



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO REIS VELLOSO – PARNAÍBA
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

PHILIFE VERAS PIRES

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES E DETECÇÃO DE *West Nile virus* EM PACIENTES SINTOMÁTICOS NO ESTADO DO PIAUÍ

PARNAÍBA- PI

2019

PHILIPPE VERAS PIRES

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES E DETECÇÃO DE *West Nile virus* EM PACIENTES SINTOMÁTICOS NO ESTADO DO PIAUÍ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado Universidade Federal do Piauí como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

PARNAÍBA- PI
2019

PHILIFE VERAS PIRES

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES E DETECÇÃO DE *West Nile virus* EM PACIENTES SINTOMÁTICOS NO ESTADO DO PIAUÍ

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Piauí como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

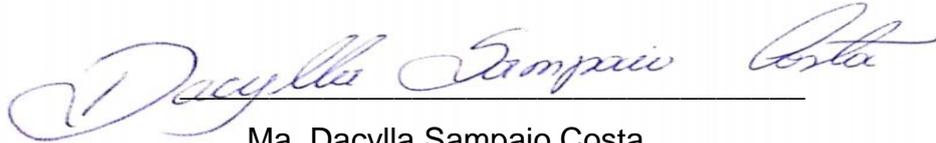
Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira.

APROVADO EM: 10/12/19

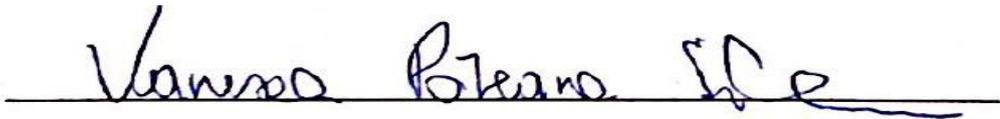
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira (Orientador)
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso - PI



Ma. Dacylla Sampaio Costa
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso-PI



Ma. Vanessa Poleana Silva
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso-PI

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pela força e coragem que me impulsionou no decorrer desses anos de graduação.

Aos meus pais, José Eldo e Nazaré, pelo amor, carinho e incentivo que sempre me ofereceram. À minha irmã, por sempre estar comigo em todos os momentos, me apoiando em tudo que preciso. Vocês sempre serão meus maiores incentivadores, Sempre vou amar vocês!

Aos meus amigos, Ana Clara Matos e Guilherme Rodrigues, pelo companheirismo de longa data e por não deixar os quase 900km de distância atrapalharem nossa amizade, tendo sempre uma maneira de nos reunirmos, nem que seja jogando uma partida de PUBG. Contem sempre comigo!

A todos meus familiares que contribuíram para essa conquista, em especial aos meus avós Helena Veras e Francisco Veras, que estavam sempre dispostos a me ajudar.

Aos amigos que conquistei durante a vida acadêmica, Naira Celeste por sempre me apoiar nas horas em que as disciplinas apertavam, me dando apoio e incentivo.

Aos Mestres, Silveny Meiga, Julianna Queiroz, Emanuela Barros e Thiago Gomes por todo auxílio, e por serem exemplos de dedicação que levarei por toda vida.

Às minhas amigas do laboratório BIOMIC, Dacylla Sampaio, Jaiane Cruz e Vanessa Poleana pelos momentos de risadas e choros compartilhados, por sempre estarem disponíveis e dispostas a ajudar e acima de tudo pela amizade verdadeira e sincera. Sentirei falta de vocês!

À Prof^a. Dra. Anna Carolina Pereira por todas as oportunidades disponibilizadas, pela sua competência como profissional, sempre transmitindo paz e tranquilidade aos alunos. Você sempre será um exemplo em minha vida!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira, pela oportunidade concedida de ingressar na área científica, pela competência e paciência, pelos ensinamentos e críticas visando meu crescimento profissional.

A todos professores do curso de Biomedicina que passaram aprendizados em suas áreas, contribuindo muito para a minha formação profissional.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí (UFPI) e CNPq pela concessão de bolsa de Iniciação Científica.

E a todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista, o meu muito obrigado!

RESUMO

Os arbovírus são compostos por centenas de vírus transmitidos por vetores artrópodes. Esses vírus causam grande preocupação na saúde pública no mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais, onde muitos deles são responsáveis por uma elevada taxa de incidência e morbimortalidade. O *West Nile vírus* (WNV) é um arbovírus de grande importância clínica, pois é causador da febre do Nilo ocidental. Apesar da maioria dos casos de WNV serem assintomáticos, este vírus pode ser capaz de causar sérias doenças em humanos, como a encefalite, podendo levar o indivíduo à óbito. O Piauí é um estado brasileiro com condições climáticas favoráveis para a disseminação de diversas arboviroses, apresentando os únicos quatro casos para WNV no Brasil. Suspeita-se que muitos casos de WNV sejam subestimados e erroneamente diagnosticados devido a suas manifestações iniciais serem muito semelhantes à de outros arbovírus e por apresentar reatividade cruzada com vírus relacionados filogeneticamente, sendo difícil fazer sua diferenciação por testes sorológicos. Por este motivo, este estudo objetivou Investigar, através de métodos moleculares, a possível circulação de *West Nile virus* durante os anos 2016-2019 no Estado do Piauí. Para detecção de WNV, foram construídos iniciadores com base na amplificação do gene *E*, além de padronizar testes de técnicas moleculares descrita como Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) visando a amplificação das regiões *C/prM* e *E* do vírus em estudo. Concomitantemente com as padronizações foram coletadas e selecionadas 106 amostras com sintomatologia para arbovírus, com período de viremia entre 2-7 dias e que apresentaram resultado negativo para outros arbovírus por sorologia e técnicas moleculares. Os testes com as amostras não apresentaram amplificação do genoma viral, entretanto isso não indica que este vírus não está circulando, tendo em vista os casos detectados no estado. Um dos motivos que podem contribuir para as baixas detecções deste vírus é a imunidade cruzada causada por outros flavivírus. O presente estudo também obteve êxito na padronização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em tempo real (qPCR) para amplificação da região *3'-UTR* do WNV, visando ampliar e aprimorar a capacidade de detecção deste vírus, sendo possível posteriormente quantificar o cDNA viral nas amostras correlacionando com a progressão dos sintomas e formas atípicas da infecção. Estudos complementares baseado no diagnóstico diferencial dos arbovírus devem ter continuidade, pois irão informar o real número de casos destes vírus, ajudando assim a vigilância epidemiológica a tomar medidas cabíveis no controle vetorial prevenindo possíveis surtos e epidemias na população piauiense.

Palavras-chaves: Arbovírus; Febre do Nilo ocidental; Encefalite; Diagnóstico molecular. Piauí

ABSTRACT

Arboviruses are composed of hundreds of viruses transmitted by arthropod vectors. These viruses cause major public health concern worldwide, particularly in tropical and subtropical areas, where many of them are responsible for a high morbidity and mortality rate. West Nile virus (WNV) is an arbovirus of great clinical importance because it causes West Nile fever. Although most cases of WNV are asymptomatic, this virus may be capable of causing serious diseases in humans, such as encephalitis, and may lead to death. Piauí is a Brazilian state with favorable weather conditions for the spread of several arboviruses, presenting the only four cases for WNV in Brazil. Many cases of WNV are suspected to be underestimated and misdiagnosed because their initial manifestations are very similar to other arboviruses and because they are cross-reactive with phylogenetically related viruses, making it difficult to differentiate by serological tests. For this reason, this study aimed to investigate, through molecular methods, the possible circulation of West Nile virus during the years 2016-2019 in the State of Piauí. Primers were constructed to amplify the E gene, as well as standardize TR-PCR assays to amplify the WNV C / prM and E regions. Concomitantly with the standards were collected and selected 106 samples with symptoms for arbovirus, with a viremia period between 2-7 days and which were negative for other arboviruses by molecular techniques. The tests with the samples did not show viral genome amplification, however this does not indicate that this virus is not circulating, considering the detected cases in the state. One of the reasons that may contribute to the low detection of this virus is the cross immunity caused by other flaviviruses. The present study also succeeded in standardizing the qPCR technique for WNV RTU amplification, in order to broaden and improve the detection capacity of this virus, and it was possible to quantify the viral cDNA in the samples, correlating with the progression of atypical symptoms and forms. infection. Further studies based on the differential diagnosis of arboviruses should be continued, as they will inform the actual number of cases of these viruses, thus helping epidemiological surveillance to take appropriate vector control measures to prevent possible outbreaks and epidemics in the Piauí population.

Keywords: Arbovirus. west nile fever. Encephalitis. Molecular diagnostics. Piauí

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Organização genômica dos flavivírus, mostrando suas proteínas estruturais (C; M; E) e não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). 13
- Figura 2** - Ciclo enzoótico do WNV, circulando na natureza entre mosquitos e aves. Mosquitos infectados transmitem o vírus através da picada para aves que são capazes de produzir alto nível de viremia tendo a capacidade de transmitir para outros mosquitos. Mosquitos também podem infectar pessoas e cavalos que são considerados hospedeiros acidentais por não desenvolver alto nível de viremia, não podendo assim transmitir para outros mosquitos..... 16
- Figura 3** - Comparação de métodos diretos e indiretos quando sua especificidade e oportunidade..... 18
- Figura 4** - Título de anticorpos durante infecção primária e secundária..... 19
- Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (2000) para o gene *C/prM* em diferentes condições de T_a (55°C-57°C) e ciclagens disponíveis pelo autor. L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos. 29
- Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (2000) para o gene *C/prM* em diferentes condições de T_a (55°C-57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco..... 29
- Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados no laboratório BIOMIC para o gene *E* em diferentes condições de T_a (52°C-57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos. 31
- Figura 8** - Curva de amplificação dos testes. A: teste 1 com concentração de 450nM de iniciadores; B: teste 2 com concentração de 400nM de iniciadores; C: teste 3 com concentração de 350nM de iniciadores. 32
- Figura 9** – A: curva padrão do teste 1; B: curva padrão do teste 2; C: curva padrão do teste 3. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores desenvolvidos por Lanciotti e colaboradores (2000) para amplificação das regiões de interesse nos genes <i>C/prM</i> de WNV e tamanho do produto.....	23
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores desenhando no laboratório para amplificação da região de interesse no gene <i>E</i> do WNV e tamanho do produto.....	25
Tabela 3 - Sequência dos iniciadores desenvolvidos por Del amo e colaboradores (2013) para amplificação da região de interesse do WNV e tamanho do produto.	26
Tabela 4 - Quantidade de reagente utilizados nos testes para a qPCR.	27
Tabela 5 – Tabela com parâmetros utilizados para padronização da técnica de qPCR.	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BIOMIC – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Micro-organismos e Plantas

C - Capsídio

CDC – Center of Disease Control

cDNA – DNA complementar

CHIKV – *Chikungunya virus*

DENV – *Dengue virus*

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

E – Envelope

ELISA – Teste imunoenzimático (do inglês Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay")

GelRed – Gel corante de ácido nucleico

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

KB - Kilobases

MAYV – *Mayaro virus*

MMLV – Enzima com atividade de Transcriptase Reversa (do inglês “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”)

MMLV- RT – Enzima com atividade de Transcriptase Reversa (do inglês “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase”)

ORF - Matriz de Leitura Aberta (do inglês “Open Reading Frame”)

OROV – *Oropouche vírus*

Pb – Pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)

prM – Pré-membrana

qPCR - PCR quantitativo em tempo real (do inglês “Polymerase chain reaction quantitative real time”)

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction”)

SESAPI - Secretaria de Estado da Saúde do Piauí.

SLEV – *Encefalite Saint Louis virus*

UTR - Região não traduzida (do inglês “Untranslated region”)

WNV- *West Nile vírus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Arbovírus	11
2.2 Flavivirus	12
2.2.1 <i>West Nile Virus</i>	13
2.3 Diagnóstico laboratorial	16
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Aspectos éticos e legais	22
4.2 Coleta de Amostras e obtenção dados clínicos e laboratoriais dos pacientes	22
4.3 Diagnóstico molecular	22
4.3.1 Extração do RNA Viral e Transcrição Reversa (RT)	22
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
4.3.2.1 Padronização de reação para amplificação dos genes <i>C/prM</i>	23
4.3.3 Desenho de iniciadores e padronização de reação para amplificação do gene <i>E</i> do WNV	24
4.3.4 Visualização produtos amplificados	25
4.3.5 Padronização de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).26	
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	43
ANEXO I- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	43
ANEXO II- FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS	45

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são um conjunto composto por centenas de vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos (LOPES et al., 2014). Esses vírus causam grande preocupação em saúde pública no mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais onde muitos deles são responsáveis por elevadas taxas de morbimortalidade. Diversos fatores, como mutações genéticas inerentes aos vírus, o processo de globalização, mudanças climáticas, aumento das viagens internacionais propiciam a emergência e reemergência dessas doenças infecciosas (GUBLER, 2002; FIGUEIREDO, 2007; LIMA-CAMARA, 2016; BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2016).

