



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ALICIA CAVALCANTE MAIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE DENGUE EM AMOSTRAS DE SWAB  
NASOFARÍNGEO**

**BRASÍLIA, 2023**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA  
CURSO DE FARMÁCIA**

**ALICIA CAVALCANTE MAIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE DENGUE EM AMOSTRAS DE SWAB  
NASOFARÍNGEO**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Haddad**

**Co-orientador (a): Dr. Tatyane de Souza Cardoso Quintão**

**BRASÍLIA, 2023**

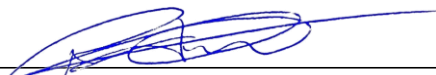
Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cd	<p>Cavalcante Maia, Alicia Detecção molecular de dengue em amostras de swab nasofaríngeo / Alicia Cavalcante Maia; orientador Rodrigo Haddad; co-orientador Tayane de Souza Cardoso Quintão. -- Brasília, 2023. 41 p.</p>
	<p>Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2023.</p>
	<p>1. Dengue. 2. RT-PCR em tempo real. 3. swab nasofaríngeo. I. Haddad, Rodrigo, orient. II. de Souza Cardoso Quintão, Tayane, co-orient. III. Título.</p>

ALICIA CAVALCANTE MAIA

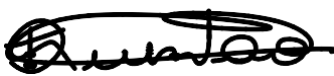
**DETECÇÃO MOLECULAR DE DENGUE EM AMOSTRAS DE SWAB  
NASOFARÍNGEO**

**BANCA EXAMINADORA**



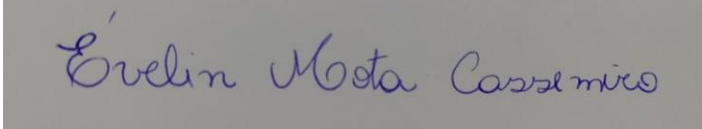
---

Orientador (a): Prof. Dr. Rodrigo Haddad  
(Universidade de Brasília/ FCE)



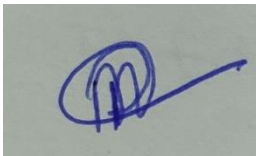
---

Co-Orientador (a): MSc. Tayane de Souza Cardoso Quintão  
(Universidade de Brasília)



---

MSc. Évelin Mota Cassemiro  
(Universidade de Brasília)



---

MSc. Pâmela Maria de Oliveira  
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

Aos meus pais e minha irmã, que sempre me apoiaram e permitiram que eu chegasse até aqui. E a minha tia Antônia, “mãe-titia”, que sempre me amou e cuidou de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, por tudo que realizou na minha vida durante todos esses anos.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais, Antônia e Elder, e a minha irmã Andreza, que sempre me ensinaram, me apoiaram e acreditaram junto comigo no meu sonho, sem eles eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor, paciência e dedicação durante esses anos de graduação.

As minhas amigas/irmãs de vida, Luana, Viviane, Monicky e Cássia, obrigada por me ensinarem o verdadeiro valor de uma amizade, e que nunca devemos desistir dos nossos sonhos, pois nenhum obstáculo é grande o suficiente que não possa ser superado.

Agradeço as amigas que a faculdade me deu, Ester, Giovana e Mariana, obrigada por toda cumplicidade, ajuda, carinho e respeito durante todos esses anos, vocês se tornaram parte da minha vida e fizeram dela mais importante.

Gostaria de agradecer também a todos que me ajudaram no desenvolvimento desse projeto, em especial as MSc., Pâmela, Tatyane e Évelin, obrigada por me ensinarem tanto e por toda paciência que tiveram comigo durante esse tempo.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Haddad, que confiou em mim para realizar esse trabalho, e por toda a orientação, paciência e aprendizado dentro e fora de sala de aula. Foi um privilégio.

## RESUMO

A dengue é uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e tem como agente etiológico o vírus da dengue (DENV). O DENV, é um *Flavivírus*, pertencente à família *Flaviviridae*, e pode ser classificado em quatro sorotipos, sendo eles: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Esses sorotipos de DENV são responsáveis por causar uma variação da doença que vai desde infecções assintomáticas ou sintomáticas leves como febre de dengue (FD), até quadros mais graves da doença, como dengue com sinais de alarme ou dengue grave, podendo ser fatal. O diagnóstico da arbovirose em estudo, dengue, pode ser feito de forma direta, como ensaios de RT-PCR e RT- qPCR que fazem a pesquisa do RNA viral, ou de forma indireta, como ensaios de ELISA e imunocromatográficos que fazem a pesquisa de anticorpos. Ensaios de RT-qPCR, são a principal escolha para o diagnóstico durante a fase aguda da infecção, por serem rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, além de permitirem a detecção de mais de um patógeno em uma mesma reação. O objetivo do estudo foi realizar a detecção de dengue em amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes com diagnóstico molecular positivo após testagem molecular do soro. A metodologia utilizada foi a técnica de RT-qPCR para a identificação do vírus da dengue em amostra de soro, e nas que apresentaram sorologia positiva, foi realizada a análise posterior com amostras de *swab* que foram colhidas de forma pareada. Das 877 amostras de soro analisadas de pacientes suspeitos de infecção por dengue, 41 delas apresentaram resultados positivos (4,67%). Dos casos positivos para o DENV-1 no soro, 28 também foram positivos no *swab* (68,29%). O teste teve um valor de acurácia de 84,1% e um  $p > 0,05$ . A partir dos resultados, concluímos que o uso de amostras de *swab* nasofaríngeo para detectar dengue por RT-qPCR é uma opção de diagnóstico promissora, pois permite diagnosticar tanto a dengue quanto outras doenças, como a COVID-19, com apenas uma amostra.

**Palavras-chave:** Dengue; RT-PCR em tempo real; *swab* nasofaríngeo.

## ABSTRACT

Dengue is a viral disease transmitted by the mosquito *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* and has as etiological agent the dengue virus (DENV). DENV is a flavivirus, belonging to the Flaviviridae family, and can be classified into four serotypes, namely: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. These DENV serotypes are responsible for causing a variation of the disease that ranges from asymptomatic or mild symptomatic infections such as dengue fever (DF), to more severe pictures of the disease, such as dengue with alarm signs or severe dengue, which can be fatal. The diagnosis of the arbovirus under study, dengue, can be made directly, using RT-PCR and RT - qPCR assays that investigate viral RNA, or indirectly, such as ELISA and immunochromatographic assays that investigate antibodies. RT-qPCR assays are the main choice for diagnosis during the acute phase of infection, because they are fast, with high sensitivity and specificity, in addition to allowing the detection of more than one pathogen in the same reaction. The aim of the study was to detect dengue fever in nasopharyngeal swab samples from patients with positive molecular diagnosis after serum molecular testing. The methodology used was the RT-qPCR technique for the identification of dengue virus in serum sample, and in those with positive serology, the subsequent analysis was performed with swab samples that were collected in a paired manner. Of the 877 serum samples analyzed from patients suspected of dengue infection, 41 of them showed positive results (4.67%). Of the positive cases for DENV-1 in serum, 28 were also positive in the swab (68.29%). The test had an accuracy value of 84.1% and a  $p > 0.05$ . From the results, we conclude that the use of nasopharyngeal swab samples to detect dengue by RT-qPCR is a promising diagnostic option, as it allows diagnosing both dengue and other diseases, such as COVID-19, with only one sample.

