



UFRR

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CÁSSIO ALENCAR MEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA, MAYARO
E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA
DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021**

**BOA VISTA, RR
2022**

CÁSSIO ALENCAR MEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA, MAYARO E OROPOUCHE
EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NSI NO ESTADO DE
RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima (UFRR), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Granja.

**BOA VISTA, RR
2022**

CÁSSIO ALENCAR MEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA MAYARO E OROPOUCHE
EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NS1 NO ESTADO DE
RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima (UFRR), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja.

Prof.^a. Dr.^a Fabiana Granja
Orientadora/PROCISA – UFRR

Dr.^a Priscila Alencar Azarak
Membro Titular Externo/UVCZ - SMSA

Prof.^a. Dr.^a Bruna Kempfer Bassoli
Membro Titular Interno/PROCISA - UFRR

**BOA VISTA, RR
2022**

À minha amada mãe,
Maria do Socorro de Alencar Meira,
que mesmo em descanso eterno
é meu anjo da guarda protetor,
te amo minha eterna rainha, saudades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido todas oportunidades e vitórias em minha vida, pois ele colocou em meu caminho pessoas que direta ou indiretamente tornaram este sonho em realidade. A todos vocês meu mais profundo agradecimento.

Agradeço a minha amada esposa Mirlene Meira por estar ao meu lado compartilhando todos os momentos da minha vida, te amo.

Aos meus amados filhos Davi e Gustavo que por inúmeras vezes souberam lhe dar com minha ausência, vocês são a razão da minha vida.

Ao meu pai e irmãos que sempre acreditaram e me apoiaram em todas minhas decisões.

A Priscila Lamounier minha comadre, amiga, irmã, conselheira e confidente, que esteve comigo em todos os momentos. Te amo.

A minha orientadora, Dra. Fabiana Granja que aceitou este desafio e compartilhou todo o seu conhecimento. O seu amor pelo que faz encanta e a torna fonte de inspiração a todos que a cercam.

Aos meus amigos do setor da imunologia e parasitologia do LACEN-RR.

A Cátia Menezes que me incentivou a entrar nesta jornada, com ideias, apoio e palavras de força.

Ao Dr. Marconi Aragão por permitir que o LACEN-RR participasse desta pesquisa como instituição coparticipante.

Ao Dr. José Modena que abriu as portas e me acolheu no LEVE-IB-UNICAMP.

A Júlia Forato por todo suporte e apoio na parte experimental desta pesquisa.

Aos Srs. Cláudio Galvão (Secretário da Saúde do Município de Boa Vista – RR) e Alan Freitas (Superintendente de Atenção Especializada) que fomentaram este mestrado.

A todos meus colegas de turma que estiveram comigo nesses anos, em especial ao Gustavo Melo e Natana Ferreira.