No Brasil, grande parte desses arbovírus estão emergindo e circulando por todo o país, dentre eles, destacam-se o *Dengue virus* (DENV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Zika virus* (ZIKV) que são responsáveis em causar grandes epidemias a nível mundial (WEAVER; REISEN, 2011). Entretanto, outros vírus como o *West Nile virus* (WNV), *Saint Louis encefalite virus* (SLEV) e *Mayaro virus* (MAYV) estão circulando e emergindo pelo território brasileiro (MARTINS et al., 2019; ROCCO et al., 2005; LIMA-CAMARA, 2016).

O WNV é um arbovírus de grande importância clínica, pois é causador da febre do Nilo ocidental (LANCIOTTI et al., 2000; DAVID, ABRAHAM, 2016). Este vírus chegou na América pelos Estados Unidos no ano de 1999 na cidade de Nova York, causando um surto de encefalite na região e desde então, expandiu-se para várias regiões, onde houve relatos de sua existência na América do Sul (GRAY, WEBB, 2014; CHANCEY et al., 2014). O primeiro relato da circulação de WNV no Brasil ocorreu em 2009 no Pantanal - MS, a partir da detecção em equino e em 2014 foi registrado o primeiro caso em humano no estado do Piauí, ambos confirmados por testes sorológicos (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; VIEIRA et al., 2015). Subsequentemente, três casos adicionais em humanos foram detectados pela Secretaria de Estado da Saúde do Piauí (SESAPI), no estado entre o período de 2017 a 2019, o que destaca sua possível circulação em regiões próximas. Este vírus é transmitido principalmente por vetores *Culex* spp, comumente encontrado no Brasil, sendo assim este apresenta um enorme potencial em causar surtos no território brasileiro, tendo em vista o clima tropical e a existência de pássaros capazes de ampliar sua disseminação (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011; MELANDRI et al., 2012; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014; VIEIRA et al., 2015; MARTINS et al., 2019). Apesar da maioria dos casos de WNV serem assintomáticos, este vírus pode ser capaz de

causar alterações neurológicas graves, caracterizada como encefalite, meningite ou paralisia flácida aguda (MARTINS et al., 2019; VILIBIC-CAVLEK, T. et al., 2019).

O Piauí é um estado brasileiro situado na região Nordeste, com condições climáticas favoráveis para a disseminação de diversas arboviroses, onde destaca-se o DENV. Análises moleculares realizadas no laboratório BIOMIC confirmaram a co-circulação dos 4 sorotipos da DENV durante os anos de 2013 a 2015 (FIGUEIREDO et al., 2014; VIEIRA et al., 2015; GARCÊS, 2016; SANTOS; 2013; VALE; 2015). Estudos realizados por BARROS (2017) e CARDOSO (2018) demonstraram a circulação de CHIKV na cidade de Parnaíba- PI no período compreendido entre 2016 e 2017. Sendo assim, suspeita-se que casos de WNV sejam subestimados e erroneamente diagnosticados devido a suas manifestações iniciais serem muito semelhantes à de outros arbovírus, principalmente com vírus relacionados filogeneticamente por apresentar reatividade cruzada, se tornando difícil diferenciá-los por testes sorológicos.

Portanto, testes moleculares devem ser padronizados e implementados visando um diagnóstico específico para este vírus, tendo em vista o grande potencial que o mesmo tem de acometer o sistema nervoso, trazendo assim sequelas para o paciente e um enorme dano socioeconômico para o país. Além disso, a implementação de metodologias direcionadas à biologia molecular possibilita o diagnóstico diferencial de forma precoce contribuindo assim para o devido manejo clínico do paciente. Dentre as técnicas que serão desenvolvidas no devido trabalho estão a RT-PCR, que visa à amplificação de determinados fragmentos de um genoma de interesse, e também a qPCR, uma técnica que tem enorme importância no diagnóstico por apresentar a quantificação do material genético viral em conjunto com sua amplificação, podendo assim ter mais informações sobre a infecção do paciente, visando um melhor prognóstico para este. A partir da implementação dessas técnicas específicas e sensíveis para o referido vírus, sua detecção será mais eficiente, auxiliando desta forma a vigilância epidemiológica à tomar medidas voltadas para o controle vetorial, prevenindo assim surtos e epidemias na população.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arbovírus

O termo arbovírus deriva do inglês “*arthropod born viruses*” que é utilizado para nomear vírus capazes de causar doenças em humanos e outros animais e que possuem a característica de ser veiculado por artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos). Estes arbovírus são mantidos na natureza por meio de transmissão vertical destes, para hospedeiros susceptíveis (roedores, reptéis, equinos, humanos e outros) (WEAVER; REISEN, 2011; GUBLER, 2002; CONWAY et al., 2014; CLETON et al., 2012).

Os arbovírus estão se expandindo ao longo dos anos e múltiplos fatores são responsáveis por influenciar tanto na sua expansão, quanto na manutenção destes e de seus vetores na natureza, como mutações genéticas do vírus, urbanização desordenada, desmatamento, alterações climáticas, precárias condições de saneamento básico, viagens internacionais e movimento migratório de algumas aves (HAYES et al., 2005; FIGUEIREDO, 2007; GUBLER, 1998; GUZMAN et al., 2016).

Atualmente, os arbovírus correspondem a 30% de doenças infecciosas causadas em humanos no mundo todo (COSTA et al., 2018). Existe relato destes vírus em todos os continentes, exceto na região da Antártida devido às suas condições climáticas (LOPES et al., 2014). As principais ocorrências acontecem em regiões de clima tropical e subtropical, em que o ciclo de transmissão se mantém constante durante todo o ano. Entretanto, estes vírus também estão presentes em países de clima temperado, embora, a reprodução de insetos vetores tenha uma pausa durante o inverno sendo reiniciada durante o verão (WEAVER e REISEN, 2011; CASSEB et al., 2013; LIANG et al., 2015).

O Brasil é um país tropical, onde existe uma fauna e flora muito diversificada que proporciona condições ideais para existência e adaptação de muitos arbovírus, tendo a introdução e subsequente disseminação dos quatro sorotipos do DENV desde 2008 e a posterior introdução do ZIKV e CHIKV durante os anos 2013-2014 causando surtos de febre, artralgia, distúrbios congênitos e outros associados a essas arboviroses (COSTA et al., 2018; DONALÍSIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; NUNES et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). Dentre as principais famílias de arbovírus circulantes no Brasil podemos destacar a família *Flaviviridae* (*Febre amarela virus*- YFV, *Dengue virus* – DENV, *Zika virus* – ZIKV, *Saint Louis encefalite virus* - SLEV e *West Nile virus*

- WNV), *Togaviridae* (*Chikungunya virus* – CHIKV e *Mayaro virus* - MAYV) e *Bunyaviridae* (*Oropouche virus* - OROV) (CASSEB et al., 2013; LIMA-CÂMARA, 2016; NOGUEIRA; ARAUJO; SCHATZMAYR, 2007).

As manifestações clínicas das arboviroses em humanos são em sua grande maioria assintomáticas, podendo levar a um grande problema em doações de sangue, órgãos e tecidos (CLETON et al., 2012; PETERSEN; BRAULT; NASCI, 2015; BIGGERSTAFF; PETERSEN, 2002; IWAMOTO et al., 2003). Quando presentes seus sintomas são inespecíficos e a maioria semelhante a um resfriado, tornando difícil sua identificação imediata (KOLAWOLE et al., 2018). Essas manifestações podem variar desde doença febril, erupções cutâneas, artralgia até sua progressão para formas mais graves da doença, como alterações neurológicas e hemorrágicas (LOPES et al., 2014).

2.2 Flavivirus

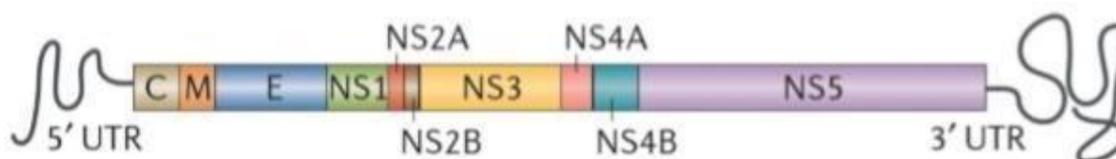
O gênero *Flavivirus* abrange mais de 70 vírus, no qual vários são capazes de causar doenças em humanos e animais (CASSEB et al., 2013; LIMA-CÂMARA, 2016; NOGUEIRA; ARAUJO; SCHATZMAYR, 2007). Estes vírus necessitam de mosquitos para sua transmissão e manutenção na natureza em um ou mais ciclos diferentes, normalmente é necessária a participação de um mosquito, onde o *Aedes* spp e *Culex* spp são os principais, e de um hospedeiro vertebrado para completar os ciclos (HUANG et al., 2014; ZHANG et al., 2003). Outra forma de manutenção do vírus é através da transmissão vertical (via transovariana), onde as fêmeas dos mosquitos infectadas podem transmitir o vírus para sua prole, o que contribui para a disseminação da doença (FIGUEIREDO, 2007; KHIN; THAN, 1983; WEAVER; VASILAKIS, 2009).

Existe uma grande distribuição geográfica dos vírus contidos nessa família e assim como acontece com outros arbovírus, sua localização depende da presença de seu vetor, bem como de fatores ambientais e climáticos (HUANG et al., 2014). Acredita-se que mais da metade da população mundial possa estar em risco de infecção pelo DENV (1-4), causando assim um enorme impacto para a saúde pública, principalmente de países com condições propícias para sua disseminação (FURUYA-KANAMORI et al., 2016).

Os *Flavivirus* são vírus pequenos, icosaédricos e envelopados, que medem cerca de 40-60nm de diâmetro (FERREIRA et al., 2010; ZHANG, 2003). Contém

genoma RNA senso positivo de 10,7kb com uma única matriz de leitura aberta (ORF) franqueada por duas regiões não codificantes (5'-UTR e 3'-UTR) nas extremidades (BLITVICH; FIRTH, 2015; CASTAÑEDA et al., 2017; GUZMAN et al., 2016; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Este único quadro de leitura aberta codifica uma única poliproteína capaz de originar três proteínas estruturais, denominadas: capsídeo (C), pré membrana (prM) e envelope (E), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1) (GUZMAN et al., 2010; MANTEL et al., 2008).

Figura 1 - Organização genômica dos flavivírus, mostrando suas proteínas estruturais (C; M; E) e não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).



Fonte: GUZMAN et al, 2016 – Adaptado

Após a infecção por um flavivírus, é dado início ao seu ciclo de replicação em células permissivas, seguindo a ordem: adsorção, penetração, desnudamento, tradução, replicação, montagem e brotamento das partículas virais. Através da glicoproteína E o vírus consegue entrar em contato com receptores de superfície celular, sendo endocitada e em pH baixo encontrado no interior do endossoma, ocorre modificação no arranjo dos monômeros da glicoproteína E em trímeros, expondo o peptídeo de fusão e permitindo inserção na membrana endossomal que possibilita a penetração e desnudamento do genoma viral na célula hospedeira (PASTORINO et al., 2010; DIAMOND; PIERSON, 2015). A replicação de seu genoma ocorre em dois passos, primeiro o RNA senso positivo é transformado em RNA senso negativo, servindo como molde para síntese de novas fitas senso positivas. As fitas senso positivas podem servir como o próprio genoma viral, bem como ser traduzidas e assim montar novos virions com posterior liberação por exocitose e possibilitar a infecção em novas células hospedeiras permissivas (GUZMAN et al., 2016; ALCARAZ-ESTRADA, MONROY, ANGEL, 2010; DIAMOND; PIERSON, 2015)

2.2.1 West Nile virus

O WNV é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, responsável por causar a febre do Nilo ocidental, doença que se encontra em

expansão no território brasileiro (LIMA- CAMARA, 2016; FLORES, WEIBLEN, 2009). Este vírus pertence ao complexo antigênico do JEV e SLEV apresentando reatividade cruzada em testes sorológicos com vírus deste grupo, assim como outros vírus de sua família (LANCIOTTI et al., 2002).

O WNV foi primeiramente isolado de uma mulher com febre em West Nile, localizado no nordeste de Uganda em 1937 (SAMPATHKUMAR, 2003). A partir de então, no começo de 1950, investigações sorológicas indicaram uma alta prevalência de casos de WNV na Índia e Egito e disseminação deste vírus para países do Oeste Africano (SMITHBURN et al., 1940; MELNICK et al., 1951; BERNKOPF; LEVINE; NERSON, 1953; SMITHBURN; JACOBS, 1942; SMITHBURN et al., 1954). Em 1953, houve um surto em Israel que apontava o WNV como o causador da febre do Nilo Ocidental, uma doença febril até então leve e autolimitada (GOLDBLUM; STERK; PADERSKI, 1954). Os primeiros relatos de doença neuroinvasiva associados ao WNV ocorreram no ano de 1957 em idosos israelenses (CIOTA, 2017).

