds	375	375	92%	3e-100	92%	KF268948.1
Zika virus isolate ARB15076 polyprotein gene, complete cds	364	364	92%	6e-97	92%	KF268949.1
Zika virus strain ArD128000 polyprotein gene, complete cds	331	331	92%	6e-87	89%	KF383117.1
Zika virus strain ArB1362 polyprotein gene, complete cds	331	331	92%	6e-87	89%	KF383115.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_06/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130109.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_04/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130108.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_03/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130107.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_08/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130106.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_04/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130105.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_07/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130104.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_06/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130103.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_02/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130102.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_08/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130101.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_01/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130100.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_02/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130099.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_01/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130098.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_03/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130097.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC10-P12_05/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130096.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_07/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130095.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-AC4-P12_05/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH130094.1
Zika virus strain ZIKV/Macaca mulatta/UGA/MR-766-VEROE6-P12_02/1947, complete genome	313	313	92%	2e-81	88%	MH061915.1

Figura 14: Figura representativa das sequências de ZIKV encontradas na busca, banco de dados do NCBI, com a sequência molde obtida do sequenciamento da amostra 6 (saliva).

O passo seguinte, foi quantificar o material viral das amostras biológicas de saliva e urina por técnica de qPCR com SYBR Green. Para esta quantificação, foi primeiro determinada a eficiência do par de iniciadores GTZK-F/STZK-R utilizando o cDNA de ZIKV, proveniente de células Vero, em diluição seriada no ensaio de qPCR. A eficiência dos iniciadores foi calculada a partir da regressão linear da curva que relaciona os valores de CT com a diluição seriada de cDNA (Tab. 5). Estes valores foram utilizados para montar uma curva de regressão linear e calcular a eficiência, com base no coeficiente angular gerado, para os iniciadores GTZK-F/STZK-R no ensaio de qPCR, o valor de eficiência calculado foi de 94% (Fig. 15). A curva de *Melting* (Fig. 16), capturada do aparelho Applied, neste experimento (diluição seriada de cDNA x valor de CT), mostra 1 único pico na temperatura de 81,41 °C, correspondente a temperatura de *Melting*. Este resultado indica a formação e detecção de um único produto viral específico de ZIKV, detectado com os iniciadores utilizados.

Tabela 5: Desempenho do ensaio de qPCR utilizando SYBR Green e eficiência da padronização com a curva de diluição seriada de cDNA de ZIKV utilizando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R.

Diluição	**Média do CT**
10^{-1}	5,96 ± 0,607
10^{-2}	7,00 ± 0,001
10^{-3}	10,96 ± 0,586
10^{-4}	13,93 ± 0,582
10^{-5}	19,92 ± 0,002
10^{-6}	23,91 ± 0,002
H_2O	N/A
Eficiência	**94%**

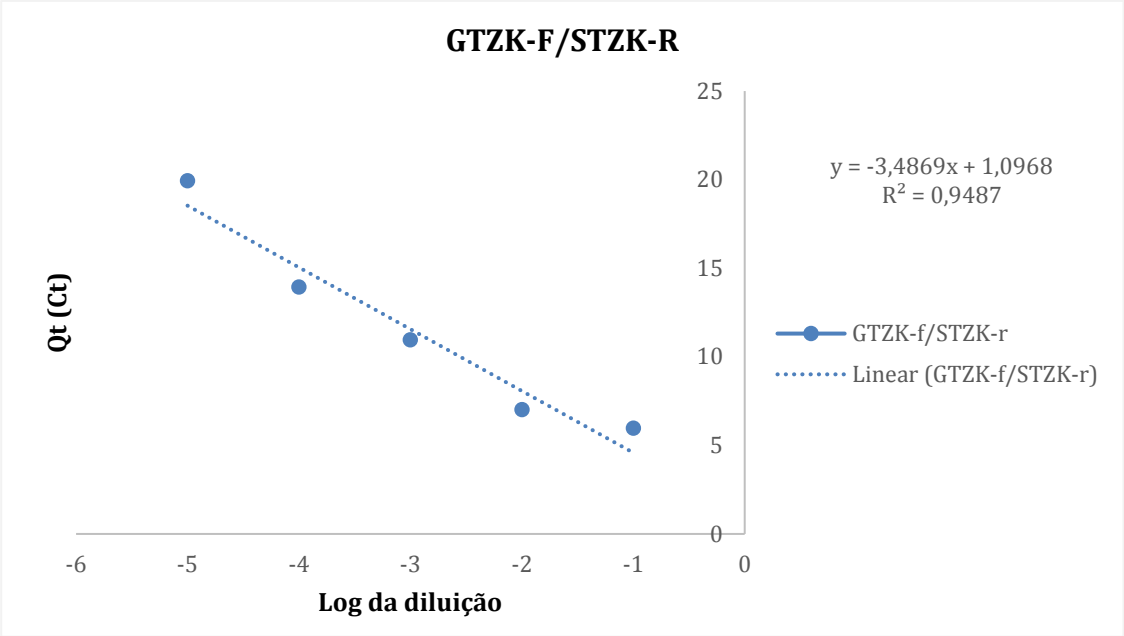


Figura 15: Curva de regressão linear da curva de diluição seriada do cDNA de ZIKV para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green.

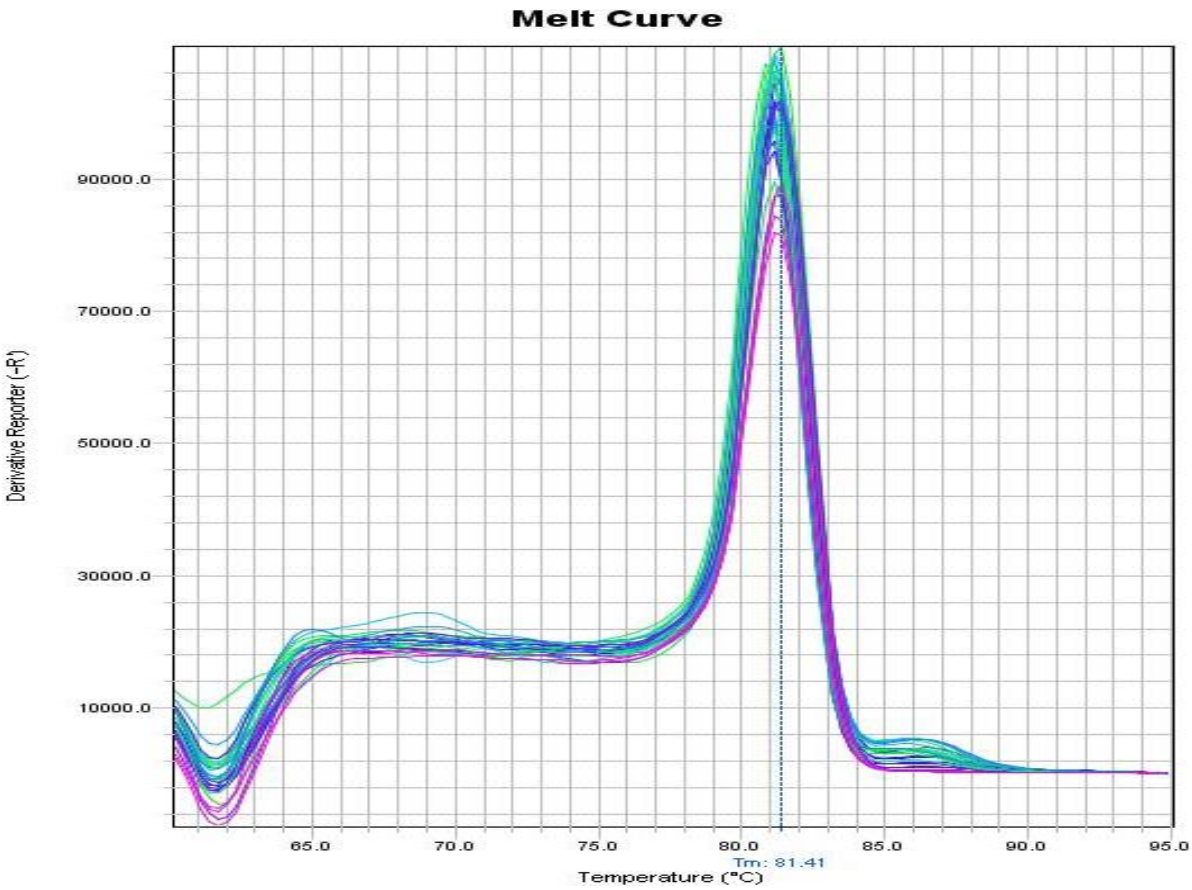


Figura 16: Curva de *Melting* da curva de diluição seriada do cDNA de ZIKV para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green.