**Keywords:** Dengue fever, real-time RT-PCR, nasopharyngeal swab.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de soro.....	26
Tabela 2: Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de <i>swab</i> .....	27
Tabela 3: Resultado das amostras analisadas.....	27
Tabela 4: Dados de Cts de soro e <i>swab</i> .....	28
Tabela 5: Desempenho analítico e diagnóstico do kit ZDC-Biomol.....	28
Tabela 6: Análises estatísticas dos valores de CT do soro.....	29
Tabela 7: Resultados teste t para amostras de soro.....	30
Tabela 8: Combinação binária entre os resultados de soro e <i>swab</i> .....	30
Tabela 9: Resultados do teste de acúrcia.....	31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*.....16
- Figura 2: Evolução clínica e laboratorial da dengue.....18

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DENV – Vírus da Dengue

ZIKV – Vírus da Zika

CHIKV – Vírus Chikungunya

RNA – Ácido ribonucleico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

IIFT – Testes de imunofluorescência indireta

IgM – Imunoglobulina M

IgG - Imunoglobulina G

RT-PCR - Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase

RT-qPCR - Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real

FD – Febre da dengue

ORF – *Open Reading Frame* (Quadro de leitura aberto)

C – Capsídeo

prM – Membrana precursora

E – Envelope

NS – Proteína não estrutural

mRNA – RNA mensageiro

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ADE – Realce dependente de anticorpos (*Antibody-dependent enhancement*)

HI – Teste de inibição de hemaglutinação

MAC-ELISA - Testes imunoenzimáticos de captura de anticorpos

POC - *Point of Care* (Ponto de atendimento)

PRNT - Teste de neutralização por redução de placa

COVID-19 – Coronavírus

CT - Ciclo de limiar ou *Cycle Threshold*

μL – Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1. DENGUE</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA ARBOVIROSES</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Testes sorológicos ou indiretos .....	20
1.2.2. Teste moleculares em RT-PCR .....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>24</b>
<b>4. METODOLOGIA DETALHADA</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1. COLETA DE AMOSTRAS</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3. DETECÇÃO POR RT-PCR EM TEMPO REAL TaqMan®</b> .....	<b>25</b>
<b>4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>38</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são infecções virais transmitidas principalmente por mosquitos hematófagos, especialmente os do gênero *Aedes*, como o *Aedes aegypti*, e *Culex*, popularmente conhecido como “pernilongo” ou “muriçoca” (ROLO et al., 2021). Essas doenças são causadas por arbovírus (que deriva do inglês *Arthropoda-borne vírus*). As arboviroses são uma ameaça constante em regiões tropicais, devido as rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, ocupação desordenada, condições sanitárias precárias, entre outros fatores que favorecem a transmissão viral (LOPES et al., 2014).

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, como mosquitos, e fazem parte de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. O gênero *Flavivírus* é o mais relevante para a saúde humana e animal, pois é responsável por causar doenças como dengue, Zika, febre amarela e vírus West Nile (LICÍNIO; AYRES, 2021). De acordo com o Catálogo Internacional de Arbovírus, estima-se que existam mais de 500 espécies de vírus registradas, sendo que mais de 150 estão relacionadas a doenças humanas, como dengue, Chikungunya e febre Zika (CDC, 2022; REZENDE, 2021).

Esse grupo de vírus possui o RNA (ácido ribonucleico) como material genético, apresentando assim grande maleabilidade genética e maior propensão a mutações, facilitando sua adaptação entre diferentes tipos de hospedeiros, tanto vertebrados quanto invertebrados (DONALISIO et al., 2017). Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* atuam como vetores comuns dos vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), que são considerados os mais prevalentes entre os arbovírus no contexto brasileiro e representam uma importante questão de saúde pública devido a seu alto nível de morbidade e mortalidade (LOPES et al., 2014; LISBOA et al., 2022).

A circulação simultânea de infecções por DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil dificulta o manejo clínico devido às similaridades de sinais e sintomas, especialmente na fase aguda, podendo o indivíduo apresentar febre, cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia, mialgias, e em alguns casos, fadiga, mal-estar e exantemas, tendo implicações na transmissão em idosos, grávidas e crianças pequenas, e ainda possui uma limitada retaguarda laboratorial (LISBOA et al., 2022; DONALISIO, 2017).

Infecções por cada um desses vírus podem levar a complicações graves, e casos de coinfeções já foram relatados. Por isso, as análises laboratoriais

desempenham um papel importante no diagnóstico diferencial (HILGENFELD; VASUDEVAN, 2018).

O diagnóstico para as arboviroses, em especial para a dengue, pode ser feito de forma direta, como ensaios de reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT- qPCR) que fazem a pesquisa do RNA viral, ou de forma indireta, como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunocromatográficos que fazem a pesquisa de anticorpos (XAVIER et al., 2017; CHEN et al., 2015)

O teste ELISA pesquisa anticorpos da imunoglobulina da classe M (IgM), realizado durante as fases iniciais da doença. No entanto, o uso dessa metodologia acarreta inúmeras reações cruzadas entre os diversos arbovírus, sendo um fator negativo. Como alternativa, a RT-PCR se tornou o principal método para diagnóstico de arboviroses, no estágio inicial da doença (HU, et al., 2015).

Os diagnósticos moleculares, como a RT-PCR e RT-PCR em tempo real (RT- qPCR), possuem alta sensibilidade e especificidade (HU, et al., 2015). Várias matrizes biológicas podem ser usadas, como urina e saliva, além de sangue total, soro e plasma (HILGENFELD; VASUDEVAN, 2018; LICÍNO; AYRES, 2021). Porém, em algumas situações, como em pacientes pediátricos, a coleta de amostras de soro pode não ser tão simples.

## 1.1. DENGUE

A dengue é uma doença viral transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e tem como agente etiológico o vírus da dengue (DENV). Se trata de uma doença endêmica em muitos países tropicais e subtropicais, incluindo regiões da América Latina, África, Ásia e Oceania, e afeta milhões de pessoas anualmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). No Brasil, 1.172.882 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 549,8 casos por 100 mil hab.) foram notificados, entre os dias 2/1/2022 e 18/6/2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)

O DENV é um *Flavivírus*, pertencente à família Flaviviridae, e pode ser classificado em quatro sorotipos, sendo eles: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Esses sorotipos de DENV são responsáveis por causar uma variação da doença que vai desde infecções assintomáticas, sintomáticas leves como febre de dengue (FD),

até quadros mais graves da doença, dengue com sinais de alerta e dengue grave, podendo ser fatal (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020). O diagnóstico preciso e precoce da dengue é crucial para o gerenciamento adequado da doença e prevenção de complicações graves.

A organização genômica do vírus da dengue pertence à família *Flaviviridae* e é composta por um único filamento de ácido ribonucleico (RNA) de sentido positivo e fita simples sem caudas poli A no final 3'. O genoma do vírus da dengue tem cerca de 11 Kb de comprimento e possui uma única estrutura de leitura aberta (ORF) que codifica uma única poliproteína viral que é clivada pós-tradução em três proteínas virais estruturais (capsídeo, membrana precursora e envelope) e sete não-estruturais (proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis por auxiliar no processo de replicação viral (Figura 1) (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