A circulação do vírus na América ocorreu em 1999, na cidade de Nova York, Estados Unidos, provocando doença em 67 pessoas e causando morte em 21 delas (FLORES, WEIBLEN, 2009). O vírus se estabeleceu no EUA causando em 2002, 4156 casos de infecções em humanos e cursando com 284 óbitos (BEASLEY et al., 2004). Nos anos seguintes, o WNV espalhou-se para estados vizinhos, bem como para outros lugares da América do Norte e no Canadá, além da América Latina (DAVID; ABRAHAM, 2016). Na América do Sul, o vírus foi isolado pela primeira vez em 2006 na Argentina em cavalos e no ano de 2008 foi isolado na Colômbia em flamingos criados em cativeiro (LIMA-CAMARA, 2016; MORALES et al., 2006; OSORIO et al., 2012).

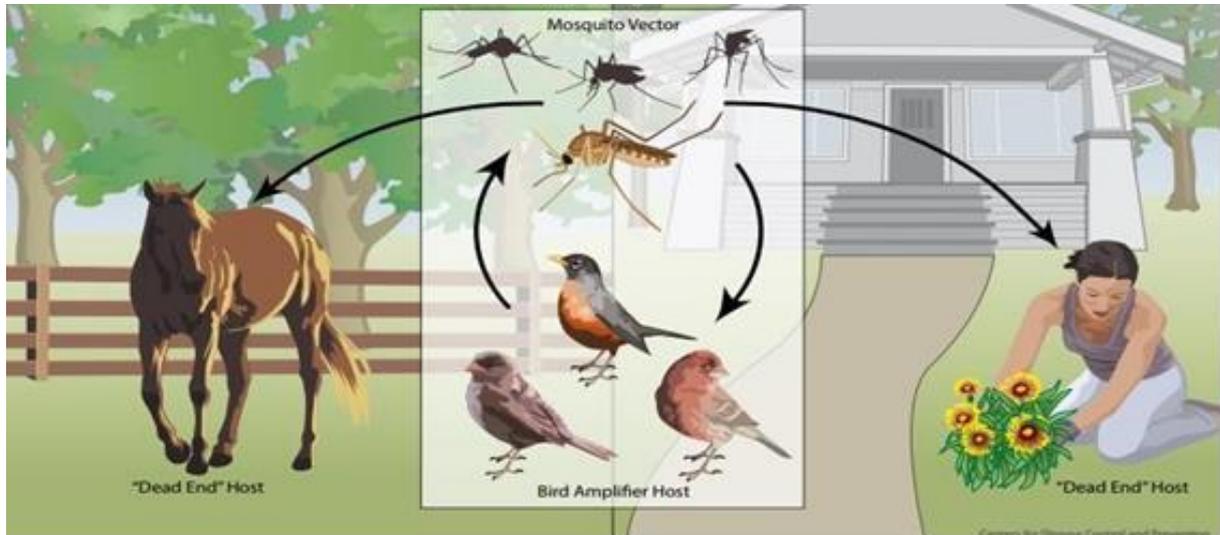
No Brasil, foi detectado anticorpos contra este vírus em equinos na região do Pantanal-MS em 2009, no entanto, não houve o isolamento do vírus (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). O primeiro caso humano de encefalite confirmado no Brasil ocorreu no ano de 2014, no estado do Piauí a partir de exames sorológicos, entretanto, testes moleculares por RT-PCR apresentaram resultado negativo para detecção do genoma viral (VIEIRA et al., 2015). No ano de 2018, houve o isolamento do vírus no Brasil pela primeira vez em equinos no estado do Espírito Santo. Análises filogenéticas do genoma demonstraram que este vírus isolado pertencia a linhagem 1, clado 1a, além de ter maior similaridade genética com linhagens Norte-Americanas, bem como as da América Central e do Sul (MARTINS et al., 2018). Além disso em 2019 houve a

confirmação de três casos, dois deles eram suspeitos em amostras de 2017 e foram confirmados pela Secretaria de Estado da Saúde do Piauí (SESAPI), o primeiro em fevereiro na cidade de Picos – PI e em julho foi confirmado o segundo na cidade de Piripiri – PI, este último caso culminou com a morte de uma paciente idosa, sendo o primeiro caso de óbito de uma pessoa relacionado à este vírus no Brasil. O terceiro caso também foi confirmado pela SESAPI em 15 de outubro em uma paciente de Teresina – PI que apresentou quadro agudo encefalite, provando assim a circulação deste vírus no estado do Piauí.

Estudos moleculares com base em análises filogenéticas mostraram que os vírus são caracterizados e divididos em até nove linhagens distintas, nas quais as mais relevantes são as linhagens 1 e 2, principalmente por sua grande associação ao desenvolvimento de manifestações neurológicas, como a encefalite (FALL et al., 2017). A linhagem 1 é dividida em três clados: 1a, 1b e 1c. No clado 1a, existe isolados da África, Europa, Oriente Médio, Rússia e Américas. O clado 1b enquadram-se isolados do vírus em Kunjin (KUNV), um subtipo de WNV isolado na Austrália. O clado 1c contém isolados da Índia (MAY et al., 2010). Os isolados da linhagem 2 inicialmente eram encontrados apenas na África Subsaariana e em Madagascar, entretanto, nos anos de 2004 e 2005 foram isolados vírus pertencentes a linhagem 2 em aves na Hungria, sendo a sua primeira detecção na Europa (MAY et al., 2010; PETERSEN; BRAULT; NASCI, 2015).

Este vírus tem como hospedeiros amplificadores as aves, sendo mantido no ambiente por ciclos enzoóticos de infecção mosquito-ave, onde mosquitos hematófagos adquirem o vírus ao realizar o repasto sanguíneo em aves virêmicas, podendo assim transmitir o vírus acidentalmente para outros seres vertebrados (MAY et al., 2011; PETERSEN; BRAULT; NASCI, 2015). Os seres humanos, assim como outros mamíferos não desenvolvem uma elevada viremia e são considerados hospedeiros acidentais, sendo assim, possuem uma menor importância no ciclo de transmissão (CONWAY et al., 2014; PETERSEN; BRAULT; NASCI, 2015; SAMPATHKUMAR, 2003). Outras formas menos comuns de transmissão deste vírus são descritas na literatura, como transfusão de sangue, transplante de órgãos, além de possível transmissão pelo leite materno (CDC – 2002a; CDC, 2002b; CDC, 2002c; DALOVISIO, 2003).

Figura 2 - Ciclo enzoótico do WNV, circulando na natureza entre mosquitos e aves. Mosquitos infectados transmitem o vírus através da picada para aves que são capazes de produzir alto nível de viremia tendo a capacidade de transmitir para outros mosquitos. Mosquitos também podem infectar pessoas e cavalos que são considerados hospedeiros acidentais por não desenvolver alto nível de viremia, não podendo assim transmitir para outros mosquitos.



Fonte: CDC, 2018 – Adaptado.

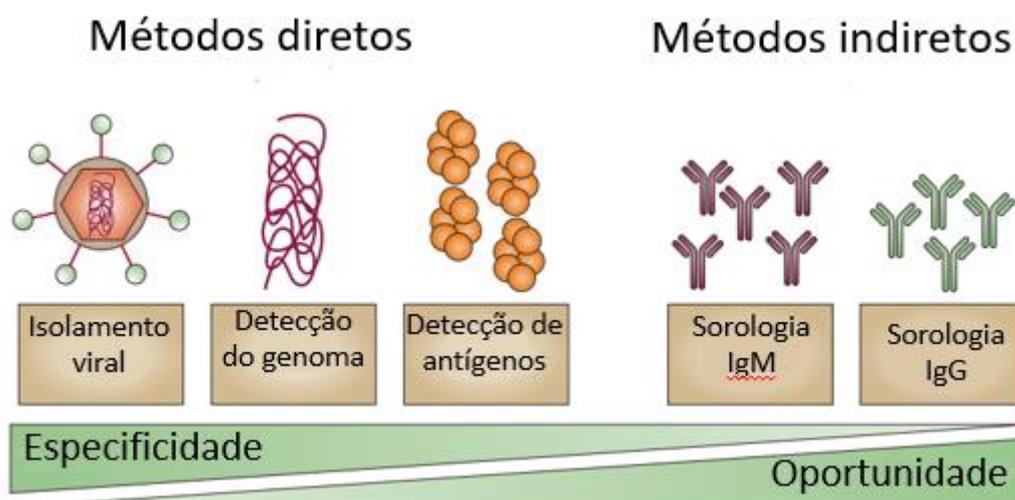
A patogênese e os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta contra WNV não estão completamente elucidados (SUNTHAR; DIAMOND; GALE, 2013). Entretanto, é possível afirmar que pessoas imunossuprimidas e idosos possuem uma maior predisposição ao desenvolvimento de formas graves da doença, quando comparados com indivíduos imunocompetentes (VERSTREPEN et al., 2014). A maioria dos humanos infectados são assintomáticos e cerca de 20% desenvolvem sintomatologia relacionada ao WNV, caracterizada como síndrome febril, associada a fraqueza, mialgia e fadiga (VILIBIC-CAVLEK et al., 2019; VERSTREPEN et al., 2014). Destes, menos de 1% progridem para a forma neuroinvasiva da doença, resultando em meningite, encefalite ou paralisia, o que muitas das vezes pode levar o indivíduo a óbito (VERSTREPEN et al., 2014). Após a fase aguda, pacientes infectados com este vírus podem apresentar cronicidade para alguns sintomas. Cerca de 40% dos pacientes apresentam fraqueza muscular, perda de concentração confusão e tonturas por um ano ou até uma década após a infecção (POTOKAR; JORGACEVSKI; ZOREC, 2019; KLEE et al., 2004)

2.3 Diagnóstico laboratorial

A circulação de diversos arbovírus em uma determinada região favorecer a uma maior incidência de casos, aumentando a procura por serviços de saúde. Sendo assim, é importante o diagnóstico clínico-laboratorial preciso visando o monitoramento

desses vírus, bem como correto manejo clínico dos pacientes (CHARREL, 2016). Nessa circunstância, é importante salientar que o diagnóstico clínico é dificultado devido à sintomas inespecíficos ocasionados por estes vírus o que pode interferir no diagnóstico diferencial (BRONZONI et al., 2005; MORELI e COSTA, 2013). Atualmente, métodos como o isolamento viral, detecção de RNA do vírus, e testes sorológicos, sejam eles direto (detectando antígenos/vírus/genoma) ou indiretos (detectando anticorpos) são de extrema importância para investigação destes arbovírus (PEELING et al., 2010). Durante a fase virêmica da infecção são utilizados métodos diagnósticos diretos, visando detectar o vírus, componentes estruturais ou genômicos dele na amostra, no fim da fase aguda são indicados métodos indiretos, detectando anticorpos produzidos contra o vírus, sendo útil na fase tardia da doença, como observado na figura 3 s(WHO, 2009; PEELING et al., 2010; GONÇALVES et al., 2018). Estudos atuais evidenciaram a persistência viral nas amostras de urinas de pacientes infectados por até 21 dias após infecção (BATY et al., 2012; GORCHAKOV et al., 2019). Estes estudos fornecem métodos otimizados para detecção de RNA do WNV na urina e oferecem opções alternativas para testes de diagnóstico durante os estágios agudos do WNV.

Figura 3 - comparação de métodos diretos e indiretos quando sua especificidade e oportunidade.