No segundo ensaio de qPCR, foi feito a curva de diluição seriada do plasmídeo sintético de ZIKV com os iniciadores GTZK-F/STZK-R. Para este ensaio são mostrados os valores de CT x diluição seriada do plasmídeo (Tab. 6) fornecidos pelo equipamento (Apllied), com esses valores foi gerada uma curva de regressão linear (Fig. 17) e a partir desta foi possível calcular a eficiência do ensaio pelo coeficiente angular gerado. Nesse ensaio a eficiência obtida foi maior que para o cDNA, no valor de 97%, provavelmente por ser um produto mais puro, assim será possível quantificar as amostras determinando o número de cópias associado com cada valor de CT (Tab. 6). A curva de *Melting* (Fig. 18) também foi analisada para observar a especificidade do ensaio. Pode ser observado a presença de 1 pico em 81,24 °C, correspondente a temperatura de *Melting*. Este resultado indica a especificidade dos iniciadores, pela formação e detecção de apenas 1 produto viral, formando apenas o pico de *Tm* do gene de interesse, confirmando os resultados obtidos com o conjunto de iniciadores na curva com o cDNA de ZIKV.

Tabela 6: Desempenho do ensaio utilizando SYBR Green, eficiência e Nº de cópias com curva de diluição seriada do plasmídeo sintético de ZIKV.

Diluição	Média do CT	Nº de cópias/mL
10^{-1}	7,00 ± 0,002	$3,07x10^{8}$
10^{-2}	8,95 ± 0,003	$3,07x10^{7}$
10^{-3}	12,93 ± 0,002	$3,07x10^{6}$
10^{-4}	16,93 ± 0,002	$3,07x10^{5}$
10^{-5}	20,93 ± 0,004	$3,07x10^{4}$
10^{-6}	24,93 ± 0,008	$3,07x10^{3}$
10^{-7}	28,93 ± 0,590	$3,07x10^{2}$
10^{-8}	31,92 ± 0,002	3,07x10
H_2O	N/A	-
Eficiência	**97%**	-

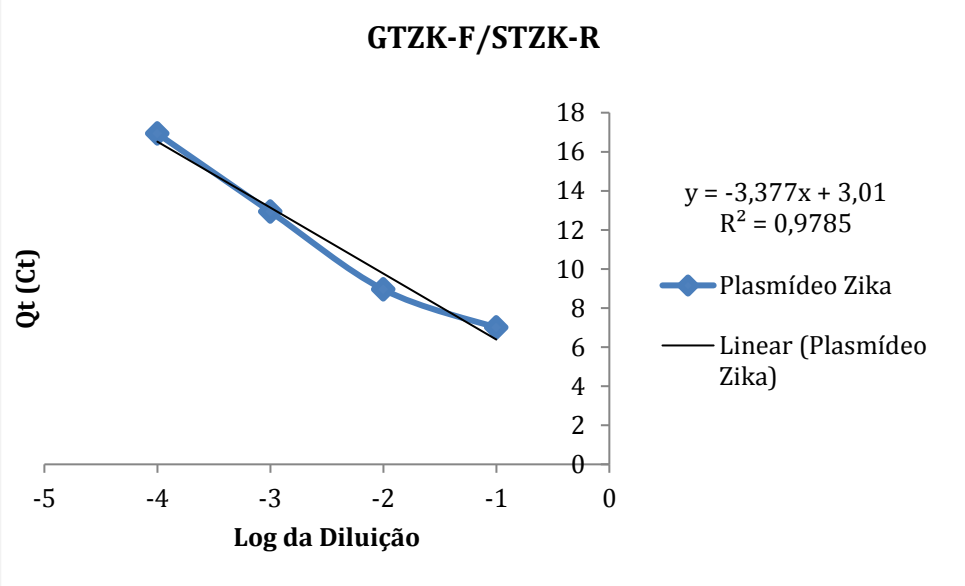


Figura 17: Curva de regressão linear da padronização com plasmídeo sintético de ZIKV em qPCR com SYBR Green utilizando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R.

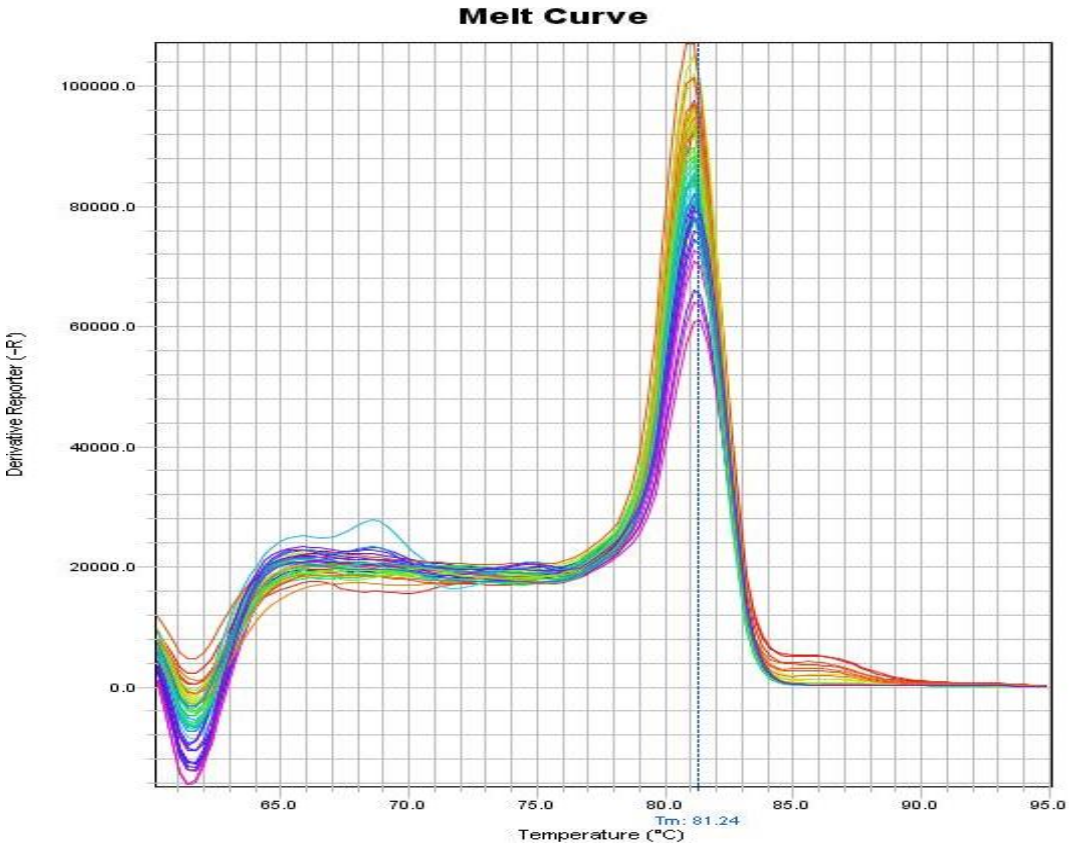


Figura 18: Curva de *Melting* da curva de diluição seriada do plasmídeo sintético de ZIKV para padronização com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR com SYBR Green.

Após a confecção das curvas padrões com cDNA e plasmídeo de ZIKV no ensaio de qPCR com os iniciadores GTZK-F/STZK-R, estes foram então testados em ensaio de qPCR utilizando cDNA de diferentes arbovírus: YFV, MAYV, SINV, CHIKV e DENV1-4 para verificar a hipótese de amplificação de outros vírus que não o ZIKV. Na figura 19 um único pico de temperatura *Melting* foi observado na temperatura 81,50 ºC, correspondente a detecção de material nas amostras de cDNA e de plasmídeo de ZIKV, não ocorrendo amplificação de material viral com o cDNA demais arbovírus. Esta série de dados comprova que o conjunto de iniciadores GTZK-F/STZK-R é específico para ZIKV, não reconhecendo nenhum outro arbovírus testado.