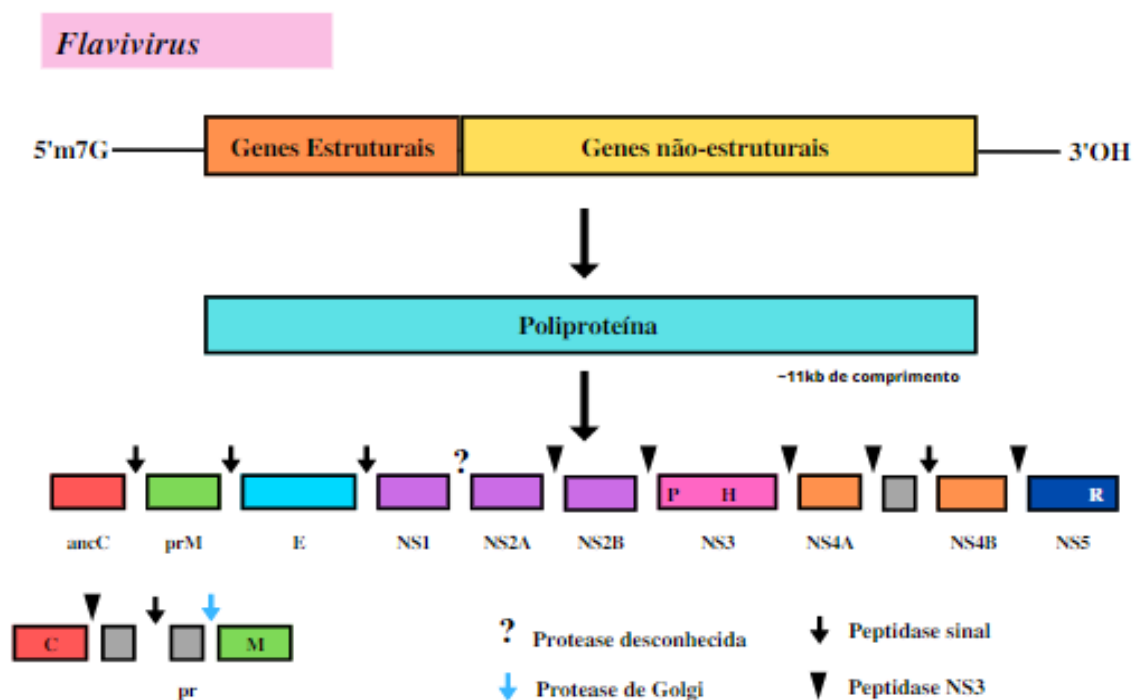


Figura 1: Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Tradução de uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares.

Fonte: Adaptado de Amaral, 2014.

A poliproteína viral é formada pela junção de múltiplas proteínas, cada uma codificada por um diferente segmento de RNA mensageiro (mRNA). As proteínas são então liberadas por meio da clivagem do polipeptídeo, processo que é controlado por enzimas específicas presentes no vírus. Os peptídeos são importantes para a



clivagem do polipeptídio viral, uma vez que elas são os sítios de clivagem da proteína, permitindo assim a liberação das proteínas individuais. O vírus da dengue expressa duas peptidases, a NS2B-NS3pro e a NS3-NS5, que são responsáveis pela clivagem do polipeptídio viral em proteínas funcionais (TRAVASSOS et al., 2010).

Os diferentes sorotipos da doença são distintos geneticamente, e sua diferença se deve pela diferença no número de nucleotídeos na região não traduzida do RNA viral. Além de diferentes sorotipos, cada um possui subtipos ou genótipos, sendo: DENV-1 com cinco genótipos distintos; DENV-2 com seis genótipos; DENV-3 possui cinco genótipos; DENV-4 possui quatro genótipos (ZANTTO; LEITE, 2018).

Essa variação genética é um dos fatores que influenciam no aumento da virulência, transmissibilidade, patogenicidade e viremia de certas cepas de DENV, e como consequência um aumento no risco de desenvolver formas graves da doença, devido a maior replicação no hospedeiro humano (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

Uma infecção primária por um dos sorotipos DENV confere imunidade transitória contra esse sorotipo específico, mas não contra os outros três. No caso de uma reinfeção heteróloga de DENV, o quadro clínico piora consideravelmente devido à resposta imune adaptativa de reação cruzada desajustada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021; CHEN et al., 2015). Tornando uma reinfeção por DENV mais grave do que a primeira. Estudos indicam que o aumento da viremia e a liberação exacerbada de marcadores inflamatórios na corrente sanguínea, como citocinas, foram associados ao aumento na gravidade da doença (PESSÔA et al., 2016).

Embora grande parte dos anticorpos se liguem ao sorotipo heterólogo, descobriu-se que esses anticorpos atuam aumentando a infecção, e não atuando de forma neutralizante contra o novo sorotipo. Esse fenômeno é chamado de realce dependente de anticorpos (ADE) e pode levar à imunopatogênese mais grave. Sinais clínicos tão graves podem estar relacionados com a rápida expulsão do vírus do organismo, assim o curso da infecção não se correlaciona apenas com a alta carga viral (CHEN et al., 2015; MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

A resposta imune humoral da dengue é caracterizada pela produção de anticorpos IgM e IgG antidengue. O número de infecções por dengue determina a natureza da resposta imunológica: primária, secundária, terciária ou quaternária. Anticorpos IgM anti-DENV são detectados na maioria dos casos no 7º dia

do início de sintomas (Figura 2) e persistem por cerca de 60 a 90 dias, em alguns casos, por até 6 meses (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

Em caso de infecção primária, os títulos de anticorpos IgG específicos para o vírus aumentam lentamente entre os dias 7 e 9 após o início da febre, começando a aparecer alguns dias após o anticorpo IgM. Em infecções secundárias, o anticorpo IgG aumenta rapidamente quase imediatamente após o início da febre, conforme Figura 2. Altos níveis de anticorpos IgM e IgG em um único soro são usados como marcadores de diagnóstico presuntivo de uma infecção recente por dengue (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

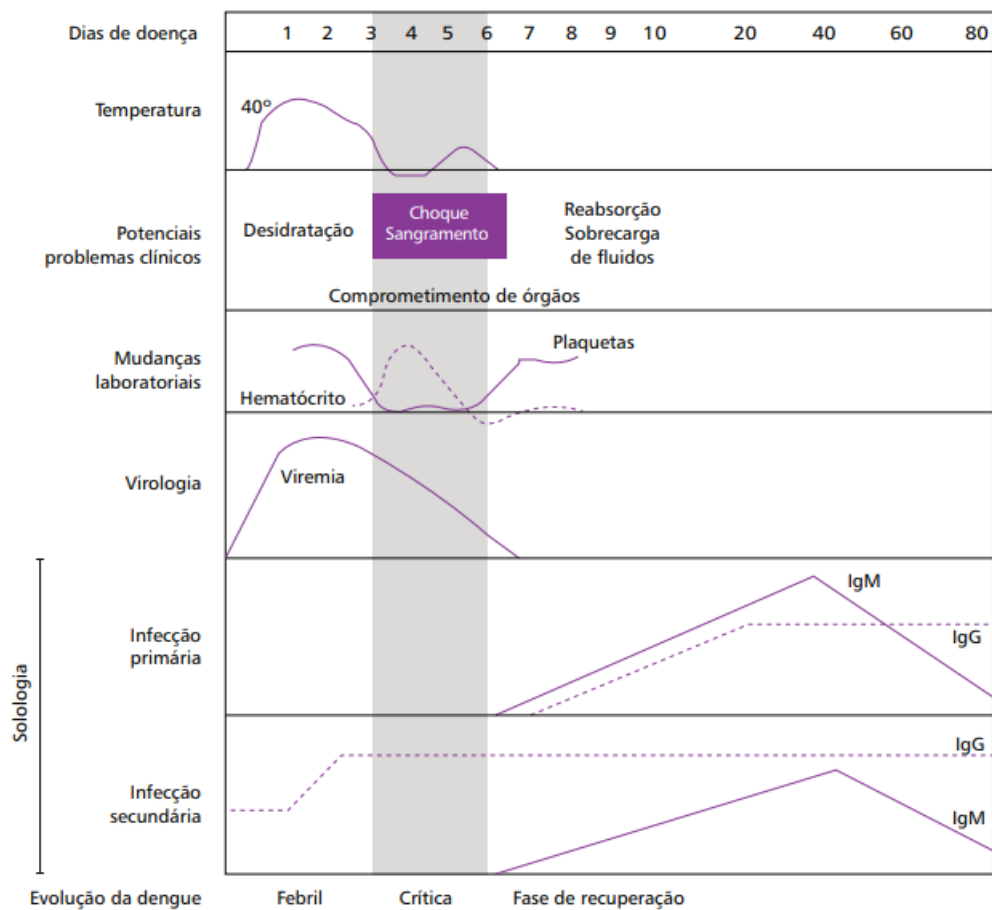


Figura 2. Evolução clínica e laboratorial da dengue. Fonte: Ministério da Saúde, Guia de Vigilância em Saúde, 2022