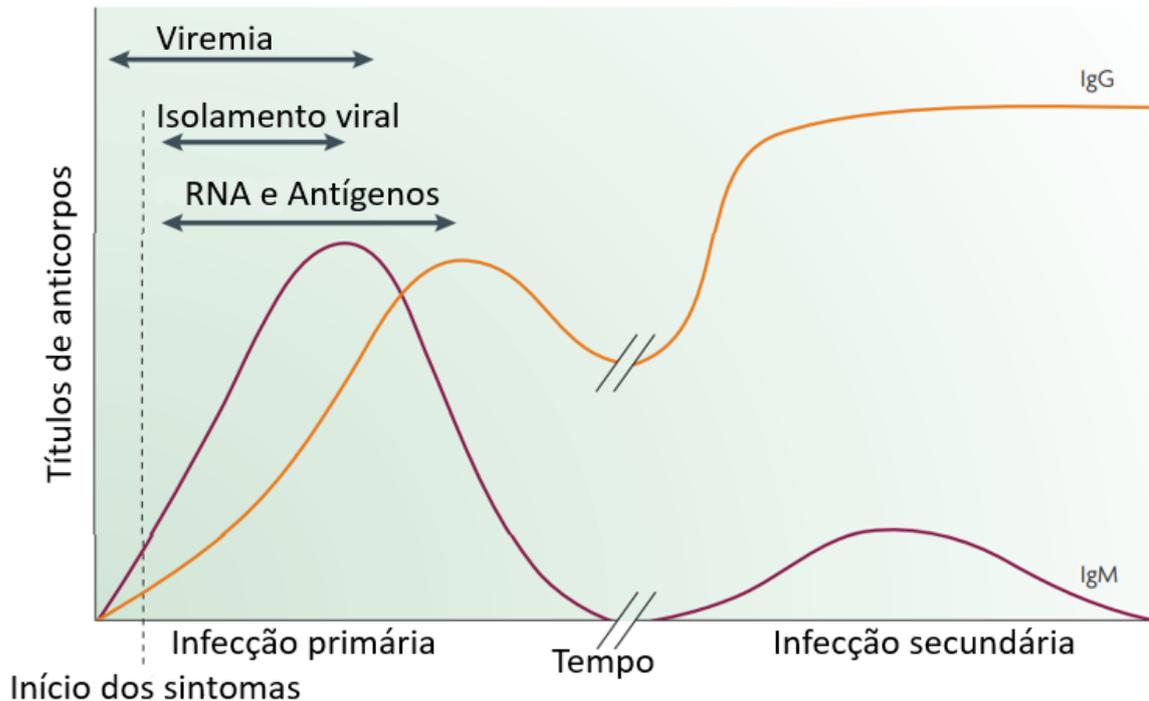


Fonte: PEELING et al., 2010 - Adaptado

O método de isolamento viral é uma técnica específica que permite a identificação do sorotipo viral presente na amostra durante a fase aguda da infecção,

podendo ser utilizadas amostras de soro, plasma, sangue total e tecidos infectados (PEELING, 2010; MALAVIGE et al., 2004). Apesar de sua elevada especificidade, este método não é realizado na rotina laboratorial devido seu alto custo e necessidade de profissionais capacitados. Sendo assim, os testes sorológicos são mais comumente utilizados na rotina laboratorial principalmente para triagens, devido seu baixo custo e fácil utilização quando comparados com técnicas de detecção de RNA viral (LUO et al., 2019). Estes testes apresentam diferentes padrões de respostas de anticorpos quando se trata de uma infecção primária ou secundária, em infecções primárias a imunoglobulina M (IgM) é detectada em 5 dias ou mais após o início da doença e a imunoglobulina G (IgG) é geralmente detectada a partir de 10-15 dias. Em infecções secundárias, o IgM é detectado mais cedo, porém apresenta baixos títulos quando comparados com infecção primária e o IgG presente desde a infecção anterior aumenta rapidamente seus títulos de anticorpos (PEELING, 2010; GUZMAN; HARRIS, 2015) (Figura 4). Dentre os testes sorológicos mais utilizados podemos destacar o ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e testes imunocromatográficos. como ponto negativo, esses testes podem apresentar reatividade cruzada de anticorpos com antígenos de outros vírus e também apresentar resultados falso-negativos (nos primeiros dias de infecção) (CHARREL, 2016; GRANGER et al., 2017).

Figura 4 - Título de anticorpos durante infecção primária e secundária.



Fonte: PEELING et al., 2010.

As técnicas moleculares são eficazes para o diagnóstico precoce das arboviroses devido sua sensibilidade e especificidade na detecção do genoma viral, sendo bastante utilizadas em laboratórios de referência e pesquisa (GUZMAN; HARRIS, 2015; MALAVIGE et al., 2004; MORELI, COSTA, 2013; PEELING et al., 2010). O teste molecular implementado para confirmação das arboviroses é definido como RT-PCR capaz de amplificar uma determinada região do genoma viral após poucos dias de infecção utilizando um par de iniciadores específicos para o vírus de interesse (MORELI; COSTA, 2013; BRONZONI et al., 2005; LANCIOTTI et al., 1992). Na atualidade existem diversos protocolos de RT-PCR desenvolvidos para a detecção de arbovírus, podendo ser utilizadas amostras de soro, plasma, urina, leite, LCR e outras para realização dos testes (GUZMAN; HARRIS, 2014; BARKHAM et al., 2016). Outro teste molecular recentemente implementado foi a qPCR, que apresenta uma maior sensibilidade, além de uma melhor quantificação quando comparado ao método convencional (SANTIAGO et al., 2018). Seu primeiro relato ocorreu em 1993 por Higuchi, utilizando como intercalante do DNA o Brometo de Etídio, e um termociclador modificado capaz de captar a fluorescência emitida pelo intercalante, desta forma um gráfico é formado ao passar dos ciclos. Nesse gráfico vai existir o *threshold* (limiar) definido pelo próprio software acima da baseline (ruído), a partir deste dado pode-se

obter o *cycle threshold* (Ct) caracterizado como o ciclo em que a fluorescência emitida ultrapassa o limiar, podendo correlacionar a quantidade de produto da qPCR com o aumento da fluorescência. Atualmente essa técnica foi aprimorada mantendo o mesmo princípio, entretanto, são utilizados comumente corantes intercalates ou sondas marcadas com corantes fluorescentes, onde o SYBR™ Green e sonda TaqMan®, respectivamente são as escolhas de preferência.

Desta forma, observa-se a importâncias de todos os testes apresentados, desde de testes mais simples como os sorológicos à técnicas que exigem um maior conhecimento como a qPCR, variando sua utilização de acordo com o período de infecção do paciente, onde métodos diretos terão uma maior especificidade porém uma menor acessibilidade e métodos indiretos uma menor especificidade, porém maior acessibilidade como observado na figura 4.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar, através de métodos moleculares, a possível circulação de *West Nile virus* durante os anos 2016-2019 no Estado do Piauí

3.2 Objetivos específicos

- Construir iniciadores e padronizar a técnica RT-PCR para detecção do WNV;
- Padronizar a técnica de qPCR para quantificação de WNV;
- Detectar a circulação de WNV por RT-PCR em amostras de soro de pacientes com sintomatologia sugestiva de arboviroses.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

Atendendo as diretrizes da Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde, que tratam das diretrizes e normas para pesquisa envolvendo seres humanos, o presente estudo foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí e aprovado sob o código CAAE: 46111615.0.0000.5214.

4.2 Coleta de Amostras e obtenção dos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes

Foram coletadas amostras de soro de pacientes voluntários com sintomatologia característica de arboviroses durante o ano de 2017, nas seguintes instituições de saúde: Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA), LACEN e no Pronto Socorro Municipal, na cidade de Parnaíba (PSM). Todas as amostras foram direcionadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos e Plantas (BIOMIC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Reis Velloso, para que fossem devidamente conservadas em freezer à - 70° C, para posterior processamento e realização de testes moleculares.

Após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I) pelos pacientes ou seus representantes legais, todas as informações clínicas e laboratoriais foram obtidas através de entrevista e aplicação de formulário semi- estruturado (ANEXO II).

4.3 Diagnóstico molecular

4.3.1 Extração do RNA Viral e Transcrição Reversa (RT)

As amostras de soro foram selecionadas após análise de critérios pré-estabelecidos como: manifestações clínicas, data do início dos sintomas e resultados de testes sorológicos, sendo posteriormente submetidas a extração do material genético viral, utilizando o *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, seguindo o protocolo proposto pela fabricante. Após a etapa de extração, o RNA extraído foi submetido a transcriptase reversa (RT-PCR) visando a conversão do RNA viral em cDNA. O protocolo foi realizado utilizando o *Random Hexamers*, que são oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias capazes de se ligar em qualquer região do RNA promovendo assim a síntese de cDNA utilizando a enzima

MMLV-RT (do inglês “*Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase*”). A realização desta reação é feita em duas etapas: na primeira são utilizados: 10µl de RNA molde e 5µl de Random Hexamers (50µM) e incubados no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) à 25°C por 10 min e 70°C por 5 min. Na segunda etapa, foram adicionados 5µl de Tampão da enzima (5X), 5µl de dNTP (10mM) e 1µl de MMLV (200U/µl), sendo novamente incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Durante a execução do presente trabalho, foram padronizados no laboratório, dois protocolos com base na amplificação de diferentes regiões genômicas para detecção de WNV em amostras com sintomatologia compatível com infecção por este arbovírus. Para realização deste procedimento, os iniciadores foram selecionados a partir de busca na literatura, bem como a construção utilizando softwares visando a amplificação da região de *C/prM* e *E* respectivamente, do genoma de WNV.

4.3.2.1 Padronização de reação para amplificação dos genes *C/prM*

Para a amplificação do gene que codifica a região de *C/prM* do WNV, foram realizados três testes utilizando iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (2000), denominados WN22 e WN640c, amplificando um produto de 408pb (Tabela1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores desenvolvidos por Lanciotti e colaboradores (2000) para amplificação das regiões de interesse nos genes *C/prM* de WNV e tamanho do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>C/prM</i>	WN233	TTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTT	408 pb
	WN640c	CAGCCGACAGCACTGGACATTCATA	

Fonte: Autoria própria, 2019.

Os testes foram realizados utilizando as condições de temperatura e ciclagens disponíveis conforme protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (2000). Parâmetros não disponibilizados, como concentração de reagentes, foram utilizados de acordo com adaptações no protocolo definido por Bronzoni e colaboradores (2005). Foram realizados testes, utilizando controle diluído (1:10 e 1:100) nas temperaturas 55°C-57°C, estabelecidas a partir da análise destes iniciadores no programa *OligoAnalyzer 3.1*. Para padronização da reação foram adicionados os seguintes reagentes: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de iniciador WN233 *forward* (10 pmol/ µL), 0,3µl de iniciador WNV640c

reverse(10pmol/ μ l), 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (2U/ μ l), 17 μ l de H₂O estéril e 3 μ l de cDNA para cada amostra, resultando em um volume final de 25 μ l. Posteriormente, estas reações foram incubadas no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) e submetidas às seguintes condições de temperaturas: desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 seg; 55°C-57°C por 1min; 68°C por 3 min) e de uma extensão final a 72°C por 30 min.

Adicionalmente, foram realizados três testes utilizando controles positivos diluídos (1:10 e 1:100) nas Temperaturas de anelamento de 55°C-57°C, utilizando parâmetros e ciclagens com adaptações no protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005). Para padronização da reação foram adicionados os seguintes reagentes: 2,5 μ l de tampão (10x), 1,2 μ l de MgCl₂ (50mM), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 0,3 μ l de iniciador WN233 *forward* (10 pmol/ μ L), 0,3 μ l de iniciador WNV640c *reverse* (10pmol/ μ l), 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (2U/ μ l), 17 μ l de H₂O estéril e 3 μ l de cDNA para cada amostra, resultando em um volume final de 25 μ l. Posteriormente, estas reações foram incubadas no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) e submetidas às seguintes condições de temperaturas: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 55°C-57°C por 30seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 30 min.

4.3.3 Desenho de iniciadores e padronização de reação para amplificação do gene *E* do WNV

Durante a execução do projeto, foi construído um par de iniciadores capaz de amplificar a região codificadora do gene *E*, visando a implementação de novos testes para uma melhor caracterização da diversidade viral. Foram realizadas buscas por sequências de genoma completo do WNV pertencentes a linhagem 1 (linhagem circulante nas Américas) disponíveis no GenBank (NCBI). Um total de 350 sequências de genoma completo, com base na glicoproteína E foram alinhadas utilizando o software *JALVIEW* e analisadas quanto a sua conservação ou variabilidade de acordo com a sequência de referência (RefSeq). Após escolher a região de interesse, foram realizadas marcações na sequência de referência onde existiam polimorfismos, visando a exclusão destes para desenho dos iniciadores. Essas marcações foram feitas de acordo com as solicitadas no programa Primer3, possibilitando assim a construção de um iniciador específico para a região proposta.

Após a seleção, os iniciadores construídos, foram analisados utilizando a ferramenta online *OligoAnalyzer 3.1* (IDT, EUA), com a finalidade de verificar parâmetros não disponíveis no programa primer3, como temperatura de anelamento ideal e percentual de GC, para que, dessa forma, fosse selecionado o par que melhor se encaixe na maioria dos critérios definidos na literatura. Por fim, foi realizada a avaliação de especificidade dos iniciadores utilizando a ferramenta online *BLAST®* (Basic Local Alignment Search Tool).

Para padronização do par de iniciadores desenhados no laboratório (Tabela 2), foram realizados seis testes utilizando como base reagentes e ciclos descritos no protocolo de Bronzoni e colaboradores (2005) em controles diluídos (1:10 e 1:100) nas temperaturas 52°C-57°C. As referidas temperaturas foram estabelecidas a partir da análise destas sequências no programa *OligoAnalyzer 3.1*.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores desenhados no laboratório para amplificação da região de interesse no gene *E* do WNV e tamanho do produto.

GENE	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
<i>E</i>	PRWNV-30F	CTTGGAATGAGCAACAGAGAC	910 pb
	PRWNV-30R	TCCCTTCAACTGCAATTTTCC	

Fonte: Autoria própria, 2019.

Os testes foram feitos da seguinte forma: para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5 µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de iniciador PRWNV30-F (10 pmol/ µL), 0,3µl de iniciador PRWNV30-R (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (2U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Posteriormente, estas reações foram incubadas no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) e submetidas às seguintes condições de temperaturas: desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 52°C-57°C por 30 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 30 min.