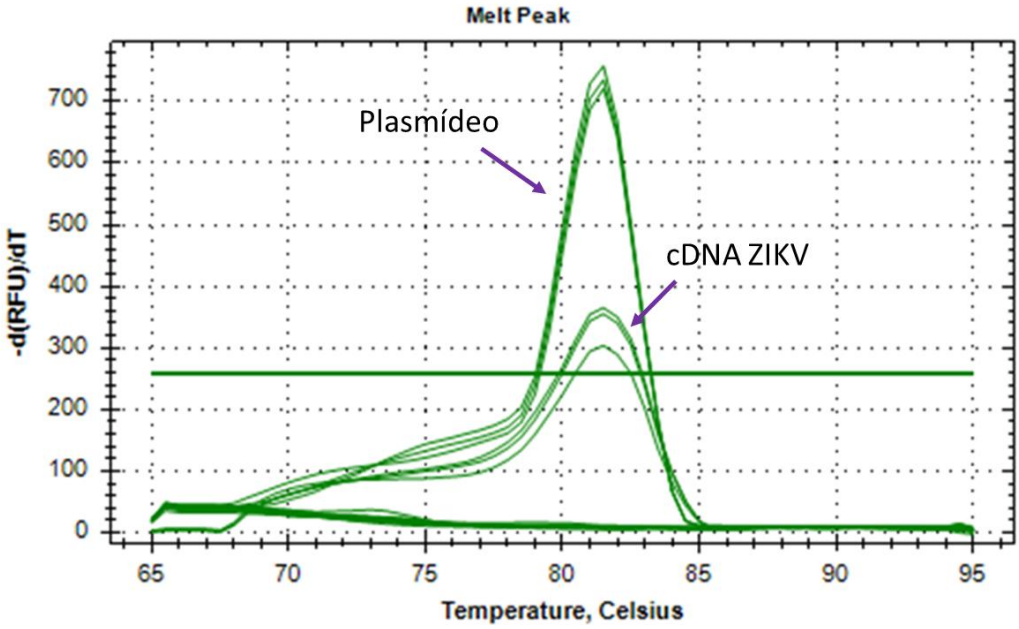


Figura 19: Curva de Melting do método qPCR com SYBR Green dos arbovírus usando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R; Arbovírus testados: Vírus da Febre Amarela (YFV), Vírus Mayaro (MAYV), Vírus Sindbis (SINV) e Vírus Chikungunya (CHIKV), como controles positivos foram usados plasmídeo sintético de ZIKV e cDNA de ZIKV.

Para validar esse conjunto de iniciadores com as amostras clínicas, foi feito o ensaio de qPCR com o painel de amostras humanas de saliva e urina. Amostras de cDNA de saliva e urina foram testadas com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R. Na figura 20 pode ser observado que as amostras 0, 2, 3 e 4 de cDNA de saliva gerou um único pico na temperatura de *Melting* ≈81,25 ºC, característico da detecção de material viral de ZIKV.

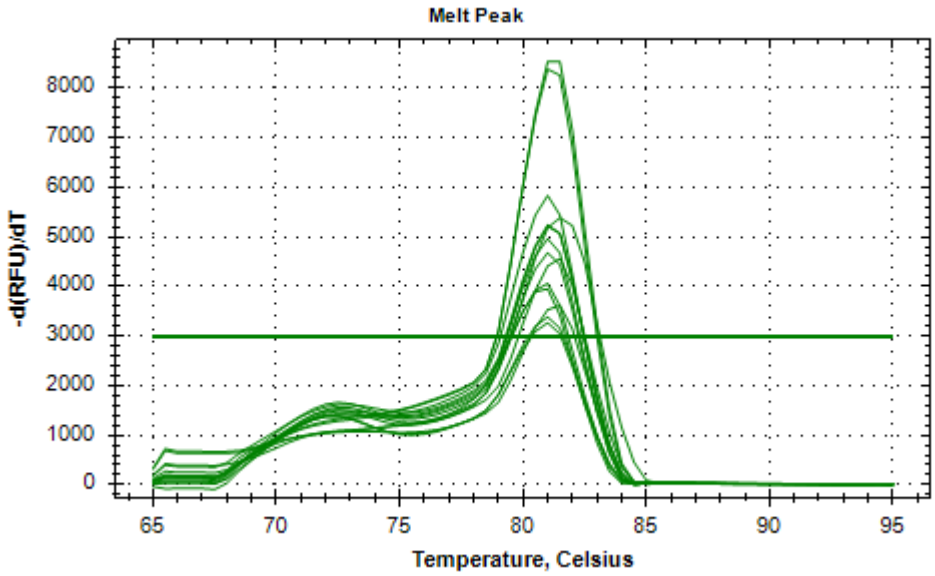


Figura 20: Curva de *Melting* das amostras clínicas de saliva e urina no método qPCR com SYBR Green usando o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R.

O próximo passo foi relacionar os valores de CT obtidos das amostras 0, 2, 3 e 4 (Tab. 7) com a curva padrão do plasmídeo de ZIKV (Fig. 17). A tabela 7 mostra o valor de CT de cada amostra biológica relacionado com o número de cópias de vírus ZIKV, para isso foi feita a correlação com a curva padrão do plasmídeo x CT de cada amostra para fazer a quantificação, determinando assim o número de cópias presente em cada amostra considerada positiva. Para a amostra 0 (saliva) foi calculado o valor de $1{,}31 \times 10^{9}$ cópias/mL de ZIKV de acordo com a correlação feita, para a amostra 2 (saliva) $7{,}9 \times 10^{-1}$ cópias/mL, para amostra 3 (urina) $2{,}87 \times 10^{1}$ cópias/mL e para amostra 4 (saliva) $2{,}89 \times 10^{2}$ cópias/mL. O conjunto destes dados demonstram que o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R consegue detectar ZIKV de maneira específica, sem reconhecimento cruzado com outros arbovírus, nas amostras de saliva e urina através dos ensaios de PCR convencional e qPCR por SYBR Green, podendo ser quantificado neste último.

Tabela 7: Número de cópias de ZIKV, das amostras clínicas, correlacionadas com os valores de CT da curva padrão do plasmídeo de ZIKV.

Amostra	Média do CT	Nº de cópias/mL
cDNA ZK	22,50 ± 0,248	$2,8x10^{4}$
PL ZK	7,19 ± 0,152	$1,31x10^{9}$
0	26,79 ± 0,000	$3,07x10^{2}$
2	33,31 ± 0,481	$7,9x10^{-1}$
3	31,15 ± 0,068	$2,87x10^{1}$
4	28,29 ± 0,012	$2,89x10^{2}$
H_2O	N/A	-

A partir do ensaio de qPCR do painel de amostras clínicas (19 amostras), dentre as 15 que apresentaram presença de ZIKV no PCR convencional (Fig. 9), dessas foi possível detectar a presença do vírus em apenas 4 amostras (Fig. 20 e Tab. 7) devido a problemas técnicos/estruturais do prédio (sucessivas faltas de luz), que interferiram com a conservação das amostras. A integridade das amostras não pôde ser garantida, devido à alta temperatura ao qual permaneceram por tempo indeterminado, interferindo com posteriores análises, como os sequenciamentos das demais amostras positivas, além das duas que foram sequenciadas (amostras 5 e 6) e na quantificação de material viral em amostras de saliva e urina por técnica de qPCR com SYBR Green. Por este motivo, não foram realizadas as análises estatísticas destes experimentos (ausência de número suficiente de amostras integras para análise).

5. Discussão

O vírus Zika configura-se como uma grande preocupação de saúde pública, visto a velocidade com a qual o ZIKV se disseminou pelas Américas e as complicações neurológicas em humanos causadas por ele. Um dos seus principais vetores o *Ae. aegypti* é muito bem adaptado ao ambiente urbano, além de estar distribuído por grande parte da faixa tropical e subtropical do globo. A grande parcela de assintomáticos (≈ 80%) nos infectados pelo ZIKV unida ao fator transmissão sexual é um problema de dimensões substanciais, levando em conta a grande movimentação de viajantes pelo mundo (Grard *et al*., 2014; Chang *et al*., 2016; Kindhauser *et al*., 2016; Petersen *et al*., 2016b; Ye *et al*., 2016).