Embora não haja ligação entre os diferentes tipos de DENV e o curso clínico da doença, estudos sugeriram que os sorotipos DENV-2 e o DENV-3 são responsáveis por causar formas mais graves de doença com maior frequência do que outros sorotipos, e que DENV-1 e DENV-4 estão associados a uma condição mais

leve de sintomas (FARES, et al., 2015). O DENV-2 foi o sorotipo de maior prevalência nas Américas durante vários surtos, classificado epidemiologicamente como o mais significativo em todo o mundo, seguido por DENV-3, DENV-1 e DENV-4 (ZANOTTO; LEITE, 2018; PESSÔA et al., 2016). No ano de 2022, foram registrados 69.645 casos prováveis de dengue no Distrito Federal, sendo o sorotipo em circulação o DENV-1 (SES-DF, 2022)

A dengue clássica é uma condição aguda, que pode ser assintomática na maioria dos casos. No entanto, 20% das infecções apresentam sintomas, começando com a fase febril (temperaturas de até 40°C), que dura de 2 a 7 dias. Uma vez que um indivíduo é infectado pela picada de um mosquito contaminado com DENV, segue-se um período de incubação de 4 a 10 dias. A presença do vírus no sangue do paciente pode ser detectada 2 a 3 dias antes do início da febre a 5 a 6 dias após seu início (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

O diagnóstico na fase aguda da doença é realizado, preferencialmente, pela técnica molecular RT- qPCR, e o RNA do DENV pode ser extraído de soro ou plasma, bem como de sangue total. A sorologia ou pesquisa de anticorpos é o método de escolha para o diagnóstico no final da fase aguda da doença (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

A proteína NS1 é uma proteína não estrutural produzida pelo vírus da dengue (DENV) durante a infecção. Ela é detectada no sangue dos pacientes infectados e é considerada um importante indicador de infecção por dengue (GUBLER, 2017). Estudos mostraram que a presença de NS1 no plasma do paciente é prolongada e pode ser detectada desde o início dos sintomas até 7 dias após o início da febre (RICO-HESSE, 2017). A proteína NS1 é alvo de muitas pesquisas visando desenvolver testes diagnósticos rápidos e eficientes para dengue (GUBLER, 2017).

Os esforços para controlar a disseminação da envolve medidas preventivas como a eliminação de ambientes com água parada, que servem de criadouros do mosquito e o uso de repelentes. Além disso, o controle vetorial com o uso de inseticidas é uma estratégia importante para reduzir a população de mosquitos transmissores. Outras formas de combate também são desenvolvidas, como a utilização de mosquitos geneticamente modificados e vacinas. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021; EMBRAPA, 2017).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprovou o registro da vacina da dengue desenvolvida pelo laboratório Takeda™, por meio da Resolução-RE nº 661, de 2 de março de 2023.

## **1.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA ARBOVIROSES**

Os marcadores para diagnóstico de dengue dependem do tempo de infecção, da resposta imune, dos métodos e técnicas a serem utilizados. Durante os estágios iniciais da doença, métodos de detecção diretos, como o isolamento do vírus, detecção do antígeno e do RNA viral podem ser usados para diagnosticar e diferenciar as infecções (BRASIL, 2017).

Existem duas formas principais de se realizar o diagnóstico laboratorial para a dengue. A primeira é, indiretamente, através da detecção de anticorpos no sangue do paciente com suspeita de infecção, e a segunda é, diretamente, por meio da detecção do patógeno no sangue e/ou outros fluidos corporais, como urina e saliva (LICÍNIO; AYRES, 2021).

O isolamento do vírus é considerado padrão ouro para o diagnóstico de dengue, porém é um método demorado, o que acaba limitando seu uso rotineiro no laboratório. Sendo assim, técnicas de detecção de anticorpos específicos do vírus e detecção de RNA viral são mais amplamente utilizados para o diagnóstico (CHEN et al., 2015).

O teste de Inibição da Hemaglutinação (HI) é considerado o padrão de ouro para identificar uma infecção primária ou secundária de dengue. Para isso, é necessário comparar amostras de soro antes e depois da infecção. No entanto, devido ao tempo de espera e à dificuldade em obter uma segunda amostra de soro, o método mais comum usado é o ELISA (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

O diagnóstico durante a fase aguda de uma infecção permite uma avaliação dos riscos e é importante para o manejo do caso e tratamento. Amostras clínicas devem ser coletadas o mais cedo possível e preferencialmente nos primeiros 3 dias do início de sintomas (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

### **1.2.1. Testes sorológicos ou indiretos**

O diagnóstico por meio da sorologia é fundamentado na detecção de anticorpos de imunoglobulina M (IgM), e na soroconversão de IgM em anticorpos específicos de

imunoglobulina G (IgG) (GIRY et al., 2017). Os testes imunoenzimáticos de captura de anticorpos IgM (MAC - ELISA) e imunocromatográfico do tipo *Point of Care* (POC), são mais utilizados para a pesquisa de anticorpos específicos. Esses testes permitem a detecção de anticorpos do tipo IgM a partir do segundo dia após o início dos sintomas, porém o período mais indicado para se realizar a sorologia é a partir do quinto dia; e a partir do sexto dia para anticorpos do tipo IgG (ROMEIRO et al., 2016; BRASIL, 2017). A detecção de um aumento de quatro vezes de IgG ou IgM (soroconversão de anticorpos) em soros pareados é considerado como um critério para o diagnóstico de dengue (MUURGESAN; MANOHARAN, 2020).

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e os testes de imunofluorescência indireta (IIFT) baseados em antígenos otimizados permitem a detecção sensível e específica de anticorpos contra DENV no soro ou plasma do paciente (HILGENFELD; VASUDEVAN, 2018).

O teste imunocromatográfico pode ser utilizado como uma forma de triagem, em especial para detecção do antígeno NS1 de DENV e dos anticorpos IgM/IgG anti-NS1, devido a sua rapidez, facilidade de realização, sensibilidade e especificidade, e pode ser utilizado com diversos fluidos biológicos como sangue total, soro, plasma, saliva e urina. Entretanto, quando o resultado é positivo é necessário realizar sua confirmação por sorologia ELISA ou RT-PCR a partir de uma nova amostra (BRASIL, 2017; CORRÊA, 2020).

Dependendo da técnica utilizada durante o uso de testes sorológicos para o diagnóstico de dengue podem ocorrer reações cruzadas entre anticorpos IgM/IgG dos vírus Zika e de *Flavivirus* endêmicos, prejudicando assim a especificidade dos testes, dificultando o diagnóstico e a vigilância epidemiológica. Por isso, se faz necessário a realização do teste de confirmação específico, como o teste de neutralização por redução de placa (PRNT) (CORMAN et al., 2016).

O teste de detecção de antígeno NS1 do vírus DENV usando ELISA de captura é altamente sensível (mais de 90%) para identificar infecções primárias por DENV. No entanto, para infecções secundárias, sua sensibilidade varia de 60 a 80%. Este teste não é adequado para triagem de doadores de sangue. Alguns testes NS1 ELISA têm baixa sensibilidade para o vírus DENV-4, o que tem afetado a precisão da notificação de dados epidemiológicos casos de DENV-4 no Brasil (FARES, et al., 2015).

### 1.2.2. Teste moleculares em RT-PCR

Os testes moleculares, como a transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) se baseiam na detecção do RNA viral, por meio da amplificação do material genético do vírus. A RT-PCR em tempo real permite a mensuração do produto simultaneamente à síntese de RNA, o que simplifica sua execução pois elimina processamentos pós-amplificação, como, a eletroforese em gel de agarose, necessários para a detecção do amplicon (CORRÊA et al., 2020).