4.3.4 Visualização produtos amplificados

Para a observação dos produtos da PCR foi realizado corrida em eletroforese, utilizando gel de agarose na concentração de 1,5%, onde foram adicionados um marcador de peso molecular (Ladder) para identificação do tamanho do fragmento amplificado e adição de corante intercalante fluorescente GelRed® promovendo a observação das bandas com o auxílio do transluminador de luz ultravioleta. A

eletroforese foi feita a partir de uma cuba preenchida com TBE1x (tris + ácido bórico + EDTA) em corrente de 120V por um período de 45 min. Foi utilizado 1,5 µl de Blue e 2,5 µl de GelRed® com 3 µl de cDNA, aplicado em gel de agarose, sendo posteriormente submetido a corrida e visualização do amplificado.

4.3.5 Padronização de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR).

Visando a implementação da qPCR no BIOMIC para identificação e quantificação molecular do WNV foi realizada a padronização desta técnica utilizando a metodologia definida como SYBR Green I, que refere-se a um corante que se intercala a dupla fita de DNA presente na reação, sendo uma forma mais sensível de detecção do ácido nucleico viral. Quando este corante é excitado, emite uma fluorescência que será captada através de um computador acoplado ao software, permitindo assim a análise dos produtos da qPCR e aquisição dos dados gerados.

Para a amplificação do WNV foi realizada busca na literatura com o intuito de selecionar um par de iniciadores eficientes para esta reação, sendo eles proposto por Del amo e colaboradores (2013) capazes de amplificar a região não traduzida (3'-UTR) do genoma viral.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores desenvolvidos por Del amo e colaboradores (2013) para amplificação da região de interesse do WNV e tamanho do produto.

REGIÃO	INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'-3')	PRODUTO
3'-UTR	WN-LCV-F1	GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA	77 pb
	WN-LCV-R1	GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	

Fonte: Autoria própria, 2019.

Foram realizados três testes para definição da melhor concentração de iniciadores para essa reação, variando entre as concentrações de 350nM; 400nM e 450nM estipuladas de acordo com especificações do Kit Promega. Para quantificação da carga viral, foram utilizados controles positivos submetidos a diluição seriada na escala de 10^{-2} a 10^{-5} de concentração conhecida para definição da curva padrão. A concentração de corante intercalante foi mantida na escala de 100x, seguindo protocolo proposto por colaboradores do Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. maccha

A qPCR foi padronizada utilizando 5µl de master mix GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, Custom (Promega) com adição do corante 0,05 µl de corante

SYBR™ Green I na concentração 100x; 1,55-1,75µl de H₂O; 0,45-0,35 µl de iniciador forward; 0,45-0,35 de iniciador reverse. O mix de reagentes foi distribuído em placa MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), por fim foi adicionado em duplicata 2,5 µl de cDNA diluído anteriormente nos seus respectivos poços contendo o mix, resultando em um volume final de 10µl. As concentrações de reagentes utilizadas em cada teste pode ser observada na tabela 4. Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao termociclador Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System acoplado ao computador com software específico para captação da fluorescência emitida pelo corante intercalante e desenvolvimento da curva de amplificação a cada novo ciclo da reação. As ciclagens e demais temperaturas utilizadas nas técnicas foram selecionadas de acordo com o protocolo proposto pela Promega, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 4 - Quantidade de reagente utilizados nos testes para a qPCR.

REAGETES	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 3	CONCENTRAÇÃO
Master mix	5µl	5µl	5µl	-
H ₂ O	1,55 µl	1,65 µl	1,75 µl	-
Iniciador forward	0,45µl	0,40 µl	0,35 µl	350-450 nM
Iniciador reverse	0,45 µl	0,40 µl	0,35 µl	350-450 nM
SYBR™ Green I	0,05 µl	0,05 µl	0,05 µl	100X
cDNA	2,5µl	2,5µl	2,5µl	10 ² -10 ⁵ ul/mL

Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 5 – Tabela com parâmetros utilizados para padronização da técnica de qPCR.

ETAPA	CICLOS	TEMPERATURA	TEMPO
Desnaturação	40	95°C	15s
Anelamento e extensão		60°C	60s

Fonte: Autoria própria, 2019.

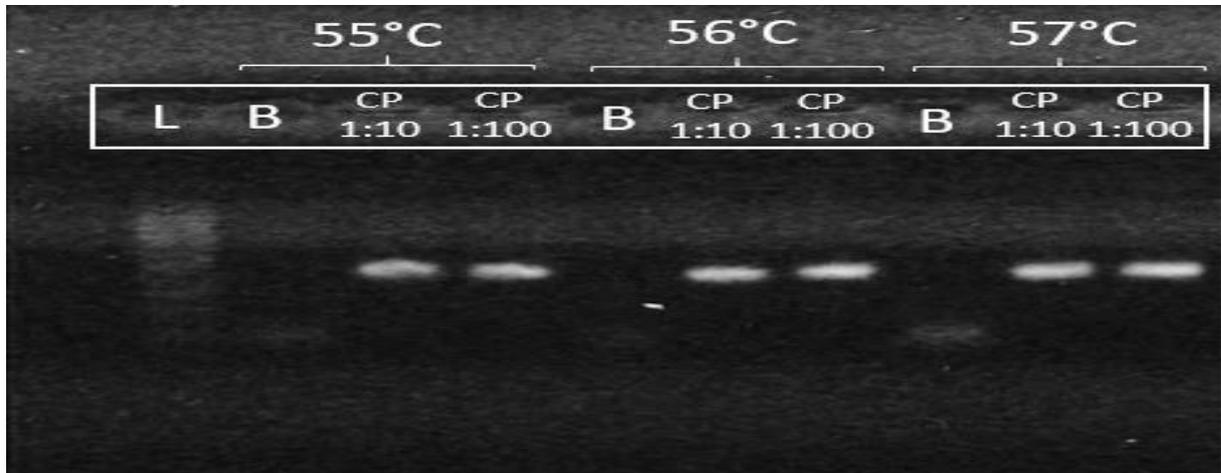
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando a endemicidade da dengue e o desenvolvimento de reações cruzadas entre os *Flavivirus* por meio de testes sorológicos comuns, é provável que o número de infecções por WNV no Brasil sejam subnotificados e erroneamente identificados como infecções por DENV (GO; BALASURIYA; LEE, 2014; HEINZ; STIASNY, 2012; MONDINI et al., 2007; VEDOVELLO et al., 2015). Diante disto, o laboratório BIOMIC apresenta diversas padronizações de técnicas moleculares possibilitando o diagnóstico diferencial, permitindo detectar uma grande diversidade de arbovírus circulantes na região, dentre eles o WNV, tornando possível distingui-lo de outros vírus que possuem manifestações clínicas semelhantes e apresentam reatividade cruzada em testes imunológicos.

A padronização de técnicas moleculares visa o aprimoramento destas, tornando o diagnóstico mais sensível e específico, diminuindo as chances de serem observadas amplificações inespecíficas e formação de estruturas secundárias, bem como, proporciona a escolha da temperatura de anelamento ideal do par de iniciadores, ciclagens ideais e um menor gasto de reagentes. Por este fato, técnicas moleculares devem ser implementadas e aperfeiçoadas visando um diagnóstico correto na detecção de arboviroses. Neste contexto, foram estabelecidos testes de RT-PCR com o intuito de investigar a circulação de WNV no Piauí. Para tanto, foi realizada a otimização de dois protocolos, tendo a finalidade de amplificar diferentes regiões genômicas (*C/prM* e *E*). O primeiro protocolo utilizado para amplificação de *C/prM* foi descrito por Lanciotti e colaboradores (2000) e o protocolo com base em iniciadores construídos no laboratório, empregado para a região que codifica a glicoproteína E foi padronizado a partir de adaptações no protocolo desenvolvido por Bronzoni e colaboradores (2005).

A padronização do protocolo que visa amplificação do gene que codifica as regiões *C/prM* foi otimizado empregando parâmetros cedidos por Lanciotti e colaboradores (2000), analisando diferentes temperaturas de anelamento (55°C-57°C). Foram feitas também modificações referentes a dados não disponibilizados no artigo. Os resultados dos testes demonstraram que houve amplificação em todas as temperaturas e diluições de controle positivo (1:10 e 1:100) (Figura 5).

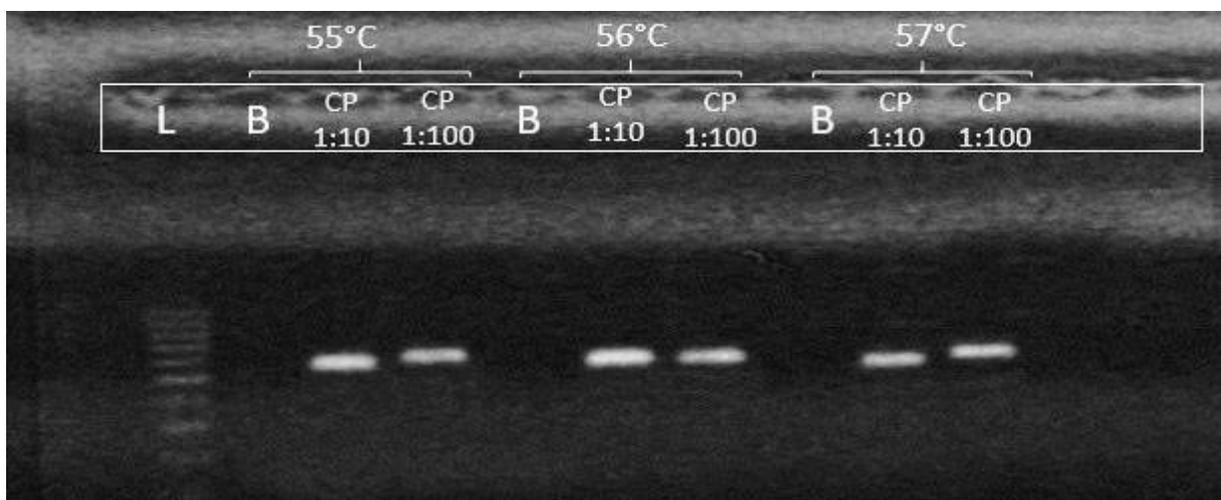
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (2000) para o gene *C/prM* em diferentes condições de Ta (55°C-57°C) e ciclagens disponíveis pelo autor. L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos. Produto com tamanho de 408pb.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Testes adicionais foram realizados com o intuito de compreender se os iniciadores obteriam resultados esperados ao serem testados aplicando parâmetros utilizados no laboratório. Foram feitos testes mantendo as temperaturas de anelamento (55°C-57°C) e alterando as ciclagens de acordo com adaptações no protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores (2005). Foi possível observar que existiu êxito nos testes realizados com as ciclagens modificadas, podendo ser confirmada com a amplificação dos controles positivos em todas diluições e Ta analisadas, como mostra a figura 6.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores descritos por Lanciotti e colaboradores (2000) para o gene *C/prM* em diferentes condições de Ta (55°C-57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco. Produto com tamanho de 408pb.



Fonte: Autoria própria, 2019.

Os resultados dos testes demonstraram amplificação satisfatória da região proposta, utilizando tanto os parâmetros cedidos pelo autor como também os empregados no BIOMIC, o que confirma a eficiência dos iniciadores selecionados para detecção de WNV, contudo, a reação foi padronizada seguindo os parâmetros utilizados no laboratório na T_a à 55°C descrita por Lanciotti e colaboradores (2000), o que corrobora com estudo feito por Queiroz e colaboradores (2017) que delimita a T_a sendo de 3°C – 5°C menor que a T_m dos iniciadores, que nesse caso era 59°C.