Considerando os prejuízos econômicos e sociais causados pela infecção por ZIKV, assim como a co-circulação de outros arbovírus como DENV, YFV, MAYV e CHK, com sintomas similares, e que apresentam reatividade cruzada, bem como o aumento do número de casos da síndrome de Guillain-Barré e de microcefalia, dentre outras malformações associadas a febre zika; o cenário da febre zika, portanto, é alarmante, gerando preocupações com detecção e prevenção da doença, sendo necessária a constante busca de métodos de detecção do ZIKV para que sejam sempre mais rápidos, mais eficientes, mais baratos e com alta especificidade (Zanluca *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016; de Moraes *et al*., 2018; Koppolu & Raju, 2018).

A febre zika pode ser diagnosticada a partir dos seguintes fluidos biológicos: sangue total, soro, plasma, urina, fluido cefalorraquidiano, fluido amniótico, sêmen e saliva. Para a detecção do ZIKV, nesses fluidos, podem ser utilizadas técnicas sorológicas e moleculares. No entanto, na detecção de ZIKV por sorologia muitas vezes ocorre o reconhecimento cruzado com outros flavivírus endêmicos do local, por esse motivo a OMS recomenda que o diagnóstico seja feito pela detecção do RNA viral por métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é mais específica e tem menos chances de uma identificação errônea do patógeno (Ioos *et al.*, 2014; Musso *et al.*, 2015; WHO, 2016c; Brasil, 2017b; Chang *et al.*, 2017; Koppolu & Raju, 2018; Shehu *et al.*, 2018;).

Dentre os métodos de detecção molecular está o ensaio por qPCR, este pode ser feito utilizando moléculas fluorogênicas (ex: SYBR Green) que se ligam a fitas de DNA ou as sondas fluorescentes de hidrólise (TaqMan*).* Cada um dos ensaios de qPCR apresentam vantagens e desvantagens. O sistema TaqMan utiliza sondas desenhadas para sequências virais específicas, isso possibilita utilizar mais de uma sonda, no mesmo tubo, com diferentes fluoróforos, que captam comprimentos de onda diferentes, para detecção de diferentes vírus

(ensaios multiplex). No entanto, se houver variações na sequência de RNA do vírus alvo correspondente da sonda, esta não reconhece a sequência ocorrendo resultados falso-negativos. Outra desvantagem é que a confecção da sonda específica para cada alvo eleva enormemente o custo do ensaio. Para os ensaios com SYBR Green observa-se algumas desvantagens, mais de um alvo gênico exige múltiplos tubos reacionais. Outro problema é a chance de formação de dímeros com iniciadores que podem reduzir a eficiência da reação com a geração de falsos-positivos, para contornar este problema usa-se amostras de controles negativos em todas as reações. Este ensaio tem uma grande vantagem, pois permite um certo nível de variações na sequência viral alvo, sem que ocorram resultados falso-negativos. Quando comparados, os custos da utilização de SYBR Green com TaqMan, o primeiro sai mais barato tornando mais acessível para aplicação em laboratórios de pesquisa e viabilizando o diagnóstico de países em desenvolvimento (Dhar *et al*., 2002; Chien *et al*., 2006; Bustin *et al*., 2009; Salles *et al*., 2017).

Na literatura são encontrados vários protocolos com desenhos de iniciadores específicos para detecção de ZIKV que usam tanto a metodologia de TaqMan quanto a do SYBR Green, com o propósito de amplificar os mais variados genes virais. Uma das preocupações na idealização do protocolo de RT-PCR para o diagnóstico de vírus de RNA é a alteração genética do vírus alvo, uma solução seria utilizar iniciadores degenerados, mas isso pode fazer com que reconheça outros vírus do mesmo gênero (Chien *et al*., 2006).

Dentre os iniciadores presentes na literatura para ZIKV estão os específicos para a proteína estrutural de Envelope (Burkhalter & Savage, 2017; Corman *et al*., 2016; Faye *et al*., 2008; de Moraes *et al*., 2018; Wand *et al*., 2018; Yang *et al*., 2017), ou para as proteínas não estruturais NS1 (Corman *et al*., 2016; de Moraes *et al*., 2018), NS2A (Wahed *et al*., 2017), NS2B (Waggoner *et al.*, 2016), NS3 (Tappe *et al.*, 2014) e NS5 (Balm *et al*., 2012; Faye *et al*., 2013; Glushakova *et al*., 2018; Hui *et al*., 2018; Zuanazzi *et al.*, 2017) e para a região não codificante do genoma 5'UTR (Chan *et al*., 2017).

Existem também autores que utilizam a estratégia de iniciadores que abrangem mais de uma sequência viral que codifica duas diferentes proteínas, como os conjuntos de iniciadores desenhados pelos grupos de Lanciotti *et al*. (2008) para prM-E, Pyke *et al*. (2014) desenharam para E-NS1, Xu *et al.* (2016) para as regiões NS5-3'UTR e Guedes *et al*. (2016) para C-E. A finalidade para qual cada conjunto de iniciadores foi desenhado é baseado em propósitos específicos como a maior conservação na família ou entre as cepas do vírus, montagem das árvores filogenéticas, sequenciamento, divergência entre os flavivírus, dentre outros (Chien *et al*., 2006; Lanciotti *et al*., 2008; Balm *et al.*, 2012; Faye *et al*., 2013).

Das metodologias disponíveis na literatura, o protocolo desenhado por Lanciotti *et al.* (2008), para amplificar região da proteína prM-E, é amplamente adotado nos estudos para detecção de ZIKV em amostras clínicas e de mosquitos (Cao-Lormeau *et al*., 2014; Gourinat *et al*., 2015; Musso *et al*., 2015; Guedes et al., 2016). Entretanto, alguns estudos posteriores comprovaram o desempenho de iniciadores para a região gênica proteína E não é a melhor escolha para a detecção de ZIKV em amostras quando comparada com iniciadores para a região da proteína NS1 (de Moraes *et al.*, 2018).

O conjunto de dados apresentados por Chien *et al*. (2006) e Lanciotti *et al*. (1992) atestam que iniciadores desenhados para região de junção de C-prM para os 4 sorotipos de DENV tem maior eficiência e sensibilidade no ensaio de qPCR. Estes trabalhos serviram de base para nossa escolha de desenhar os iniciadores para detecção de ZIKV na região C-prM, ressalto ainda a ausência de trabalhos na literatura com essa abordagem para ZIKV até o momento do início deste estudo. Outra vantagem é que a região C-prM é uma região bem diversificada entre os flavivírus, podendo então, serem identificados diferentes vírus, utilizando diferentes pares de iniciadores com um mesmo cDNA viral. Semelhante ao observado por Chien *et al*. (2006) e Lanciotti *et al*. (1992) para o DENV, fomos investigar se os iniciadores desenhados para região C-prM do ZIKV seriam específicos e eficientes para detecção e determinação da carga viral de ZIKV, propusemos assim um novo método e uma abordagem alternativa para a detecção específica de ZIKV por ensaio de PCR convencional e quantitativo utilizando SYBR Green.

Não é incomum encontrar na literatura protocolos de PCR convencional, ideais para detecção da presença do material viral em amostras, projetados de maneira que os iniciadores possam ser utilizados tanto para ensaio de qPCR ou para ensaio de RT-qPCR, ensaios adequados para a quantificação do genoma alvo de maneira eficiente. Como descrito por Balm *et al.* (2012), que projetou iniciadores para a região da NS5 de ZIKV usados em ensaio de RT-PCR, mas podem ser convertidos para qPCR. Seguindo esse conceito os iniciadores desenhados neste trabalho também são utilizados paralelamente nos ensaios de PCR convencional e qPCR com sucesso em detectar RNA viral de ZIKV nestas técnicas.

A despeito da descrição de vários ensaios de RT-qPCR para ZIKV na literatura, a avaliação feita por Corman *et al*. (2016) revelou a baixa sensibilidade de alguns ensaios que apresentavam incompatibilidade para detectar as cepas asiática/americana (cepa da epidemia de 2016 nas Américas) e africana (Pyke *et al.*, 2014; Chan *et al*., 2017). Tendo em vista essa divergência, o conjunto de iniciadores, GTZK-F/STZK-R, desenhados para este estudo, foi testado por biologia computacional para garantir que fosse capaz de detectar tanto as

linhagens africanas quanto as asiáticas. O par de iniciadores GTZK-F/STZK-R apresentou um alto grau de especificidade, reconhecendo as 1.123 cepas de ZIKV depositadas no banco do NCBI na época da análise, considerando até o valor de 30% de erro na análise, ao contrário da maioria dos iniciadores presentes na literatura como, por exemplo, os descritos por de Pyke *et al.* (2014) que não reconhecem a cepa africana.