Ensaio de RT-qPCR, são a principal escolha para o diagnóstico durante a fase aguda da infecção, por serem rápidos, com alta sensibilidade e especificidade, além de permitirem a detecção de mais de um patógeno em uma mesma reação (multiplex qPCR) (GIRY et al., 2017)

A monitorização em tempo real da amplificação do RNA alvo pode ser feita usando corantes fluorescentes, como o SYBR® *Green I* entre os reagentes, o qual se liga de forma não específica ao amplicon gerado durante a reação, ou através do uso de sondas de RNA marcadas com fluorescência, como o sistema TaqMan® que se ligam de maneira específica ao alvo de amplificação (CORRÊA et al., 2020).

Um dos problemas enfrentados no diagnóstico molecular é a mutação em sítios de ligação dos *primers*, especialmente em vírus de RNA altamente mutáveis, o que pode resultar em resultados falsos negativos. A fim de evitar resultados falso negativos, ensaios de RT-qPCR com alta sensibilidade são importantes. Uma das formas de se melhorar a sensibilidade clínica, é utilizando o método de purificação de RNA com volumes maiores de amostras clínicas (CORMAN et al., 2016; EDWARDS et al., 2017).

Ensaio de RT-qPCR baseado em TaqMan® para detecção de DENV possuem uma alta sensibilidade e especificidade (100%), quando comparados ao RT-PCR convencional (EDWARDS et al., 2017; CHEN et al., 2015). Por outro lado, os ensaios baseados em SYBR® *Green I* podem levar a resultados falso positivos devido a uma desvantagem química que faz com que ele se ligue a qualquer dupla fita gerada, incluindo produtos não específicos de PCR e dímeros de primer (CHEN et al., 2015).

Diante desse cenário, o presente estudo teve por objetivo avaliar a utilização de amostras de *swab* nasofaríngeo na detecção de dengue, utilizando-se de amostras de pacientes com sorologia positiva para essa infecção após análise posterior a coleta.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Realizar a detecção de dengue em amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes com diagnóstico molecular positivo após testagem molecular do soro.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar os casos confirmados de infecção por dengue de acordo com as manifestações clínicas e agente infeccioso identificado em amostras de soro;
- Avaliar a utilização de amostras de *swab* nasofaríngeo para a detecção de dengue;
- Avaliar a porcentagem de casos de pacientes conhecidamente positivos para infecções por arbovírus após testagem no soro que testaram positivos em amostras de *swab*.

### 3. JUSTIFICATIVA

A partir do estudo utilizando-se a ferramenta de metagenômica, foi possível detectar a presença de partículas do vírus Chikungunya em amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes com sinais de infecção viral, que apresentaram resultado negativo para COVID-19, mas teve sua presença confirmada por RT-qPCR (QUINTÃO et al., 2022). Diante dessa descoberta, observou-se que, além do cenário de negligência de outras doenças virais circulantes durante a pandemia de COVID-19, a detecção de agentes virais que tradicionalmente são detectadas em amostras de soro, também poderia ser possível por meio de amostras de *swab* nasofaríngeo. Ainda, em algumas situações, como em pacientes pediátricos, a obtenção de amostras de soro pode não ser tão simples, devido à complexidade da coleta de sangue. A utilização de amostras de *swab* nasofaríngeo para a detecção molecular de arboviroses é uma alternativa a ser testada, além do que, com uma única amostra é possível a realização do teste para demais doenças virais, como COVID-19.



## **4. METODOLOGIA DETALHADA**

### **4.1. COLETA DE AMOSTRAS**

As amostras foram coletadas de usuários do SUS residentes na Região Administrativa XXV SCIA/Estrutural, que buscaram atendimento em saúde na UBS Vila Estrutural com manifestação febril aguda ou com referência a quadro febril agudo nos três dias anteriores, acompanhado por, pelo menos dois dos sinais/sintomas relacionados a infecções virais (por exemplo: dor de cabeça, mialgia, astenia, vômito, náuseas, diarreia, artralgia, entre outros). Para cada paciente foi coletado uma amostra de soro e *swab* nasofaríngeo pela equipe especializada.

As amostras de sangue foram coletadas da veia de um dos antebraços (fossa cubital) e utilizaram-se tubos contendo gel separador (5mL). Para a coleta da amostra de *swab* da região nasofaríngea foram utilizados *swab* de Rayon e meio de transporte viral - VTM (Laborclin™). Após as coletas, as amostras foram encaminhadas, em temperatura controlada, para o Laboratório de Diagnóstico Molecular do Hospital Universitário de Brasília, e lá, foram extraídas amostras de RNA viral e em seguida, armazenadas em freezer a -80°C até o momento da análise.

### **4.2. EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL**

Para a extração do RNA viral, se utilizou o Extracta Kit Fast - DNA e RNA viral (MVXA-P016 FAST Locus™), e a plataforma de extração automatizada EXTRACTA 32, marca Locus™. A extração ocorreu de acordo com as recomendações do fabricante.

### **4.3. DETECÇÃO POR RT-PCR EM TEMPO REAL TaqMan®**

Após extração automatizada do RNA viral, foram realizados os ensaios para a detecção, no soro, do vírus dengue (sorotipos 1,2,3,4), por meio de RT-qPCR. Para o teste foi utilizando o kit ZDC Biomol (zika, dengue e Chikungunya), desenvolvido pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), e seguiu-se as instruções de acordo com o fabricante, exceto, com relação ao volume de RNA que precisou ser adaptado para a realização dos testes.

O volume final da reação foi de 20 µL, os quais eram 15 µL do master mix preparado e 5 µL do RNA extraído da amostra. O master mix foi preparado

separadamente em 2 microtubos, cada um devidamente identificado com “DEN 1/4” e “DEN 2/3”, respectivamente. Em cada microtubo foi adicionado os seguintes reagentes: mistura para PCR, água RNase free, conjunto de iniciadores específicos, conjunto de sondas específicas e enzima RT, conforme Tabela 1. O valor que foi utilizado de cada reagente variou de acordo com o número de reações que eram realizadas, sendo no mínimo 1 e no máximo 28 reações.

**Tabela 1:** Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de soro.

<b>Cálculo master mix (µL)</b>		
<b>Reagentes</b>	<b>1 reação</b>	<b>28 reações</b>
Mistura PCR	6,66	186,48
Água RNase free*	4,84	135,52
Iniciadores	2	56
Sonda	1	28
Enzima RT	0,5	14

Fonte: Instruções de uso – KIT BIOMOL ZDC.

\*Foi necessário adaptar o valor utilizado de água RNase free para que se pudesse utilizar um volume menor de amostra, sem que houvesse prejuízo na reação.

As reações foram realizadas em placas de PCR de 96 poços, sendo até 22 poços para reação de amplificação e detecção de amostras de pacientes, para cada conjunto de alvos, totalizando 44 poços; e 2 poços para reações de controle positivo e negativo para cada conjunto de alvos. Foi utilizada a plataforma de PCR em tempo real QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) para a execução dos testes, seguindo as recomendações de composição da reação e ciclagem recomendadas no kit diagnóstico citado (ZDC Biomol).

Aqueles pacientes cujas amostras de soro se apresentaram positivas para dengue tiveram suas amostras de *swab* nasofaríngeo (colhidas de forma pareada) testadas para esses mesmos agentes virais pela mesma técnica de RT-qPCR.