RESUMO

As arboviroses são doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos e produzem viremia em hospedeiros vertebrados susceptíveis que, por sua vez, são capazes de transmitir para outros indivíduos no momento do repasto sanguíneo. As arboviroses são zoonoses mantidas em ambientes silvestres onde o clima tropical e fatores antrópicos como o desmatamento, construções de barragens, garimpos, minerações e abertura de estradas proporcionam ambiente favorável a sua manutenção e surtos na região Norte. O estado de Roraima possui fronteiras com os estados do Amazonas e Pará, e países como a Guiana e Venezuela, este último passando por atual crise humanitária e migratória com histórico de reemergência do arbovírus Mayaro. Estudos regulares são focados na circulação da dengue e febre amarela, contudo a escassez de dados referente a outras arboviroses associados aos números de notificações para dengue e que obtiveram resultados negativos pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR) para pesquisa para detecção do antígeno NS1 e anticorpo IgM pelo método ELISA destacam a importância deste estudo quanto ampliação da pesquisa para outros vírus, uma vez que o diagnóstico clínico se torna difícil por terem sintomas semelhantes aos da dengue. O estudo tem o objetivo de determinar os arbovírus circulantes no estado de Roraima (CHIKV, OROV, MAYV, ZIKV e DENV 1-4) a partir das amostras de pacientes com diagnósticos negativos para dengue através da técnica de NS1 realizados pelo LACEN-RR, no período de 2020 e 2021, com a utilização do RT-PCR em tempo real. A parte experimental foi realizado no Laboratório de Vírus Emergentes – LEVE do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (LEVE-IB-UNICAMP) em parceria com Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima (LaBMol) e teve a LACEN-RR como instituição coparticipante, onde foram analisadas 132 amostras dos anos propostos com resultados não reagentes para NS1 e que apresentaram síndrome febril e outros sintomas característicos do agravo no período agudo da doença (até o 5º dia do início dos sintomas) provenientes do LACEN-RR. Conhecendo a maior sensibilidade da técnica de qPCR, as amostras passaram por processo de extração do RNA viral e quantificação do produto extraído, e posteriormente submetidas a transcrição reversa para obtenção do cDNA. Foi realizada primeiramente o qPCR para CHIKV, seguido de OROV, MAYV, ZIKV e DENV1, 2, 3, 4. Obteve-se 3 resultados positivos para MAY, 8 para DENV, sendo 3 para DENV1 e 5 para DENV2. Não foi encontrado amostras positivas para CHIK, OROV e ZIKV. Torna-se de suma importância conhecer as arboviroses circulantes no estado de Roraima, com auxílio do diagnóstico diferencial laboratorial utilizando técnicas mais sensíveis, possibilitando que os órgãos de Vigilância em Saúde possam traçar estratégias e ações de controle das arboviroses emergentes e reemergentes no estado de Roraima.

Palavras-chave: Arbovírus. Vírus emergentes. RT-qPCR. Dengue. Mayaro.

ABSTRACT

Arboviruses are diseases caused by viruses transmitted by hematophagous arthropods and produce viremia in susceptible vertebrate hosts that, in turn, are capable of transmitting to other individuals at the time of a blood meal. Arboviruses are zoonoses maintained in wild environments where the tropical climate and anthropic factors such as deforestation, construction of dams, mining, mining and opening of roads provide a favorable environment for their maintenance and outbreaks in the North region. The state of Roraima has borders with the states of Amazonas and Pará, and countries such as Guyana and Venezuela, the latter experiencing a current humanitarian and migratory crisis with a history of reemergence of the Mayaro arbovirus. Regular studies are focused on the circulation of dengue and yellow fever, however the scarcity of data regarding other arboviruses associated with the numbers of notifications for dengue and which obtained negative results by the Central Laboratory of Public Health of the State of Roraima (LACEN-RR) for research for detection of NS1 antigen and IgM antibody by the ELISA method highlight the importance of this study in terms of expansion of the research for other viruses, since the clinical diagnosis becomes difficult because they have symptoms similar to those of dengue. The study aims to determine the arboviruses circulating in the state of Roraima (CHIKV, OROV, MAYV, ZIKV and DENV 1-4) from samples of patients with negative diagnoses for dengue through the NS1 technique performed by LACEN-RR, in the period 2020 and 2021, using RT-PCR in real time. The experimental part was carried out at the Laboratory of Emergent Viruses – LEVE of the Institute of Biology of the State University of Campinas (LEVE-IB-UNICAMP) in partnership with the Laboratory of Molecular Biology of the Federal University of Roraima (LaBMol) and had LACEN-RR as co-participating institution, where 132 samples were analyzed from the proposed years with non-reactive results for NS1 and that presented febrile syndrome and other symptoms characteristic of the disease in the acute period of the disease (up to the 5th day of the onset of symptoms) from the LACEN-RR. Knowing the greater sensitivity of the qPCR technique, the samples underwent a process of viral RNA extraction and quantification of the extracted product, and subsequently submitted to reverse transcription to obtain the cDNA. First, qPCR was performed for CHIKV, followed by OROV, MAYV, ZIKV and DENV1, 2, 3, 4. There were 3 positive results for MAY, 8 for DENV, 3 for DENV1 and 5 for DENV2. No positive samples were found for CHIK, OROV and ZIKV. It is extremely important to know the circulating arboviruses in the state of Roraima, with the help of differential laboratory diagnosis using more sensitive techniques, allowing the Health Surveillance bodies to outline strategies and actions to control emerging and reemerging arboviruses in the state of Roraima