Visto que os iniciadores deste trabalho são capazes de reconhecer todas as cepas de ZIKV, os iniciadores (GTZK-F/STZK-R) foram testados para reconhecimento de outros arbovírus e apresentaram resultados promissores. Nas reações de PCR convencional e qPCR, foi utilizado o conjunto GTZK-F/STZK-R para avaliar a possibilidade de reação cruzada com outros arbovírus circulantes no Brasil das famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, especificamente foram testados cDNAs dos vírus YFV, MAYV, SINV, CHIKV e DENV 1-4 e como controles positivos cDNA de ZIKV e o plasmídeo sintético, desenhado na região C-prM. Os resultados obtidos demostram que o par GTZK-F/STZK-R é especifico para o ZIKV, não tendo reconhecimento cruzado com nenhum dos outros vírus testados, este resultado é comparável ao de outros trabalhos, como o de Faye *et al*. (2008), Bonaldo *et al*. (2016) e Yang *et al.* (2017), que também não apresentaram reconhecimento cruzado para nenhum flavivírus testados além do alvo ZIKV.

Em um estudo anterior, Bonaldo *et al*. (2016) também utilizou a metodologia de PCR convencional para pesquisar a presença do ZIKV em amostras de saliva e urina de pacientes. Os resultados obtidos por Bonaldo *et al*. (2016) corroboram os resultados obtidos no presente estudo, em que todas as amostras de urina analisadas (5/5) e aproximadamente 71% das amostras de saliva (10/14) foi detectada a presença do RNA de ZIKV por ensaio de PCR convencional.

As amostras Rio-S1 e Rio-U1, isoladas durante o surto de febre ZIKV de 2016, no Rio de Janeiro, e sequenciadas por Bonaldo *et al*. (2016), quando analisadas filogeneticamente agruparam-se com o clado asiático do ZIKV, diferindo das amostras de urina e saliva deste trabalho que eram mais semelhantes a cepas africanas. A amostra 5 de urina e a amostra 6 de saliva quando sequenciadas, agruparam-se no clado da África Oriental. Esses dados sugerem que pode ter havido mais de uma rota de entrada do vírus e que mais de uma cepa de ZIKV estava circulando na Federação durante o surto em 2016. Para comprovar esta hipótese de mais de uma cepa de vírus circulantes, mais sequenciamentos das amostras de saliva e urina seriam necessários, entretanto, isso não foi possível devido a degradadção das amostras virais de ZIKV.

Para determinar o nível de eficiência do conjunto de iniciadores foram feitas curvas padrões com diluições seriadas utilizando cDNA de ZIKV, de cultura de células Vero e com o plasmídeo sintético, desenhado na região C-prM. A partir dos CTs obtidos foi calculada a eficiência de cada uma das curvas, apresentando os valores de 94 e 97%, respectivamente, para o cDNA e para o plasmídeo. Os valores de eficiência dos iniciadores calculados estão dentro da faixa de 90 a 110%, aceita para a técnica. Comparando os resultados de nosso estudo com de outros grupos como o de Yang *et al.* (2017) que desenharam iniciadores para a região de E, e obtiveram um R^2= 0,999 em comparação com a curva padrão do nosso plasmídeo sintético, obtivemos R^2= 0,978, utilizada para quantificar as amostras clínicas. O número de detecção mínimo de 3 cópias de RNA viral com os iniciadores para a região C-prM, propostos nesse estudo, ainda é mais baixo que o valor de 5 encontrado por Yang *et al.* (2017), ou seja, o ensaio proposto por nosso grupo foi mais sensível. Hui *et al.* (2018) desenharam iniciadores para a região da NS5, tendo obtido o valor de R^2=0,999 idêntico ao Yang *et al.* (2017), porém com eficiência foi de 92%, inferior aos valores obtidos em nosso estudo (Hui *et al.*, 2018), demonstrando que não necessariamente o R^2 estar mais próximo de 1, vai implicar em que o ensaio seja mais eficiente e específico.

Não foi possível comparar os resultados do presente trabalho com o do protocolo mais utilizado na literatura (Lanciotti *et al*., 2008), visto que os autores não fizeram uma curva padrão para quantificar de maneira mais exata as amostras testadas, apenas fizeram uma aproximação da quantidade de RNA viral presente no material testado.

Amostras de saliva e urina são de particular interesse para o diagnóstico de ZIKV e outros arbovírus, estudos como o de Gourinat *et al.* (2015) que relataram a permanência de vírus detectáveis por mais tempo nesses tipos de fluidos quando comparados com os resultados para detecção de arbovírus em amostras de sangue total e soro, mesmo após o fim dos sintomas. Além disso, a coleta é fácil e não invasiva (Musso *et al*., 2015). No entanto, não exclui a pesquisa do vírus e outras alterações metabólicas no sangue. Baseado nessas informações, saliva e urina foram escolhidos como objetos de análise, devido a maior janela de detecção e/ou maior carga viral para a validação do conjunto de iniciadores GTZK-F/STZK-R desenhados para quantificação nesse estudo.

Bonaldo *et al.* (2016) fez a quantificação do ZIKV por qPCR utilizando Taqman, em amostra de saliva ($7{,}44x10^4$ cópias/mL), carga viral maior que na amostra 4 deste estudo que apresentou $2{,}89x10^2$ cópias/mL. Essa diferença pode ser a carga viral real do paciente ou devido a degradação sofrida pela amostra. No estudo feito por Corman *et al.* (2016) comparando vários protocolos de quantificação do RNA de ZIKV foi possível determinar

uma faixa de quantificação, em cada tipo de amostra, que varia de acordo com o gene alvo dos iniciadores usados, gerando um intervalo de valores na quantificação para as amostras, como por exemplo, urina teve a carga viral calculada entre $4x10^2$ e $8x10^4$ cópias/mL e sangue $1x10^2$ e $2x10^6$ cópias/mL.

Assim como apresentado no presente trabalho, as amostras de Zuanazzi *et al*. (2017) também degradaram devido a demora em fazer a confirmação dos resultados obtidos por Peptidômica por *nested*-PCR, não sendo possível fazer a detecção do RNA de ZIKV utilizando a metodologia de *nested*-PCR devido a degradação das amostras de saliva. Esses dados mostram como a preservação das amostras é de vital de importação para a obtenção de resultados fidedignos de carga viral. Cerca de 20 a 80% dos casos de infectados por ZIKV não são diagnosticados devido à baixa carga viral nas amostras clínicas, que estão abaixo limite de detecção das técnicas de pesquisa de genoma viral (Chan *et al*., 2017).

A validação dos iniciadores GTZK-F/STZK-R no ensaio de PCR convencional ou qPCR deve ser extendida com um painel maior de amostras biológicas de diferentes naturezas como sangue, plasma, urina e saliva, etc. Entretanto, este estudo contribuiu no sentido de que os iniciadores utilizados para amplificação viral de ZIKV, na região C-prM do vírus, foi específica, sem cruzamento com outros arbovírus, com boa eficiência, podendo ser medida através dos valores de CT da curva padrão de diluição seriada do plamídeo sintético ZIKV; uma metodologia que tem possibilidade de ser incorporada no Sistema Único de Saúde ou em laboratórios particulares para detecção de ZIKV.

6. Conclusão

Este trabalho, propõe um protocolo de detecção do ZIKV com os iniciadores GTZK-F/STZK-R, que tem como alvo a região genômica C-prM do vírus, empregando os métodos de PCR convencional e PCR quantitativo por SYBR Green para detecção em amostras clínicas humanas de saliva e urina.

- Os iniciadores GTZK-F/STZK-R específicos para detecção de ZIKV são capazes de identificar mais de 1.100 sequências que abrangem as cepas africanas e asiáticas depositadas no banco de dados do NCBI com erros na ordem de até 30%;
- Quando testados com outros arbovírus, o conjunto de iniciadores tanto no PCR convencional usando a metodologia de *hemi-nested* PCR quanto no qPCR, amplificou apenas os controles positivos de ZIKV;
- O par de iniciadores GTZK-F/STZK-R quando utilizado na metodologia de *hemi-nested* PCR para validação com painel de amostras clínicas de saliva e urina coletadas na época do surto, foi capaz de amplificar o RNA viral de 15 das 19 amostras;
- A eficiência dos iniciadores GTZK-F/STZK-R nas curvas padrão do qPCR com amostras cDNA e de plasmídeo sintético de ZIKV foi de 94% e 97%, respectivamente, e só apresentaram um pico na curva de *Melting* na temperatura de ≈81 ºC;
- Apesar da degradação das amostras, foi possível fazer a quantificação com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R em qPCR de 4 amostras de saliva, validando assim o protocolo proposto para a detecção de ZIKV em amostras clínicas.