Para as amostras de *swab*, o volume final da reação foi de 20 µL, os quais eram 10,2 µL do master mix preparado e 9,8 µL do RNA extraído da amostra. O master mix foi preparado separadamente em 2 microtubos, cada um devidamente identificado com “DEN 1/4” e “DEN 2/3”, e teve alterações no cálculo de composição, conforme Tabela 2. O valor que foi utilizado de cada reagente variou de acordo com o número de reações que eram realizadas. Após o preparo do master mix, seguiu-se a mesma metodologia utilizada para as amostras de soro.

**Tabela 2:** Cálculo para preparo do master mix utilizado para amostras de *swab*.

<b>Cálculo master mix (µL)</b>		
<b>Reagentes</b>	<b>1 reação</b>	<b>28 reações</b>
Mistura PCR	6,66	186,48
Iniciadores	2	56
Sonda	1	28
Enzima RT	0,5	14

Fonte: Instruções de uso – KIT BIOMOL ZDC

Foi necessário retirar o volume utilizado de água RNase *free* para que se pudesse utilizar um volume maior de amostra, sem que houvesse prejuízo na reação.

Os resultados de detecção obtidos das amostras de *swab* nasofaríngeo foram comparados aos resultados obtidos de amostras de soro, avaliando assim viabilidade da utilização de amostras de *swab* nasofaríngeo na detecção de dengue na fase aguda (viremia) da infecção.

#### 4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas, se utilizou a calculadora de teste t não pareado da plataforma GraphPab *by* Dotmatics, onde se utilizou os dois valores de média obtidos, amostras positivas e amostras negativas, e seus respectivos valores de desvio padrão. Os valores de média e desvio padrão foram calculadas utilizando-se do Microsoft Excel. A obtenção do valor de acurácia seguiu a fórmula padrão estabelecida ( $acurácia = (VP + VN) / (VP + FN + VN + FP)$ ), e seu cálculo foi realizado na plataforma Microsoft Excel (Tabela 3).

**Tabela 3:** Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

		<b>Detectada</b>	
		<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Real</b>	Positivo	Verdadeiro positivo (VP)	Falso negativo (FN)
	Negativo	Falso positivo (FP)	Verdadeiro negativo (VN)
	Total	VP + FN	FP + VN

Fonte: Adaptado de Lima, 2014.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram examinadas 877 amostras de soro de pacientes suspeitos de infecção por dengue, e 41 delas apresentaram resultados positivos na RT-PCR em tempo real. Dos casos positivos para o DENV-1 no soro, 28 também foram positivos no *swab* (68,29%). No entanto, 13 amostras de *swab* de pacientes que foram positivas no soro não apresentaram presença do DENV-1 (Tabela 4)

**Tabela 4:** Resultado das amostras de *swab* analisadas

	<b>POSITIVAS SWAB</b>	<b>NEGATIVAS SWAB</b>
<b>ID DAS AMOSTRAS</b>	2587, 2609, 2612, 2627, 2628, 2646, 2654, 2656, 2528, 2670, 2692, 2699, 2707, 2711, 2721, 2732, 2748, 2762, 2768, 2780, 2793, 2800, 2804, 2810, 2812, 2846, 2848, 2952	2643, 2644, 2573, 2676, 2677, 2693, 2696, 2739, 2770, 2773, 2776, 2851, 3183.
<b>TOTAL</b>	28 amostras	13 amostras

Fonte: Autoria própria

Com relação ao kit utilizado para as reações de RT-qPCR, seu desempenho tem características de não apresentar reações cruzadas com outros patógenos que apresentem sintomas clínicos parecidos. A utilização de sondas TaqMan® faz com que a especificidade analítica do kit chegue a 100%, visto que, essas sondas possuem a característica de serem específicas para o alvo à qual foram projetadas. Os valores de desempenho analítico e diagnóstico do teste ZDC-Biomol estão presentes na Tabela 5.

**Tabela 5 :** Desempenho analítico e diagnóstico do kit ZDC-Biomol

<b>Alvos</b>	<b>Sensibilidade analítica</b>	<b>Especificidade analítica (%)</b>	<b>Sensibilidade diagnóstica (%)</b>	<b>Especificidade diagnóstica (%)</b>
Dengue 1	129 cópias/reação	100	94,7%	100
Dengue 2	494 cópias/reação	100	100	100
Dengue 3	95 cópias/reação	100	100	100
Dengue 4	684 cópias/reação	100	100	100

Fonte: Adaptado de Instruções de uso Kit ZDC-Biomol

Para avaliar a influência da carga viral de DENV-1 no soro, mesmo que de forma indireta, avaliamos a média de CTs (“*Cycle Threshold*” ou ciclo limiar) das amostras que se apresentaram positivas no soro, e que se apresentaram positivas e negativas no *swab* (Tabela 6).

*Cycle Threshold* ou Ciclo de limiar (CT) é uma métrica utilizada em testes de RT-qPCR para detectar a presença de RNA de um vírus ou bactéria. É o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência atravesse um determinado limiar e indique que o RNA alvo foi amplificado. Um valor mais baixo de CT indica uma carga viral mais alta, e um valor mais alto de CT sugere uma carga viral mais baixa. Os valores de CT podem ser usados para determinar a fase de uma infecção ou a efetividade de um tratamento (AL BAYAT, 2021).

**Tabela 6:** Dados de CTs de soro e *swab*

<b>ID da amostra</b>	<b>CT soro</b>	<b>CT <i>swab</i></b>
2587	20	33
2609	23	30
2612	14	27
2627	13	35
2628	14	29
2643	28	Não detectado
2644	34	Não detectado
2646	11	30
2654	20	31
2656	19	34
2528	15	29
2573	22	Não detectado
2670	25	30
2676	15	Não detectado
2677	23	Não detectado
2692	16	31
2693	29	Não detectado
2696	16	Não detectado
2699	17	30
2707	31	34
2711	16	28
2721	17	32
2732	24	33
2739	13	Não detectado
2748	15	30
2762	20	27
2768	16	33
2770	25	Não detectado
2773	27	Não detectado
2776	26	Não detectado
2780	18	25

Continua

ID da amostra	CT soro	CT swab
2793	19	31
2800	35	32
2804	34	26
2810	20	27
2812	18	29
2846	31	34
2848	15	25
2851	15	Não detectado
2952	17	26
3183	35	Não detectado

Fonte: Autoria própria

A média de CTs das amostras que positivaram no soro, foi de  $21 \pm 6,69$  (média  $\pm$  desvio padrão). Dentro desse grupo de amostras, aquelas que positivaram no *swab* obtiveram uma média de CT no soro de  $19,75 \pm 6,19$  e as que se apresentaram negativas no *swab* uma média de CT no soro  $23,69 \pm 6,94$ . Apesar da média de CT das amostras positivas no soro que também se apresentaram positivas no *swab* ser menor (ou seja, maior carga viral), a diferença em relação à média de CT das amostras positivas no soro que foram negativas no *swab* não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), ou seja, não foi observada uma diferença significativa ao comparar as amostras positivas e negativas (Tabela 7).

Tabela 7: Resultados teste t para amostras de soro.

Grupo	Positivo	Negativo
Média	19,75	23,69
Desvio Padrão	6,19	6,94
Valor de $p$	<b>0,0756</b>	

Fonte: Autoria própria

Também foi feita a testagem de 41 amostras de *swab* que foram negativas no soro, a fim de realizar demais cálculos como o teste de acurácia, e avaliar parâmetros com sensibilidade e especificidade do estudo. O valor de acurácia do teste foi de 84,1%, conforme Tabelas 8 e 9. Um valor alto de acurácia para um teste é de suma importância para que se tenha confiança nos resultados obtidos, visto que, esse valor representa a proporção de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, ou seja, quanto maior a acurácia de um teste, maior é a precisão para determinar se um resultado é positivo ou negativo.