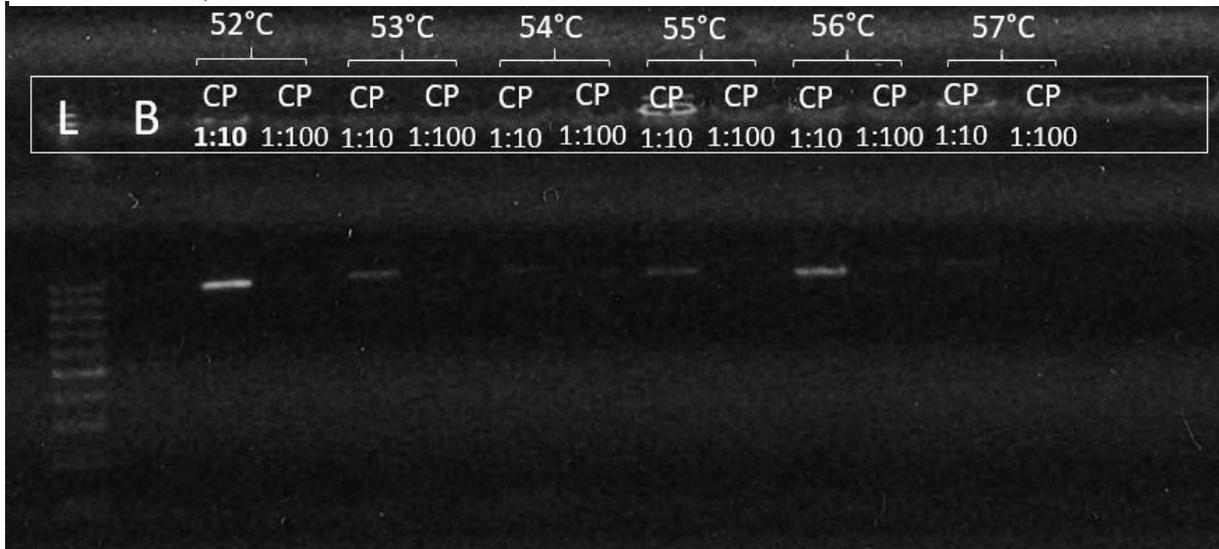
Com a intenção de ampliar a capacidade de detecção de WNV, um novo par de iniciadores foi construído e padronizado para amplificação do gene que codifica a glicoproteína *E*. A construção do par de iniciadores teve como objetivo possibilitar a amplificação de uma nova região, tendo como base a possibilidade de mutações inerentes aos vírus que podem interferir na eficiência de iniciadores utilizados.

Para a construção deste par de iniciadores foi necessária a utilização de parâmetros descritos na literatura. O programa *OligoAnalyzer* 3.1 foi utilizado para verificar as condições dos iniciadores, sendo possível determinar a temperatura de anelamento para o iniciador *forward* (54°C) e *reverse* (53°C), condizente com as informações descritas por Machado e colaboradores (2013) que determina um intervalo pré-estabelecido entre 40°C a 60°C.

Foi analisado parâmetros que avaliam sua especificidade, utilizado o programa *BLAST*, onde as sequências demonstraram 100% de similaridade dos iniciadores com a região homóloga ao genoma do WNV, disponíveis no *GenBank*. A partir dos resultados obtidos com as ferramentas de bioinformática foi possível construir um par de iniciadores específicos para a região proposta, permitindo minimizar erros posteriores durante a reação de PCR.

Neste estudo, seis testes foram realizados para padronização do protocolo com base na amplificação do gene que codifica a glicoproteína *E* utilizando os iniciadores desenhados. Os resultados dos testes promoveram reações positivas do controle na diluição de 1:10 em todas as T_a analisadas (52°C-57°C). Houve amplificação fraca dos controles positivos nas diluições de 1:100 somente nas temperaturas de 54°C e 56°C. Diante dos dados, este protocolo foi padronizado empregando-se T_a à 56°C, priorizando a melhor amplificação nas diluições de controle positivo analisadas, o que garante uma maior sensibilidade na detecção de WNV. Estes resultados podem ser confirmados na figura 7.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de WNV (1:10 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados no laboratório BIOMIC para o gene *E* em diferentes condições de T_a (52°C-57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos. Produto com tamanho de 910pb.



Fonte: Autoria própria, 2019.

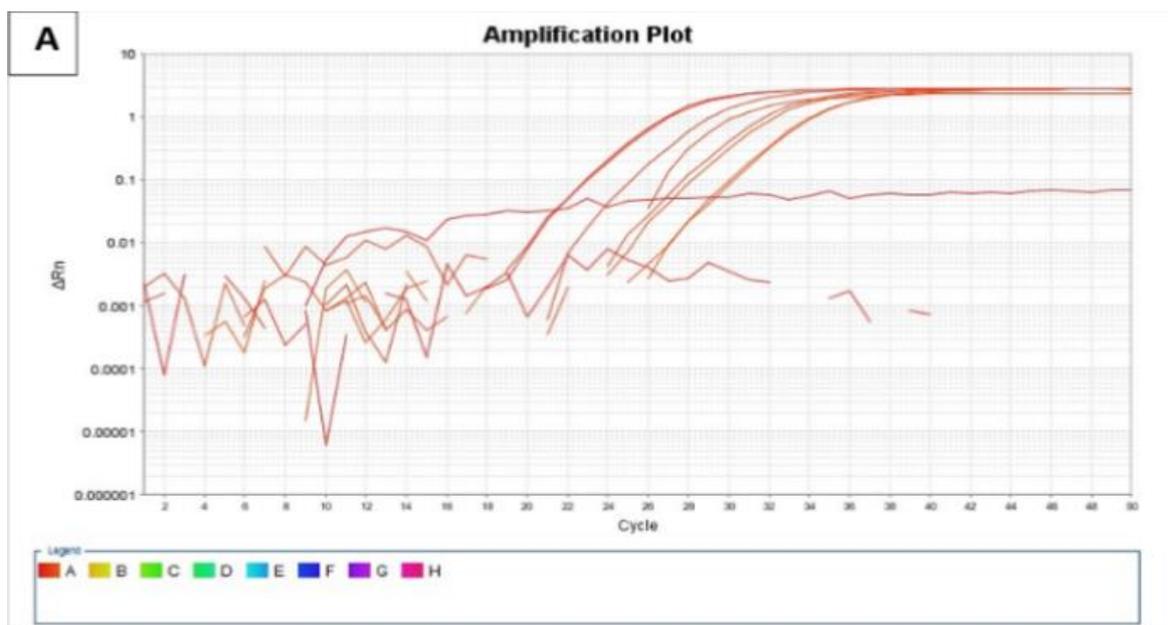
No período compreendido entre fevereiro de 2018 e julho de 2019, foram testadas um total de 106 amostras de pacientes com sintomatologia característica de infecção por arbovírus como: febre, cefaleia, fraqueza, mialgia, artralgia, dor retroorbital, erupções cutâneas. Para realização de testes moleculares um total cinco amostras referentes ao ano de 2018 e seis do ano de 2019 foram submetidas a extração do RNA viral e testes moleculares utilizando os protocolos padronizados para amplificação das regiões *C/prM* e *E* de WNV. Amostras sugestivas de infecção por WNV, coletadas nos anos de de 2016 (22 amostras) e 2017 (73 amostras) foram incluídas no estudo para análise molecular. Em todas amostras testadas não existiu amplificação do genoma viral.

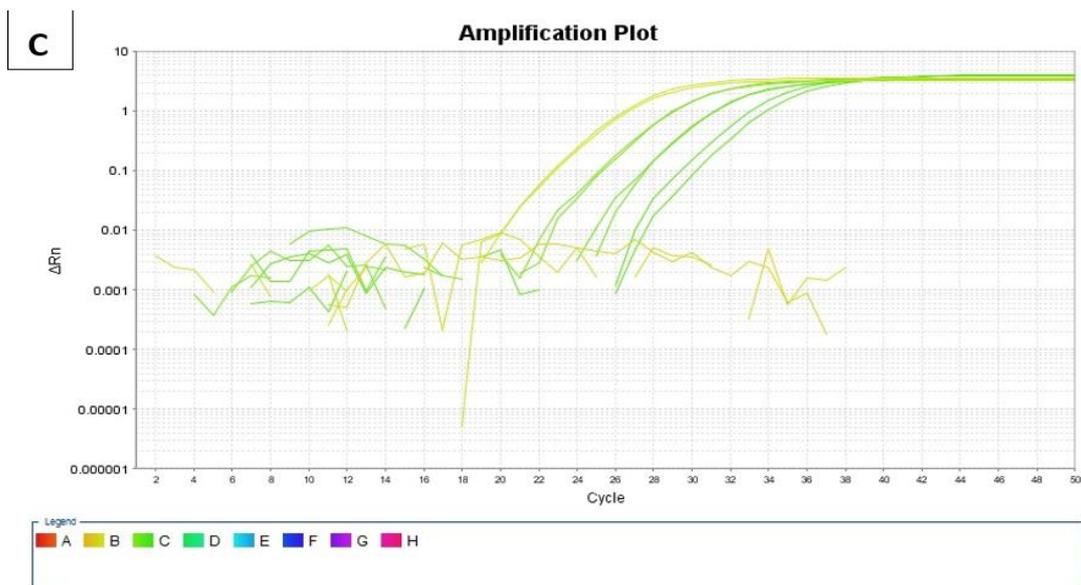
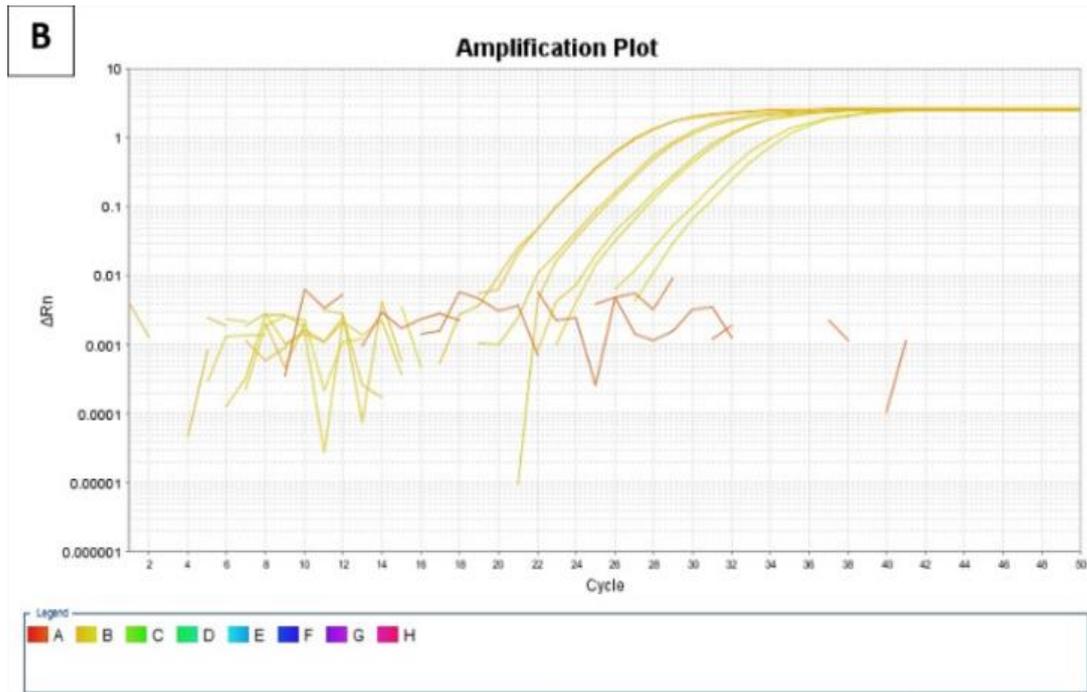
Diante do exposto, a endemicidade do Brasil para vários *Flavivírus*, pode contribuir para a pequena quantidade de casos detectados para WNV devido a imunidade cruzada que estes arbovírus filogeneticamente relacionados podem apresentar. Segundo Figueiredo (2019), esta proteção poderia prevenir mais casos de encefalite e surtos relacionados a este vírus, podendo ser uma das causas das poucas detecções deste no país. Atualmente, quatro casos em humanos foram confirmados no Brasil, mais precisamente no estado do Piauí, o primeiro aconteceu em 2014 e os outros três ocorreram no ano de 2019, onde um deles culminou com a morte de uma paciente. Estes casos possivelmente estão sendo detectados apenas no Piauí devido a implementação pioneira do protocolo para investigação de

encefalites virais, sendo possível que casos esporádicos de infecção por WNV ocorram em diferentes regiões do país e permaneçam subnotificadas devido à ausência de vigilância epidemiológica adequada, sobreposição dos sintomas neurológicos inerentes a várias outras infecções virais do sistema nervoso, e as limitações na disponibilidade de testes diagnósticos para identificação do vírus.

A técnica de qPCR foi padronizada e implementada no laboratório com o objetivo de aprimorar a capacidade de detecção de WNV, como também quantificar o cDNA viral nas amostras testadas para possíveis correlações entre a carga viral e progressão dos sintomas para casos graves e formas atípicas da infecção. Esta técnica oferece vantagens quando comparada a convencional, podendo ser citada a não utilização de técnicas pós-PCR para visualização do amplificado, além de apresentar maior sensibilidade e especificidade e um menor risco de contaminação (TEMPLETON et al. 2003). A padronização desta técnica molecular foi realizada através de três testes analisando diferentes concentrações de iniciadores (T1: 450nM; T2: 400nM; T3: 350nM). Diante dos resultados apresentados, a curva de amplificação demonstrou que todos os controles positivos foram amplificados corretamente seguindo as diluições definidas (10^{-2} a 10^{-5}) da maior concentração (esquerda) para a menor concentração (direita) utilizando o corante SYBR Green I na concentração 100x, como pode ser visto na figura 8.

Figura 6 - Curva de amplificação dos testes. A: teste 1 com concentração de 450nM de iniciadores; B: teste 2 com concentração de 400nM de iniciadores; C: teste 3 com concentração de 350nM de iniciadores.