7. Referências

Abushouk, A.I.; Negida, A. & Ahmed, H. "**An updated review of Zika virus**." *J. of Clin. Virol.* (2016) 84:53-58.

Azevedo, R.S.S.; Araujo, M.T.; Filho, A.J.M.; Oliveira, C.S.; Nunes, B.T.D.; Cruz, A.C.R.; Nascimento, A.G.P.A.C.; Medeiros, R.C.; Caldas, C.A.M.; Araujo, F.C.; Quaresma, J.A.S.; Vasconcelos, B.C.B.; Queiroz, M.G.L.; Rosa, E.S.T.; Henriques, D.F.; Silva, E.V.P.; Chiang, J.O.; Martins, L.C.; Medeiros, D.B.A.; Lima, J.A.; Nunes, M.R.T.; Cardoso, J.F.; Silva, S.P.; Shi, P.Y.; Tesh, R.B.; Rodrigues, S.G.; Vasconcelos, P.F.C. "**Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults: clinical and laboratorial aspects.**" *J. of Clin. Virol*. (2016) 85:56-64.

Balm, M.N.D.; Lee, C.K.; Lee, H.K.; Chiu, L.; Koay, E.S.C.; Tang, J.W. "**A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus.**" *J. of med. Virol.* (2012) 84.9:1501-1505.

Bamford, D.H. "**Do viruses form lineages across different domains of life?**" *Res. in Microbiol.* (2003) 154.4:231-236.

Bardina, S.V.; Bunduc, P.; Tripathi, S.; Duehr, J.; Frere, J.J.; Brown, J.A.; Nachbagauer, R.; Foster, G.A.; Krysztof, D.; Tortorella, D.; Stramer, S.L.; García-Sastre, A.; Krammer, F.; Lim, J.K. "**Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiflavivirus immunity**." *Science* (2017) 356.6334:175-180.

Berliner, A.J.; Mochizuki, T.; Stedman, K.M. "**Astrovirology: Viruses at Large in the Universe.**" *Astrobiology* (2018) 18.2:207-223.

Bonaldo, M.C.; Ribeiro, P.I.; Lima, N.S.; Santos, A.A.C.; Menezes, L.S.R.; Cruz, S.O.D.; Mello, I.S.; Furtado, N.D.; Moura, E.E.; Damasceno, L.; Silva, K.A.B.; Castro, M.G.; Gerber, A.L.; Almeida, L.G.P.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Ana Tereza R. Vasconcelos, A.T.R.; Brasil, P. "**Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil.**" *PLoS negl. Trop. Dis.* (2016) 10.6:e0004816.

Braack, L.; Almeida, A.P.G.; Cornel, A.J.; Robert Swanepoel, R.; Christiaan de Jager, C. "**Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors**." *Paras. & vec.* (2018) 11.1:29.

Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Guia de vigilância. Epidemiológica**: Secretaria de Vigilância em Saúde: Zika; (2015) 46.26:1-7 (http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos). Acessado em: 12/08/2018

Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Guia de vigilância. Epidemiológica:** Secretaria de Vigilância em Saúde: Zika; (2016) 48.2:1-10 (http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos). Acessado em: 12/08/2018

Brasil. Ministério da saúde. **Saúde de A a Z. Zika vírus. Saúde de A a Z. Zika vírus. Manifestações Neurológicas.** 2016 (http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus/27002-manifestacoes-neurologicas). Acessado em: 23/06/2018

Brasil. Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Guia de vigilância. Epidemiológica**: Secretaria de Vigilância em Saúde: Zika; (2017) 49.1:1-12 (http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos). Acessado em: 12/08/2018

Brasil. Ministério da saúde. **Saúde de A a Z. Zika vírus**. 2017 (http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus). Acesso em: 23/06/2018

Brasil Departamento de Vigilância Epidemiológica: **Guia de vigilância. Epidemiológica**: Secretaria de Vigilância em Saúde: Zika; (2018) 49.33:1-14 (http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos). Acessado em: 12/08/2018

Burkhalter, K.L.; Savage, H.M. "**Detection of Zika virus in desiccated mosquitoes by real-time reverse transcription PCR and plaque assay**." *Emerg. Infec. Dis.* (2017) 23.4:680-681.

Bustin, S.A.; Benes, V.; Garson, J.A.; Hellemans, J.; Jim Huggett, J.; Kubista, M.; Mueller, R.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Gregory L. Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Carl T. Wittwer, C.T. "**The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.**" *Clin. Chem.* (2009) 55.4:611-622.

Cabral-Castro, M.J.; Cavalcanti, M.G.; Peralta, R.H.S.; Peralta, J.M. "**Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients.**" *J. of Clin. Virol.* (2016) 82:108-111.

Calisher, C.H.; Higgs, S. "**The discovery of arthropod-specific viruses in hematophagous arthropods: an open door to understanding the mechanisms of arbovirus and arthropod evolution?**" *Ann. Rev. of entom.* (2018) 63:87-103.

Cao-Lormeau V.M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.L.; Henri-Pierre Mallet, H.P.; Amadou Alpha Sall, A.A.; Musso, D. "**Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013.**" *Emerg. Infect. Dis.* (2014) 20.6:1084-1086.

Casseb, A.R.; Casseb, L.M.N.; Silva, S.P.; Vasconcelos, P.F.C. "**Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira.**" *Vet. e Zoot.* (2013) 20.3:391-403.

Castrignano, S.B. "**O que são vírus? Um novo conceito**." *Bol Inst Adolfo Lutz*. (2016) 26(U): art.8

Centers for Disease Control and Prevention. **Birth Defects Homepage. Specific Birth Defects. Microcephaly**. 2016 (https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/portuguese/microcephaly.html). Acessado em: 24/06/2018

Centers for Disease Control and Prevention. **Zika Virus Home. Health Efects & Riscks. Microcephaly & Other Birth Defects.** 2018 (https://www.cdc.gov/zika/healtheffects/birth_defects.html). Acessado em: 24/06/2018

Chambers, T.J.; Hahn, C.S.; Galler, R.; M. Rice, M.C. "**Flavivirus genome organization, expression, and replication.**" *Ann. Rev. in Microbiol.* (1990) 44.1:649-688.

Chan, J.F.W.; Choi, G.K.Y.; Yip, C.C.Y.; Cheng, V.C.C.; Yuen, K.Y. "**Zika fever and congenital Zika syndrome: an unexpected emerging arboviral disease.**" *J. of Infec.* (2016) 72.5:507-524.

Chan, J.F.W.; Yip, C.C.Y.; Tee, K.M.; Zhu, Z.; Tsang, J.O.L.; Chik, K.K.H.; Tsang, T.G.W.; Chan, C.C.S.; Poon, V.K.M.; Sridhar, S.; Yin, F.; Hung, I.F.N.; Chau, S.K.Y.; Zhang, A.J.; Chan, K.H.; Yuen, K.Y. "**Improved detection of Zika virus RNA in human and animal specimens by a novel, highly sensitive and specific real-time RT-PCR assay targeting the 5′-untranslated region of Zika virus**." *Trop. Med. & Inter. Health* (2017) 22.5:594-603.

Chang, C.; Ortiz, K.; Ansari, A.; Gershwin, M.E. "**The Zika outbreak of the 21st century.**" *J. of autoim.* 68 (2016) 68:1-13.

Chang, H.H.; Huber, R.G.; Bond, P.J.; Grad, Y.H.; Camerini, D.; Maurer-Strohb, S.; Lipsitch, M. "**Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses.**" World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization (2017) 95.7:517.

Chien, L.J.; Liao, T.L.; Shu, P.Y.; Huang, J.H.; Duane J. Gubler, D.J.; Chang, G.J.J. "**Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses.**" *J. of clin. Microbiol.* (2006) 44.4:1295-1304.