Tabela 8: Combinação binária entre os resultados de soro e *swab*

	<b>Positivo (<i>swab</i>)</b>	<b>Negativo (<i>swab</i>)</b>	<b>Total</b>
<b>Positivo (soro)</b>	28	13	41
<b>Negativo (soro)</b>	0	41	41
<b>Total</b>	28	54	82

Fonte: Autoria própria

Tabela 9: Resultados do teste de acúrcia

<b>Sensibilidade</b>	100%
<b>Especificidade</b>	75,9%
<b>Valor preditivo positivo</b>	68,3%
<b>Valor preditivo negativo</b>	100%
<b>Acurácia</b>	84,1%

Fonte: Autoria própria

O estudo desenvolvido por Tavakoli e colaboradores (2007), foi o primeiro a confirmar a presença do DENV-1 em amostras de *swab* de nariz e garganta, de um paciente vindo de uma região endêmica, utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real. Em 2017, Cheng e colaboradores, por meio de seus resultados, também relataram que foi possível isolar com sucesso o vírus da dengue a partir de amostras respiratórias de quatro pacientes com a doença, utilizando a técnica de RT-PCR convencional. A presença do vírus da dengue em amostras respiratórias é um achado importante, pois isso sugere que o vírus pode ser transmitido por via respiratória e podem ter implicações para a prevenção, diagnóstico e controle da doença, especialmente em áreas onde a infecção pelo vírus da dengue é endêmica, porém mais estudos são necessários para confirmar essa possível via de transmissão.

Em nosso estudo, foi identificado que 28 amostras que já haviam positivado no soro, foram positivas no *swab*, isso corrobora com os estudos de (Tavakoli et, al., 2007; Cheng et, al., 2017). Além disso, realizamos uma avaliação e comparação indiretamente da carga viral presente nas amostras de soro e nasofaringe, por meio do valor de Ct. Essa avaliação demonstrou que não houve uma diferença significativa entre as amostras positivas e negativas de *swab*, quando se compara seus valores de Cts obtidos no soro.

Poloni e colaboradores (2010) em sua pesquisa, avaliaram a presença do vírus da dengue em diferentes tipos de amostras, além da amostra sanguínea tradicional. Os resultados do estudo indicaram que o vírus da dengue pode ser detectado tanto

na saliva quanto na urina, sugerindo que esses fluidos corporais podem ser utilizados como fontes alternativas de amostras para o diagnóstico de dengue. Isso pode ser importante, especialmente em situações em que a coleta de amostra sanguínea é difícil ou inviável. Já em um estudo mais recente realizado por Humaidi e colaboradores, (2021), os resultados indicaram que a sensibilidade da detecção do vírus em saliva e urina parece ser comparável à da detecção em amostra sanguínea.

Além disso, a presença do vírus na saliva e na urina parece estar relacionada com a carga viral no sangue. Portanto, a detecção do vírus da dengue em amostras não invasivas, como saliva e urina, é importante para o diagnóstico precoce e a monitorização da evolução da doença.

Portanto, a RT-PCR em tempo real é uma ferramenta valiosa para o diagnóstico da dengue e pode ser utilizada para detectar o vírus da dengue em diferentes tipos de amostras, incluindo sangue, urina e saliva. É importante destacar que a RT-PCR em tempo real deve ser usada em conjunto com outros testes clínicos para um diagnóstico preciso e confiável da dengue.



## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados, concluímos que o uso de amostras de *swab* nasofaríngeo para detectar dengue por RT-qPCR é uma opção de diagnóstico promissora, pois permite diagnosticar tanto a dengue quanto outras doenças, como a COVID-19, com apenas uma amostra. No entanto, é necessário realizar mais pesquisas para avaliar como a fase da doença afeta a carga viral presente nas amostras nasofaríngeas. Dessa forma, poderemos determinar o melhor momento para realizar o teste de *swab* e maximizar sua sensibilidade e especificidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL BAYAT, Soha et al. Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 9, p. 1201-1205, 2021.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya: manejo clínico**. MS, 2017.

CDC. Arbovirus Catalog – Virus Selection, US Department of Health and Human Services, CDC. Acessado em setembro de 2022.

CHEN, Huixin et al. Development and evaluation of a SYBR green–based real-time multiplex RT- PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 6, p. 722-728, 2015

CHENG, Nai-Ming et al. Isolation of dengue virus from the upper respiratory tract of four patients with dengue fever. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005520, 2017.

CORMAN, Victor M. et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 12, p. 880, 2016.

CORRÊA, Jordana Farias et al. Avaliação sorológica e molecular de pacientes com suspeita de arboviroses em uma unidade municipal de saúde de Goiânia-Goiás. 2020.

DE SANTANA, Julliana Ferrari Campêlo Libório et al. Agravos clínicos decorrentes das arboviroses: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e46010212057-e46010212057, 2021.

DO AMARAL, Raquel Juliana Vionette; DANSA-PETRETSKI, Marilvia. CAPÍTULO 14 Interação Patógeno-Vetor: Dengue. 2012.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública." **Revista de saúde pública**, v. 51, 2017

DOS SANTOS, Nayara Rocha et al. A EVOLUÇÃO DE CASOS DE ARBOVIROSES DENGUE, CHIKUNGUNYA E ZIKA VÍRUS NO BRASIL ENTRE 2018 E 2020. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101956, 2022.

EDWARDS, Thomas et al. Analytical and clinical performance of a Chikungunya qRT-PCR for Central and South America. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 89, n. 1, p. 35-39, 2017.

EMBRAPA. Ações e campanhas – Combate ao *Aedes aegypti*. Acessado em março de 2023.

- EPPEL, Catherine et al. Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 216, n. 3, p. 209- 225, 2017
- FARES, Rafaelle CG et al. Epidemiological scenario of dengue in Brazil. **BioMed research international**, v. 2015, 2015
- GANGULY, Advaita et al. Heterosandwich immunoswab assay for dengue virus Ns1 antigen detection. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 1, p. 35-39, 2014.
- GIRY, Claude et al. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017
- GUBLER, D. J. (2017). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), 487–496.
- HILGENFELD, Rolf; VASUDEVAN, Subhash G. (Ed.). **Dengue and Zika: control and antiviral treatment strategies**. Singapore: Springer, 2018
- HU, Sheng-feng et al. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2015.
- HUMAI, Mahathir et al. Non-invasive dengue diagnostics—the use of saliva and urine for different stages of the illness. *Diagnostics*, v. 11, n. 8, p. 1345, 2021.
- IBMP. Instruções de uso - KIT BIOMOL ZDC. 2019.
- KAWAI, Yasuhiro et al. Increased growth ability and pathogenicity of American-and Pacific- subtype Zika virus (ZIKV) strains compared with a Southeast Asian-subtype ZIKV strain. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 6, p. e0007387, 2019
- LICÍNIO, Christiane OL; AYRES, Flávio M. O uso de PCR em tempo real em diagnósticos de arboviroses: revisão integrativa. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021.
- LIMA, Rafaela Natiéli et al. Avaliação e comparação entre kits laboratoriais “d-dímero” como diagnóstico de trombose venosa profunda. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 5, n. 1, p. 12-20, 2014.
- LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016.
- LISBOA, Thiago Rodrigues et al. Relação entre incidência de casos de arboviroses e a pandemia da COVID-19. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 6, 2022

- LOWE, Rachel et al. The Zika virus epidemic in Brazil: from discovery to future implications. **International journal of environmental research and public health**, v. 15, n. 1, p. 96, 2018
- LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10-10, 2014.
- MAUCOURANT, Christopher et al. Control of acute arboviral infection by natural killer cells. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 131, 2019
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 24 de 2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente**. Volume 53. N.º 24, 2022
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente**. Volume 54. N.º 1, 2023
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância em Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente**. 5ª edição revisada e atualizada – versão eletrônica, 2022
- MURUGESAN, Amudhan; MANOHARAN, Mythreyee. Dengue virus. In: **Emerging and Reemerging Viral Pathogens**. Academic Press, 2020. p. 281-359.
- PESSÔA, Rodrigo et al. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in Pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and dengue virus type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, 2016.
- POLONI, Telma R. et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virology journal**, v. 7, n. 1, p. 1-4, 2010.
- QUINTÃO, Tatyane de Souza Cardoso et al. Viral metagenomics in nasopharyngeal swabs of Brazilian patients negative for SARS-CoV-2 unveils the presence of Chikungunya virus infection. **Journal of Infection**, v. 84, n. 2, p. e24-e26, 2022.
- REZENDE, Rubens Barbosa. "Análise epidemiológica das arboviroses emergentes e reemergentes no Brasil entre os anos de 2019 e 2020." **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e33010212611-e33010212611, 2021.
- RICO-HESSE, R. Dengue virus evolution and its impact on global health. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 81(3), 487–496, 2017
- ROLO, Carolina de Araújo et al. Detecção molecular de arbovírus emergentes: West Nile, Saint Louis e Mayaro. Universidade Federal da Bahia, 2021.