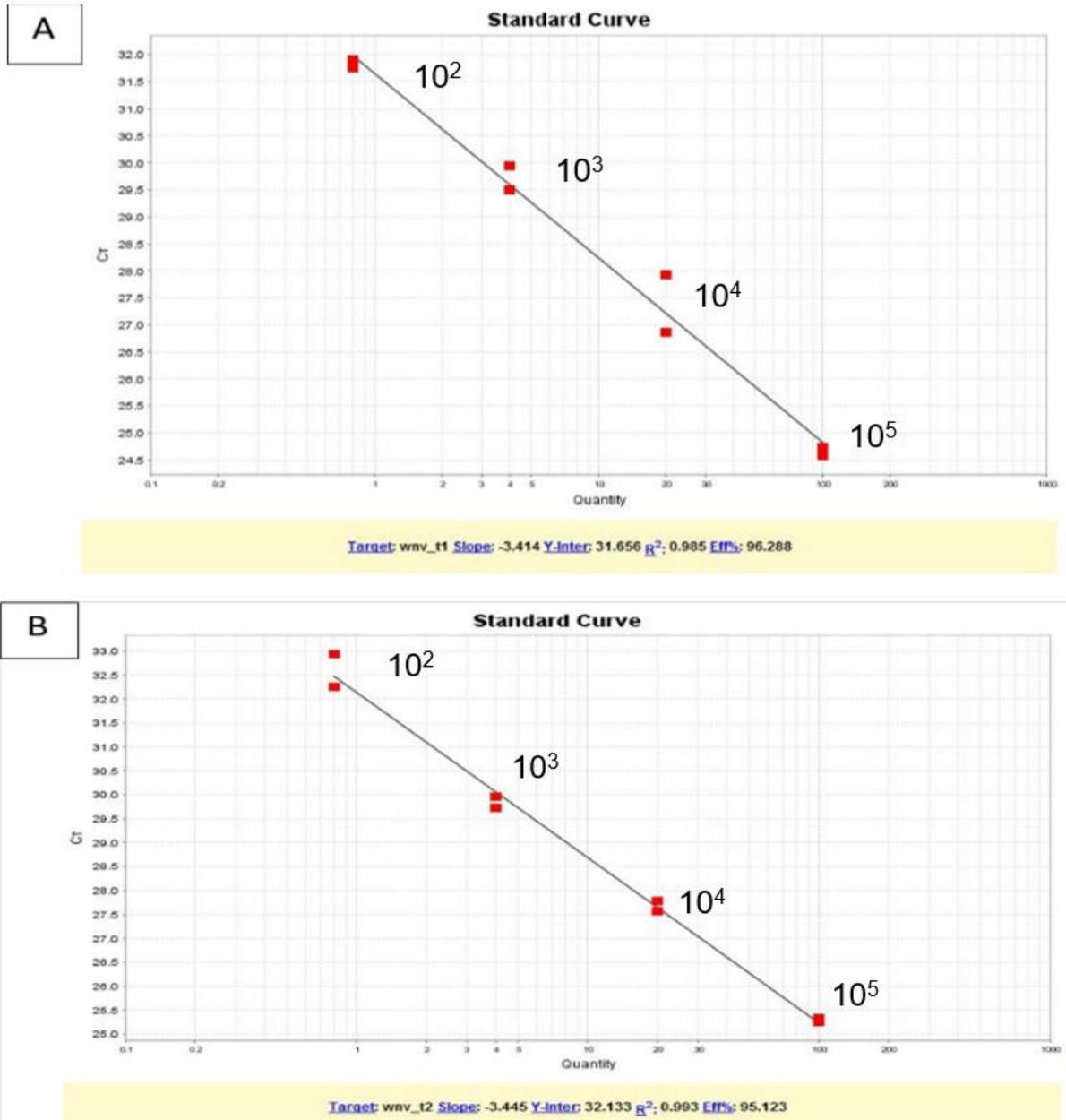


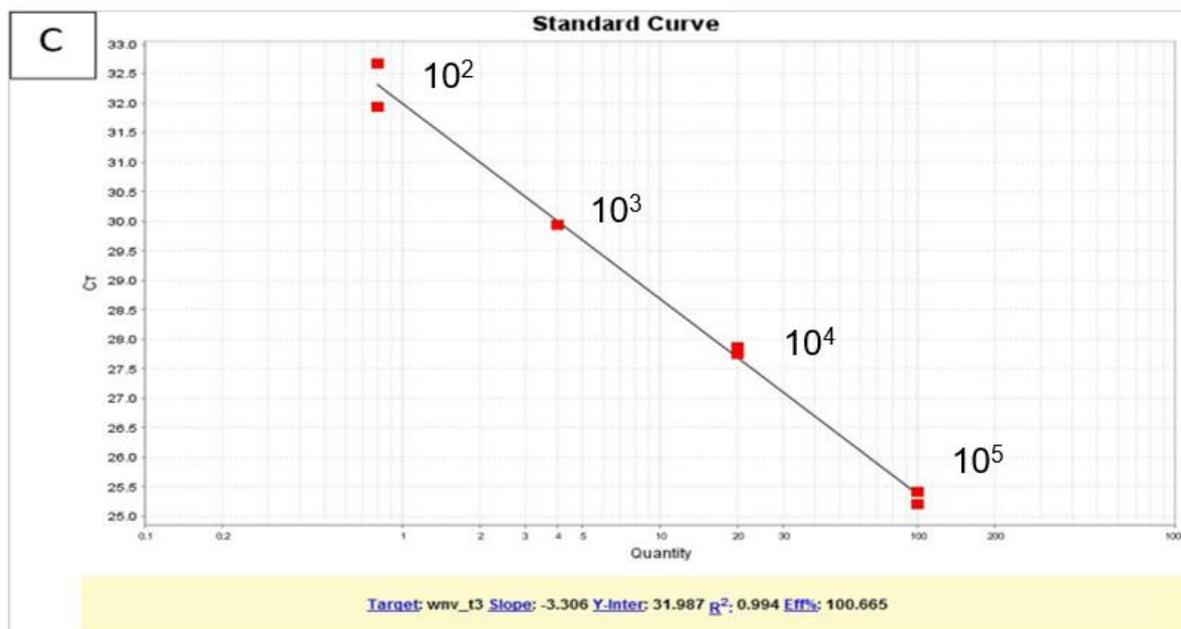


Fonte: Autoria própria, 2019.

A curva padrão foi construída a partir da amplificação das diluições seriadas, onde foi produzido um gráfico determinando o Ct (eixo y) versus o logaritmo da quantidade de cDNA (eixo x) de cada amostra, sendo colocado na curva em forma de pontos, como pode ser visto na figura 9. A análise desta curva apresentou valores esperados pela literatura como observado na tabela 5.

Figura 7 – Curvas padrões com respectivas diluições seriadas de controle positivo para WNV. A: curva padrão do teste 1; B: curva padrão do teste 2; C: curva padrão do teste 3.





Fonte: Autoria própria, 2019.

Tabela 5 – Parâmetros obtidos nos testes (1-3) com devidos valores de referência na literatura.

Parâmetros	Teste 1	Teste 2	Teste3	Valor de referência
Slope	3.414	3.445	3.306	-3,1 a -3,6
R²	0.985	0.993	0.994	>0.98
Eficiência	96.288	95.123	100.665	90% - 105%
Y-interceptor	31.656	32.133	31.987	<40

Fonte: Autoria própria, 2019.

A análise da curva padrão é de grande importância para o método, pois a partir dela é possível a realização da quantificação do material genético. Para fazer esta avaliação foram observados parâmetros gerados pelo software a partir da construção da curva padrão como o Slope, coeficiente de correlação (R^2), eficiência e Y-interceptor. O slope ou inclinação da reta é utilizado para calcular a eficiência da reação, seu valor esperado é de 3,32 o que mostraria uma eficiência na reação de 100%, entretanto Doraka (2006) determina valores aceitáveis entre 3,1 a 3,6. Para Johnson e colaboradores (2013) a eficiência da reação deve sempre estar entre 90% a 105%, o valor de 100% indica que o número de produto dobra a cada ciclo, alguns fatores podem influenciar este parâmetro como eventuais erros de pipetagem e existência de inibidores da reação. O valor de R^2 (coeficiente de correlação) indica o ajuste dos pontos na reta, correlacionando a fluorescência emitida e a concentração

do cDNA detectado nas amostras analisadas, devendo estar o mais próximo possível de 1, Taniguchi e colaboradores (2009) determina que valores maiores que 0.98 são aceitáveis. O valor Y-Interceptor representa o número de ciclos necessários para a quantificação de uma única cópia de DNA, Sarasquete e colaboradores (2005) determinam que valores menores que 40 indicam boa sensibilidade do ensaio.

Após avaliação de todos parâmetros disponibilizados pelo método, foi possível inferir que a eficiência da qPCR proposta para WNV demonstrou-se satisfatória, pois todos os testes estiveram dentro dos valores esperados, o que destaca uma boa sensibilidade da técnica. Diante dos resultados, o teste 3 realizado com uma concentração de 350nM de iniciadores foi selecionado partindo da premissa da utilização de uma menor concentração, possibilitando assim um menor gasto deste reagente durante a quantificação adequada das amostras.

Diante das informações apresentadas, o presente estudo possibilitou a construção de um par iniciadores visando otimizar a capacidade de detecção deste vírus. Foram padronizadas técnicas moleculares capazes de amplificar as regiões de interesse (*C/prM* e *E*), sendo que os testes com amostras não apresentaram amplificação do genoma viral, porém a continuidade na investigação de WNV se faz necessária, não descartando a circulação deste vírus na região, tendo em vista sua detecção em cidades próximas. A padronização da qPCR apresentou resultados satisfatórios e condizentes com a literatura, tornando-se possível sua posterior utilização em amostras sugestivas, sendo de extrema importância para o diagnóstico de WNV devido a sua detecção e quantificação viral eficiente.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o referido estudo, pode-se concluir que:

- Os iniciadores construídos para amplificação da região que codifica a glicoproteína *E* do WNV se mostraram eficientes, existindo amplificação satisfatória dos controles deste vírus.
- Foi possível padronizar as técnicas de RT-PCR visando a amplificação dos genes *C/prM* e *E* do WNV, possibilitando manter o monitoramento de sua circulação no estado.
- A padronização da técnica qPCR demonstrou resultados satisfatórios, permitindo a amplificação da região 3'UTR do WNV.
- Durante a investigação de WNV por métodos moleculares, não houve a detecção deste vírus nas amostras clínicas analisadas. Entretanto, é importante dar continuidade ao monitoramento, tendo em vista sua detecção em outras cidades do estado do Piauí.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ-ESTRADA, S. L.; et al. MONROY, M.Y.; ANGEL, R. A. Insights into dengue virus genome replication. **Future Virology**, v.1, n.1, 575-592, 2010.
- BATY, Steven A. et al. Evaluation for West Nile Virus (WNV) RNA in urine of patients within 5 months of WNV infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 9, p. 1476-1477, 2012.
- BEASLEY, D. W.; et al. Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. **Archives of Virology. Supplementum**, n. 18, p. 35-41, 2004.
- BERNKOPF, H.; LEVINE, S.; NERSON, R. Isolation of West Nile virus in Israel. **The Journal of infectious diseases**, v. 93, n. 3, p. 2017-218, 1953.
- BIGGERSTAFF, B. C.; PETERSEN, L, R. Estimated risk of West Nile virus transmission through blood transfusion during an epidemic in Queens, New York City. **Transfusion**, v. 42, p. 1019-1026, 2002.
- BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1927– 1959, 2015.
- BRONZONI, R. V. M.; et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696702, 2005.
- BRUYCKER-NOGUEIRA, F.; et al. Arboviruses in the context of large-events. **Virus Reviews & Research**, v. 21, n. 2, p. 1-11, 2016.
- CASSEB, A. R.; et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.
- CASTAÑEDA, J. R.; et al. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n.1, p. 1-24, jan, 2017.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Investigations of West Nile virus infections in recipients of blood transfusions. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 51, n. 43, p. 973-974, 2002a.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 51, n. 50, p. 1133-1135, 2002b.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible West Nile Virus Transmission to an Infant Through Breast-Feeding --- Michigan, 2002. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report** v. 51, n. 39, p. 877-878, 2002c.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile Virus: Transmission (2018). Disponível em: <https://www.cdc.gov/westnile/transmission/index.html>. Acesso: 09/01/2019.

CHANCEY, C.; et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **BioMed research international**, v. 2015, 2014.

CHARREL, R. N. Diagnosis of arboviral infections - A quagmire of cross reactions and complexities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, p. 11-12, 2016.

CHEN, S. H.; et al. Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3751–3754, mar. 2003.

CIOTA, A. T. West Nile virus and its vectors. **Current Opinion in Insect Science**, 2017.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. **Virology**, v. 1, p. 7188, 2014.