Corman, V.M.; Corman, V.M.; Rasche, A.; Baronti, C.; Aldabbagh, S.; Cadar, D.; Reusken, C.B.; Pas, S.D.; Goorhuis, A.; Schinkel, J.; Molenkamp, R.; Kümmerer, B.M.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Eschbach-Bludau, M.; Eis-Hübinger, A.M.; Marion P Koopmans, M.P.; Schmidt-Chanasit, J.; Grobusch, M.P.; Lamballerie, X.; Drosten, C.; Drexler, J.F. "**Assay optimization for molecular detection of Zika virus**." *World Health Organization. Bullet. of the Wor. Health Org.* (2016) 94.12:880.

de Moraes, F.M.; Espósito, D.L.A.; Klein, T.M.; Fonseca, B.A.L. "**Searching for the best real-time RT-PCRs to detect Zika virus infections: the importance of comparing several protocols.**" *Braz. J. of Med. and Biol. Res.* (2018) 51.6:e7221.

Dhar, A.K.; Roux, M.M.; Klimpel, K.R. "**Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green chemistry**." *J. of virol. Meth.* (2002) 104.1:69-82.

Dick, G.W.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. **Zika virus. I. Isolations and serological specificity.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (1952) 46.5:509-520.

Dick G.W. **Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties**. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (1952):46.5:521-534.

dos Santos, T.; Rodriguez, A.; Almiron, M.; Sanhueza, A.; Ramon, P.; de Oliveira, W.K.; Coelho, G.E.; Badaró, R.; Cortez, J.; Ospina, M.; Pimentel, R.; Masis, R.; Hernandez, F.; Lara, B.; Montoya, R.; Jubithana, B.; Melchor, A.; Alvarez, A.; Aldighieri, S.; Dye, C.; Espinal, M.A. "**Zika virus and the Guillain-Barré syndrome - case series from seven countries.**" *N. Engl. J. Med*. (2016) 375:1598–1601.

Duffy, M.R.; Chen, T.H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M. Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C. "**Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia**." *N. Engl. J. of Med.* (2009) 360.24:2536-2543.

Faye, O.; Faye, O.; Dupressoir, A.; Weidmann, M.; Ndiaye, M.; Amadou Alpha Sall, A.A. "**One-step RT-PCR for detection of Zika virus**." *J. of Clin. Virol.* (2008) 43.1:96-101.

Faye, O.; Faye, O.; Diallo, D.; Diallo, M.; Manfred Weidmann, M.; Sall, A.A. "**Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes**." *Virol. J.* (2013) 10.1:311-318.

Faye, O.; Freire, C.C.M.; Iamarino, A.; Faye, O.; Oliveira, J.V.C.; Diallo, M.; Paolo M. A. Zanotto, P.M.A.; Sall, A.A. "**Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century**." *PLoS neg. trop. Dis.* (2014) 8.1:e2636.

Figueiredo, L.T.M. "**Emergent arboviruses in Brazil.**" *Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.* (2007) 40.2:224-229.

Forterre, P. "**Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept.**" *Intervirol.* (2010) 53.5:362-378.

Glushakova, L.G.; Alto, B.W.; Kim, M.S.; Wiggins, K.; Eastmond, B.; Moussatche, P.; Burkett-Cadena, N.D.; Benner, S.A. "**Optimization of cationic (Q)-paper for detection of arboviruses in infected mosquitoes**." *J. of virol. Meth.* (2018).

Gourinat, A.C.; Olivia O'Connor, O.; Calvez, E.; Goarant, C.; Dupont-Rouzeyrol M. "**Detection of Zika virus in urine**." *Emerg. Infec. Dis.* (2015) 21.1:84-86.

Grard G.; Caron M.; Mombo I.M.; Nkoghe D.; Mboui Ondo S.; Jiolle D.; Fontenille D.; Paupy C.; Leroy E.M. "**Zika virus in Gabon (Central Africa) – 2007: a new threat from Aedes albopictus?**" *PLoS negle. Trop. Dis.* (2014) 8.2:e2681.

Guedes D.R.; Paiva M.H.; Donato M.M.; Barbosa P.P.; Krokovsky L.; Rocha S.W.D.S; Saraiva K.; Crespo M.M.; Rezende T.M.; Wallau G.L.; Barbosa R.M.; Oliveira C.M.; Melo-Santos M.A.; Pena L.; Cordeiro M.T.; Franca R.F.O.; Oliveira A.L.; Peixoto C.A.; Leal W.S.; Ayres C.F. "**Zika virus replication in the mosquito Culex quinquefasciatus in Brazil.**" *Emerg. Microb. & infec.* (2017) 6.8:e69.

Haddow, A.D.; Woodall, J.P. "**Distinguishing between Zika and Spondweni viruses. Bull World Health Organ**". *Bull World Health Organ* (2016) 94: 711–711A.

Hills, S.L.; Russell, K.; Hennessey, M.; Williams, C.; Oster A.M.; Fischer, M.; Mead, P. "**Transmission of Zika virus through sexual contact with travelers to areas of ongoing transmission—continental United States, 2016**." MMWR. Morbidity and mortality weekly report (2016) 65.8:215-216.

Hui, Y.; Wu, Z.; Qin, Z.; Zhu, L.; Liang, J.; Li, X.; Fu, H.; Feng, S.; Yu, J.; He, X.; Lu, W.; Xiao, W.; Wu, Q.; Zhang, B.; Zhao, W.; "**Micro-droplet Digital Polymerase Chain Reaction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Technologies Provide Highly Sensitive and Accurate Detection of Zika Virus**." *Virol. Sin.* (2018) 33.3:270-277.

Ioos, S.; Mallet, H.P.; Goffart, I.L.; Gauthier, V.; Cardoso, T.; Herida, M. "**Current Zika virus epidemiology and recent epidemics.**" *Med. et mal. Infec.* (2014) 44.7:302-307.

Kauffman EB, Kramer LD. "**Zika virus mosquito vectors: competence, biology, and vector control.**" *The J. of infec. Dis.* (2017) 216.10:S976-S990.

Kindhauser, M.K.; Allen, T.; Frank, V.; Santhana, R.S.; Dye, C. "**Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus.**" *Bull. of the World Health Org.* (2016) 94.9:675-690.

KNIPE, D. M. et al. Fields virology. 6th. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. Capitulo 2 p 21.

Koppolu, V.; Raju, T.S. "**Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options**." *J. of neurovirol.* (2018) 24.3:255-272.

Kuno, G. "**Host range specificity of flaviviruses: correlation with in vitro replication**." *J. of med. Ento.* (2007) 44.1:93-101.

Kuno, G.; Chang, G.J.J. "**Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses**." *Arch. of virol.* (2007) 152.4:687-696.

Lanciotti, R.S.; Calisher, C.H.; Gubler, D.J.; Chang, G.J.; Vorndam, A.V. "**Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.**" *J. of clin. Microbiol.* (1992) 30.3:545-551.

Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. "**Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007**." *Emerg. infec. Dis.* (2008) 14.8:1232-1239.

Lee, E.J; Schmittgen, T.D. "**Comparison of RNA assay methods used to normalize cDNA for quantitative real-time PCR**." *Analyt. Biochem.* (2006) 357.2:299-301.

Lee, I.; Bos, S.; Li, G.; Wang, S.; Gadea, G.; Desprès, P.; Zhao, R.Y. "**Probing Molecular Insights into Zika Virus–Host Interactions.**" *Viruses* (2018) 10.5:e233.

Lequime, S.; Lambrechts, L. "**Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective.**" *Infec., Gen. and Evol.* (2014) 28:681-690.

Lopes, N.; Nozawa, C.; Linhares, R.E.C. "**Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**." *Rev. Pan-Amazôn. de S.* (2014) 5.3:55-64.

Lwoff, A. "**The concept of virus**." *Microbiol.* (1957) 17.2:239-253.

Macnamara F.N. **Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1954) 48.2:139-145.

Morrison, T.B.; Ma, Y.; Weis, J.H.; Weis J.J. "**Rapid and Sensitive Quantification of Borrelia burgdorferi-Infected Mouse Tissues by Continuous Fluorescent Monitoring of PCR.**" *J. of clin. Microbiol.* (1999) 37.4:987-992.

Musso, D.; Roche, C.; Nhan, T.X.; Robin, E.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.M. "**Detection of Zika virus in saliva.**" *J. of Clin. Virol.* (2015) 68:53-55.