- ROMEIRO, Marília Farignoli et al. Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 279-285, 2016.
- SES-DF. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre Chikungunya, doença aguda pelo zika e febre amarela até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Subsecretaria de Vigilância à Saúde. Secretaria de Saúde do Distrito Federal**. Ano 17, nº 50, 2022
- SHARMA, Vikrant et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian journal of microbiology**, v. 66, n. 2, p. 87-98, 2020.
- TAVAKOLI, Norma P. et al. Identification of dengue virus in respiratory specimens from a patient who had recently traveled from a region where dengue virus infection is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1523-1527, 2007.
- TRAVASSOS, L. R. et al. Dengue: review of the literature. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 4, p. 537-560, 2010
- VIANA, Lia Raquel de Carvalho et al. Arboviroses reemergentes: perfil clínico-epidemiológico de idosos hospitalizados. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, 2018.
- VIANA, Vânia Angélica Feitosa. Perfil soropidemiológico e avaliação das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e IL-10 em indivíduos com suspeita clínica de Chikungunya durante a epidemia de 2017 no Ceará. 2020.
- XAVIER, Analúcia R. et al. Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, p. 252-257, 2017.
- ZANOTTO, Paolo Marinho de Andrade; LEITE, Luciana Cezar de Cerqueira. The challenges imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1964, 2018.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization Dengue and severe dengue (2021)**. World Health Organization, 2021.

## ANEXO

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Infecções virais emergentes e cobertura vacinal no Distrito Federal

**Pesquisador:** Wildo Navegantes de Araujo

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 39866620.4.0000.5558

**Instituição Proponente:** Núcleo de Medicina Tropical

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.495.474

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de reapresentação do projeto intitulado "Infecções virais emergentes e cobertura vacinal no Distrito Federal", com respostas às pendências avaliadas no parecer anterior, datado de 18/12/2020.

Este é um estudo transversal, com expectativa de ser realizado com 7.464 indivíduos do Distrito Federal e composto por dois conjuntos de estudos: (a) estudo de acurácia de teste diagnóstico para detecção de infecção pelo SARS-CoV-2 e (b) estudos de prevalência para aferição da proporção de pessoas que apresentam anticorpos contra SARS-CoV-2, dengue, chikungunya, zika vírus, e avaliação de cobertura vacinal para sarampo, caxumba e rubéola em quatro Regiões Administrativas do DF que apresentam perfis diferentes de vulnerabilidade social (Brasília, Águas Claras, Ceilândia e Cidade Estrutural).

O estudo de acurácia será realizado com cerca de 864 indivíduos, através de visitas domiciliares. O estudo de inquérito soroepidemiológico será realizado com 6.600 indivíduos através de visitas domiciliares.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo principal deste estudo é estimar a prevalência da infecção por SARS-CoV-2, dengue, chikungunya e zika, assim como da cobertura vacinal para sarampo, caxumba e rubéola nos residentes de quatro Regiões Administrativas do Distrito Federal, e avaliar a acurácia de testes comerciais para detecção de anticorpos para SARS-CoV-2.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.495.474

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos atribuídos à participação no estudo citados pelo pesquisador principal são o potencial desconforto decorrente dos processos de coleta de sangue venoso, punção digital e de swab nasofaríngeo, os quais serão minimizados ao serem coletados por profissionais de saúde capacitados e habilitados; e o potencial risco de perda de confidencialidade dos dados pessoais dos participantes e as medidas que serão tomadas para minimizá-lo.

Em relação aos benefícios, cita-se que o estudo terá impacto na saúde coletiva, ao permitir a investigação da acurácia de testes diagnósticos e da compreensão da magnitude e distribuição da infecção por SARS-CoV-2, arboviroses e da cobertura vacinal de sarampo, caxumba e rubéola, o que possibilitará o planejamento da rede de serviços necessárias para o atendimento de casos, ou não, destas doenças nos próximos períodos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No parecer anterior foram apresentadas pendências relacionadas ao protocolo de armazenamento das amostras biológicas, se em biobanco ou em biorepositório, as quais foram esclarecidas pelo pesquisador.

Pendências:

1. Informar qual biobanco será utilizado pelos pesquisadores
2. Caso não haja biobanco disponível, esse colegiado recomenda que o termo "biobanco" seja substituído por biorrepositório no escopo de todos documentos do projeto.

O pesquisador esclareceu que o material biológico dos participantes será armazenado em biorrepositório, estando o consentimento (assentimento) dos participantes em relação ao uso de seu material biológico atrelado exclusivamente a este estudo.

As alterações para o termo biorrepositório e a informação de que as amostras serão utilizadas especificamente para esse estudo foram realizadas nos respectivos arquivos do projeto, incluindo os Termos de Consentimento e de Assentimento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados e estão adequadamente redigidos para a avaliação deste CEP

**Recomendações:**

Mantenho a recomendação de atualização dos Currículos Lattes de todos os membros da equipe do estudo, para estar em conformidade com as orientações do Sistema CEP-CONEP.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.495.474

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Como as pendências foram resolvidas, o parecer do colegiado foi pela aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após apreciação na reunião dia 08/01/2021 do colegiado CEP/FM o projeto foi aprovado. OBS: De acordo com a Resolução CNS 466/12, nos inciso II.19 e II.20, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parciais e final do seu projeto de pesquisa. Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1638920.pdf	21/12/2020 17:28:35		Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoCompleto3.docx	21/12/2020 17:28:04	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompleto3.pdf	21/12/2020 17:27:49	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4_realce.docx	21/12/2020 17:15:07	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_resposta_pendencias3.pdf	21/12/2020 17:13:47	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.pdf	21/12/2020 17:12:39	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.docx	21/12/2020 17:12:01	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Orçamento	planilha_orcamento.pdf	07/12/2020 18:32:55	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Orçamento	planilha_orcamento.docx	07/12/2020 18:32:47	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	parecer_projeto_hub.pdf	07/12/2020 18:31:52	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Declaração de concordância	Termo_concordancia.pdf	07/12/2020 18:31:10	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br



UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 4.495.474

Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/12/2020 18:23:52	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaEncaminhamento_Equipe.pdf	03/10/2020 21:43:30	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	Curriculos_EquipeDePesquisa.pdf	03/10/2020 21:41:56	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	InstrumentosColeta.pdf	03/10/2020 21:11:47	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	DeclaracaoResponsabilidade.pdf	03/10/2020 21:09:15	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Outros	CLattes_Wildo.pdf	03/10/2020 21:07:57	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	CartaEncaminhamentoFM.pdf	03/10/2020 17:27:43	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	03/10/2020 17:23:57	Wildo Navegantes de Araujo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 11 de Janeiro de 2021

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Antônio Carlos Rodrigues da Cunha**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br