COSTA, M, C. S. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016. **Acta Tropica**, v. 190, p. 395-402, 2019.

DAEP, C. A. et al. Flaviviruses, an expanding threat in public health: focus on Dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. **Journal of Neurovirology**, v. 20, n. 6, p. 539–560, 2014.

DALOVISIO, J. R. West Nile Virus Infection in the United States: Overview as a Public Health Issue. **The Ochsner Journal**, v.5, n. 3, p. 11-12, 2003.

DAVID, S; ABRAHAM, A. M. Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. **Infectious Diseases**, v. 48, n. 8, p. 571-586, 2016.

DEL AMO, Javier et al. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus. **Journal of virological methods**, v. 189, n. 2, p. 321-327, 2013.

DIAMOND, M. S.; PIERSON, T. C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. **Cell**, v. 162, n. 3, p. 488-492, jul. 2015.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, 2017.

FALL, G. et al. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n 11, 2017

FERNANDEZ-GARCIA, M. D.; et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-328, abr. 2009.

FERREIRA, G. F. et al., Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 546-554, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, L. T. M. West Nile virus infection in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

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

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. West Nile virus. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.2, p.604-612, 2009.

FURUYA-KANAMORI, L. et al. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 84, p. 1-11, 2016.

GRANGER, D. et al. Serologic testing for Zika virus: comparison of three Zika virus IgM-Screening enzyme-linked immunosorbent assays and initial laboratory experiences. **Journal of Clinical Microbiology** v. 55, n. 7, p. 2127-2136, 2017.

GARCÊS, T. C. C. C. **Caracterização molecular de Dengue vírus circulantes e investigação de Flavivirus emergentes no Estado do Piauí**. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 3, n. 1, p. 58- 77, 2014.

GOLDBLUM, N.; STERK, V. V.; PADERSKI, B. West Nile fever; the clinical features of the disease and the isolation of West Nile virus 404 from the blood of nine human cases. *American journal of hygiene*, v. 59, n. 1, p 89-103, 195

GONÇALVES, A.; et al. Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report. *Journal Infection Disease*, v.217, n.7, p. 1060-1068, mar. 2018.

GORCHAKOV, Rodion et al. Optimizing PCR Detection of West Nile Virus from Body Fluid Specimens to Delineate Natural History in an Infected Human Cohort. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1934, 2019.

GRAY, T, J.; WEBB, C, E. A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. **International journal of general medicine**, v. 7, p. 193, 2014.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. S7-S16, 2010.

GUZMAN, M. G.; et al. Dengue infection. **Nature Reviews – Disease Primers**, v. 2, n. 16055, p. 1-25, 2016.

HAYES, E, B.; et al. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1167, 2005.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289-295, 2012.

HUANG, Y. J. S. et al. Flavivirus-mosquito interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703-4730, 2014.

IWAMOTO, M. et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**. v. 348, n. 22, p. 2196-2203, 2003.

KOLAWOLE, O. et al. The Neglect and Fast Spread of Some Arboviruses: A Note for Healthcare Providers in Nigeria. **Diseases**, v. 6, n. 4, p. 99, 2018.

KLEE, A, L. et al Long-Term Prognosis for Clinical West Nile Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**. v. 10, n. 8, p. 1405-1411, 2004.

KOMAR, N. et al. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 9, No. 3, March 2003.

LANCIOTTI, R. S. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 96-105, 2002.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066-4071, 2000.

LEON, F. et al. An Innovative Multiplexed and Flexible Molecular Approach for the Differential Detection of Arboviruses. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.21, n. 1, p. 81-88, 2019.

LIANG, G; GAO, X; GOULD, E, A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging microbes & infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.

LIMA-CAMARA, T, N. **Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. Revista de saude publica**, v. 50, 2016.

LOPES, N. et al. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista PanAmazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LUO, R. et al. Rapid diagnostic tests for determining dengue serostatus: a systematic review and key informant interviews. 2019

MACHADO, E.L.; SILVA, S.A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n. 11, p. 1457-1463, nov. 2013.

MANTEL, N. et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever–dengue vaccines. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n. 9, p. 40-46, mar. 2008.

MALAVIGE, G. N.; et al. Dengue viral infections. *Postgraduate Medical Journal*, v. 80, n. 948, p. 588-601, mar. 2004.

MARTINS, L. C. et al. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.114, 2019.

MAY, F. J. et al. Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. **Journal of Virology**, v. 85, n. 6, p. 2964-2974, 2010.

MELNICK J. L. et al. Isolation from human sera in Egypt of a virus apparently identical to West Nile virus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.77, n. 4, p. 661-665, 1951.

MORALES, M, A. et al. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina, 2006. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n. 10, p. 1559-1561, 2006.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

MUKHOPADHYAY, S; KUHN, R, J; ROSSMANN, M, G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13, 2005.

NOGUEIRA, R. M. R.; ARAUJO, J. G. A.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986–2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, n. 5, p. 358–63, 2007

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.

OSORIO, J. E. et al. Characterization of West Nile Viruses Isolated from Captive American Flamingoes (*Phoenicopterus ruber*) in Medellin, Colombia. **The american journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 3, p. 565-572, 2012.

PASTORINO, B.; et al. Role of host cell factors in Flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, v. 87, n. 3, p. 281- 294, set. 2010.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R. S. West Nile virus: Review of the Literature. **Jama**, v. 310, n. 3, p. 308-315, 2013.

PEELING, R. W.; et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 30-37, 2010.

POTOKAR, M.; JORGACEVSKI, J.; ZOREC, R. Astrocytes in Flavivirus Infections. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, 2019

QUEIROZ, J. A. S; et al. Desenho e Validação de Primers In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano, **Revista FIMCA**, v.4, n.1, p. 17-30, dez. 2017.

RATNAM, I. et al. Dengue fever and international travel. **Journal of travel medicine**, v. 20, n. 6, p. 384-393, 2013.

ROCCO, I. M.; et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281- 285, set/out. 2005.

SAMPATHKUMAR, P. West Nile virus: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and prevention. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, p. 1137-1144. 2003.

SANTIAGO, G.A.; et al. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, abr. 2018.

SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue vírus no Piauí: busca de sorotipos circulantes**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.

Secretaria de Estado da Saúde (SESAPI). Nota sobre a ocorrência de Febre do Nilo Ocidental no estado (2019). Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2019-02-08/8933/nota-sobre-a-ocorrencia-de-febre-do-nilo-ocidental-no-estado.html>. Acesso: 24/02/2019.

Secretaria de Estado da Saúde (SESAPI). Piauí não tem registros de novos casos da Febre do Nilo (2019) Disponível em: <http://www.saude.pi.gov.br/noticias/2019-07-24/9205/piaui-nao-tem-registros-de-novos-casos-da-febre-do-nilo.html>. Acesso: 26/07/2019.

SESHAN, V.; et al. Serological, molecular and clinical correlates of dengue from a tertiary care centre in Chennai, India. *Arch Virology*, v. 162, n.10, p. 2983-2988, out. 2017

SILVA, J, R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 108, n. 7, p. 921-923, 2013.

SMITHBURN K. C. et al. Immunity to certain arthropod-borne viruses among indigenous residents of Egypt. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 3, n. 1, p. 9-18, 1954.

SMITHBURN K.C. et al. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 20, p. 471-473, 1940.

SMITHBURN, K. C.; JACOBS, H. Neutralization Tests Against Neurotropic Viruses with sera Collected in Central Africa. **Journal of Immunology**, v. 43, n. 5, p. 9-23, 1942.

SUTHAR, M, S; DIAMOND, M, S; GALE, M, J. West Nile virus infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**. v. 11, n. 2, p. 115-128, 2013.

VALE, V. S. **Análise Molecular e Considerações Filogenéticas sobre o Dengue vírus**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saude Pública**, v. 17 (suplemento), n. 1, p. 155-164, 2001.

VERSTREPEN, B, E. et al. Experimental infection of rhesus macaques and common marmosets with a European strain of West Nile virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2797, 2014.

VIEIRA, M, A, C, S. et al. West Nile virus encephalitis: the first human case recorded in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377-379, 2015.

VILIBIC-CAVLEK, T. et al. Diagnostic significance of immunoglobulin G avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 51, n. 5, p. 591-595, 2018

WARNECKE, J. M. et al. Added value of IgA antibodies against Zika virus non-structural protein 1 in the diagnosis of acute Zika virus infections. **Journal of Virological Methods**, v. 267, p. 8-15, 2019.

WEAVER, S, C; REISEN, W, K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328- 345, 2011.

ZANLUCA, C.; et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015

ZHANG, Y. et al. Structures of immature flavivirus particles. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 11, p. 2604–2613, 2003.

ANEXO I TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA: “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira e Prof. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, nº 2819, Bairro Reis Velloso, CEP 64204-035, Parnaíba, Piauí, Brasil. Telefone para contato (inclusive a cobrar): (86) 99920-3470 / (86) 994013035

ESCLARECIMENTOS:

Prezado colaborador(a), você está sendo convidado(a) a participar como **VOLUNTÁRIO** desta pesquisa, que irá contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado do Piauí, bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído na pesquisa se apresentar sintomatologia sugestiva de dengue/outras arboviroses, e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena quantidade de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue, mas os técnicos disponíveis para o procedimento são bem treinados e credenciados, além de utilizarem todo o material devidamente estéril que forneça segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecido pelo pesquisador.

Os resultados desta pesquisa serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí, e quais condições relacionadas ao hospedeiro diante da Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade da infecção. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e sua decisão não acarretará em qualquer prejuízo na continuidade do seu atendimento e tratamento no serviço de saúde. Se concordar em participar do estudo, suas informações pessoais (nome, endereço, telefone, dentre outras) serão mantidas em sigilo absoluto. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe da pesquisa e os representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações pessoais.

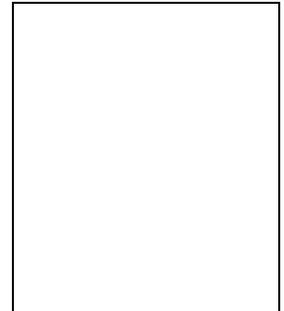
CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, portador(a) da cédula de identidade/CPF de número _____, abaixo assinado, declaro que concordo em participar da pesquisa/estudo “Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes do Piauí”, como VOLUNTÁRIO. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa. Eu discuti com o Dr. Gustavo Portela Ferreira / Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira ou qualquer um dos demais membros da equipe de pesquisadores sobre minha decisão em participar desta pesquisa. Ficaram claros para mim quais são os propósitos

da pesquisa, os procedimentos a serem realizados, seus possíveis desconfortos e riscos, e as garantias de sigilo e de esclarecimentos. Também ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Concordo VOLUNTARIAMENTE em participar da pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento / tratamento neste serviço de saúde.

E por estar de acordo, assino o presente termo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .



Assinatura do sujeito participante ou responsável legal

Impressão Digital

.....
Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

RG/CPF: _____ Assinatura: _____

.....
Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, _____ de _____ de _____ .

Gustavo Portela Ferreira

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com;
Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI – *Campus* Ministro Reis Velloso
Endereço: Avenida São Sebastião, 2819 – Bloco 16 – Sala 05 – Bairro Reis Velloso
CEP: 64202-020 – Parnaíba-PI, Fone: (86) 3323-5251

ANEXO II FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

PACIENTE/AMOSTRA Nº _____ Nº CARTÃO DO SUS: _____

AMOSTRAS COLETADAS: _____

DATA DO ATENDIMENTO: _____ LOCAL DE ATENDIMENTO: _____

NOME: _____ TEL: _____

SEXO: Masculino Feminino DATA DE NASCIMENTO: _____

NOME DA MÃE: _____

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____ BAIRRO: _____ CEP: _____

MUNICÍPIO: _____ UF: _____

Adulto Criança (até 12 anos) Idoso (acima de 60 anos) Gestante: 1º T 2º T 3º T

Início dos sintomas: _____ dias. Febre: há _____ dias.

SINAIS E SINTOMAS PRESENTES:

Cefaleia Artralgia Náuseas Dor retroorbitaria Mialgia Icterícia

Prostração Diarreia Vômitos Exantema: com prurido sem prurido

Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses.

Dor abdominal Choro persistente/irritabilidade

Outros: _____

COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES:

Hipertensão Arterial Doença Hematológica _____

Diabetes Mellitus Doença Cardiovascular _____

DPOC Doença Autoimune Insuficiência Renal Doença ácido-péptica

Hepatopatia Anemia Falciforme

Outras: _____

Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE:

Comprometimento respiratório Hemorragia grave com ou sem sinais de choque

Hemorragia presente Não Sim. Qual (is)?

Conjuntival Epistaxe Gengivorragia Petéquias Equimose

Metrorragia Hematúria Hematêmese Melena Hemoptoicos

SINAIS DE CHOQUE:

Pulso rápido e fino Extremidades frias Pele pálida e úmida Enchimento capilar lento (> 2 seg.)

Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg) Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)

Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave

Outros: _____