Nayak, S.; Lei, J.; Pekosz, A.; Klein, S.; Burd, I. "**Pathogenesis and molecular mechanisms of Zika virus**." *Sem. in reprod. med.* (2016) 34.5:266-272.

Nunes, M.L.; Carlini, C.R.; Marinowic, D.; Neto, F.K.; Fiori, H.H.; Scotta, M.C.; Zanella, P.L.; Soder, R.B.; da Costa J.C. "**Microcephaly and Zika virus: a clinical and**

epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil." *J. de Ped.* (2016) 92.3:230-240.

Olson, J.G.; Ksiazek, T.G.; Suhandiman; Triwibowo. "**Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia**." *Trans. of the R. Soc. of Trop. Med. and Hyg.* (1981) 75.3:389-393.

Ooi, E.E.; Wilder-Smith, A.; Ng, L.C.; Gubler, D.J. "**The 2007 dengue outbreak in Singapore.**" *Epidemiol Infect.* (2010) 138.7:958-959.

Otto, T.D..; Vasconcellos, E.A.; Gomes, L.H.; Moreira, A.S.; Degrave, W.M.; Mendonça-Lima, L.; Alves-Ferreira, M. "**ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility.**" *Genet Mol Res* (2008) 7.3:861-71.

Paixão, E.S.; Barreto, F.; Teixeira, M.G.; Costa, M.C.; Rodrigues, L.C. "**History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: a systematic review**." *Am J Public Health*. (2016) 106.4:606–612.

Pan American Health Organization/World Health Organization. **Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2017.** Updated as of 04 January 2018. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017; Pan American Health Organization (www.paho.org) © PAHO/WHO, 2017 Acessado em: 12/08/2018

Petersen, L.R.; Jamieson, D.J.; Powers, A.M.; Honein, M.A. "**Zika virus**." *N Engl J Med.* (2016) 374:1552–1563.

Petersen, E.; Wilson, M.E.; Touch, S.; McCloskey, B.; Mwaba, P.; Bates, M.; Dar, O.; Mattes, F.; Kidd, M.; Ippolito, G.; Azhar, E.I.; Zumla, A. "**Rapid spread of Zika virus in the Americas-implications for public health preparedness for mass gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games.**" *Inter. J. of Infec. Dis.* (2016) 44:11-15.

Putnak, R.; Barvir, D.A.; Burrous, J.M.; Dubois, D.R.; D'Andrea, V.M.; Hoke, C.H.; Sadoff, J.C.; Eckels, K.H. "**Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in Vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys**." *J. of Infec. Dis.* (1996) 174.6:1176-1184.

Pyke, A.T.; Daly, M.T.; Cameron, J.N.; Moore, P.R.; Taylor, C.T.; Hewitson, G.R.; Humphreys, J.L.; Gair, R. "**Imported Zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014.**" *PLoS currents* (2014) 6:1-7.

Raoult, D.; Forterre, P. "**Redefining viruses: lessons from Mimivirus**." *Nat. Rev. Microbiol.* (2008) 6.4:315-320.

Richner, J.M.; Diamond, M.S. "**Zika virus vaccines: immune response, current status, and future challenges**." *Cur. Op. in immune.* (2018) 53:130-136.

Salles, T.S.; Sá-Guimarães, T.E.; Souza, D.F.S.; López, S.B.G.; Alvarenga, E.S.L.; Franco T.A.; Melo, A.C.A.; Soares, M.R.; Ferreira, D.F.; Moreira, M.F. "**Quantitative dengue serotyping: the development of a higher performance method using SYBR Green assay**." *Arch Clin Microbiol* (2017) 8.4:55-67.

Schultz, M.J.; Connor, J.H.; Frydman, H.M. "**Group B Wolbachia strain-dependent inhibition of arboviruses.**" *DNA and cell biol.* (2018) 37.1:2-6.

Shehu, N.Y.; Shwe, D.; Onyedibe, K.I.; Pam, V.C.; Abok, I.; Isa, S.E.; Egah, D.Z. "**Pathogenesis, diagnostic challenges and treatment of zika virus disease in resource-limited settings**." *Niger. Postg. Med. J.* (2018) 25.2:67-72.

Sirohi, D.; Chen, Z.; Sun, L.; Klose, T.; Pierson, T.C.; Rossmann, M.G.; Kuhn, R.J. "**The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus**." *Science* (2016) 352.6284:467-470.

Smit, J.M.; Moesker, B.; Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J. "**Flavivirus cell entry and membrane fusion.**" *Viruses* (2011) 3.2:160-171.

Tappe, D.; Nachtigall, S.; Kapaun, A.; Schnitzler, P.; Günther, S.; Schmidt-Chanasit, J. "**Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014**." *Emerg. Infect. Dis.* (2015) 21.5:911–913.

Thornton, B.; Basu, C. "**Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software.**" *Biochem. and Mol. Biol. Educ.* (2011) 39.2:145-154.

Venter, M. "**Assessing the zoonotic potential of arboviruses of African origin**." *Cur. Op. in virol.* (2018) 28:74-84.

Waggoner, J.J.; Gresh, L.; Mohamed-Hadley, A.; Ballesteros, G.; Davila, M.J.; Tellez, Y.; Sahoo, M.K.; Balmaseda, A.; Harris, E.; Pinsky, B.A. "**Single-reaction multiplex reverse transcription PCR for detection of Zika, chikungunya, and dengue viruses**." *Emerg. Infect. Dis.* (2016) 22.7:1295.

Wahed, A.A.E.; Sanabani, S.S.; Faye, O.; Pessôa, R.; Patriota, J.V.; Giorgi, R.R.; Patel, P.; Böhlken-Fascher, S.; Landt, O.; Niedrig, M.; Zanotto, P.M.; Czerny, C.P.; Sall, A.A.; Weidmann, M. "**Rapid molecular detection of Zika virus in acute-phase urine samples using the recombinase polymerase amplification assay.**" *PLoS curr.* (2017) 9.

Wand, N.I.V.; Bonney, L.C.; Watson, R.J.; Graham, V.; Hewson, R. "**Point-of-care diagnostic assay for the detection of Zika virus using the recombinase polymerase amplification method.**" *J. of Gen. Virol.* (2018) 99.8:1012-1026.

Weaver, S.C.; Reisen, W.K. "**Present and future arboviral threats.**" *Antiv. research* (2010) 85.2:328-345.

World Health Organization. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva: World Health Organization;** 2009. (http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf). Acessado em: 10/04/2018

World Health Organization. **Mental Health. Neurology and Public Health. Guillain–Barré Syndrome (GBS).** 2016 (http://www.who.int/mental_health/neurology/guillain-barre-syndrome/en/). Acessado em: 23/06/2018

World Health Organization. **Fact sheets, Detail, Guillain–Barré Syndrome** 2016 (http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/guillain-barr%C3%A9-syndrome). Acessado em: 23/06/2018

World Health Organization. **Fact sheets, Detail, Zika virus.** 2016 (http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus). Acesso em: 23/06/2018

World Health Organization. **Fact sheets, Detail, Microcephaly,** 2018 (http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly). Acessado em: 24/06/2018

Xu, M.Y.; Liu, S.Q.; Deng, C.L.; Zhang, Q.Y.; Zhang, B. "**Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR.**" *J. of virol. Meth.* (2016) 236:93-97.

Yang, Y.; Wong, G.; Ye, B.; Li, S.; Li, S.; Zheng, H.; Wang, Q1,2, Liang, M.; Gao, G.F.; Liu, L.; Liu, Y.; Bi, Y. "**Development of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction-based assay for broad coverage detection of African and Asian Zika virus lineages.**" *Virol. Sin.* (2017) 32.3:199-206.

Ye, Q.; Liu, Z.Y.; Han, J.F.; Jiang, T.; Li, X.F.; Qin, C.F. "**Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas.**" *Infect., Gen. and Evo.* (2016) 43:43-49.

Zanluca, C.; Melo, V.C.; Mosimann, A.L.; Santos, G.I.; Santos, C.N.; Luz, K. "**First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil**." *Mem. do Inst. Osw. Cr.* (2015) 110.4:569-572.

Zuanazzi, D.; Arts, E.J.; Jorge, P.K.; Mulyar, Y.; Gibson, R.; Xiao, Y.; Bringel Dos Santos, M.; Machado, M.A.A.M.; Siqueira, W.L. "**Postnatal identification of Zika virus peptides from saliva**." *J. of dent. Res.* (2017) 96.10:1078-1084.