Key-words: Arbovirus. Emerging viruses. RT-qPCR. Dengue. Mayaro.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dispersão das arboviroses pelo mundo.....	20
Figura 2 - Casos de Dengue no contexto da COVID-19	21
Figura 3 - Organização genômica do DENV.....	22
Figura 4 - Diagrama de casos notificados para dengue em Roraima no ano de 2020.....	23
Figura 5 - Diagrama de casos notificados para dengue em Roraima no ano de 2021.....	23
Figura 6 - Organização genômica do CHIKV e proteínas virais.....	24
Figura 7 - Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya, por semana epidemiológica, entre os anos de 2019 a 2022 (dados de 2022 até a SE 50).....	25
Figura 8 - Organização genômica do MAYV	26
Figura 9 - estrutura do OROV e genoma.....	27
Figura 10 - Estrutura do ZIKV e organização do genoma	29
Figura 11 - Curva epidêmica dos casos prováveis de zika, por semana epidemiológica, entre os anos de 2019 a 2022 (dados de 2022 até a SE 48)	30
Figura 12 - Distribuição de casos prováveis de zika em gestantes, por município, da SE 1 a 48 do ano de 2022.....	30
Figura 13 -Fluxograma de seleção das fichas de notificação e amostras	35
Figura 14 - Fluxograma da pesquisa para análise das amostras	39
Figura 15 - Ciclo de ampliação QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)	43
Figura 16 - Curvas de amplificação das amostras 46 e 68 para MAYV por RT-PCR em tempo real	50
Figura 17 - Curva de amplificação da amostra 97 para MAYV por RT-PCR em tempo real ..	50
Figura 18 - Curvas de amplificação das amostras positivas para DENV por RT-PCR em tempo real	53
Figura 19 - Curva de amplificação da amostra 02 para DEV1 por RT-PCR em tempo real ...	54
Figura 20 - Curvas de amplificação das amostras 102 e 124 para DEV1 por RT-PCR em tempo real	54
Figura 21 - Curvas de amplificação das amostras 03, 06, 10, 11 e 16 para DEV2 por RT-PCR em tempo real	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Esquema da técnica molecular por RT-PCR.....	32
Quadro 2 - Lista de primers utilizados na pesquisa para detecção das arboviroses	41
Quadro 3 - Protocolo com proporções otimizadas do kit qPCR Bio Probe Mix Separate-Rox (PCRBiosystems, UK).....	42
Quadro 4 - Dados referente às informações disponibilizadas nas fichas de notificações das amostras que compõe a pesquisa	44
Quadro 5 - Quantificação do RNA por Espectrofotometria NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific, EUA).....	45
Quadro 6 - Quantificação do cDNA por Espectrofotometria NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific, EUA).....	47
Quadro 7- Amostras negativas para NS1 e testadas para MAYV por RT- PCR em tempo real	49
Quadro 8 - Dados epidemiológicos dos pacientes positivos para MAYV	51
Quadro 9 - Sintomas apresentados pelos pacientes positivos para MAYV	52
Quadro 10 - Quantidade de amostras NS1 negativas testadas por RT-PCR para DENV com identificação dos sorotipos	53
Quadro 11- Quantitativo de amostras positivas para os sorotipos da DENV 1 – 4 nos anos de 2020 e 2021	55
Quadro 12 - Dados epidemiológicos dos pacientes positivos para DENV	57
Quadro 13 - Sintomas apresentados pelos pacientes positivos para DENV.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proporções de amostras do estudo dos anos 2020 e 2021 (n = 132).....	36
Gráfico 2 - Quantitativo referente ao gênero dos indivíduos neste estudo (n = 132).....	36
Gráfico 3 - Quantitativo e percentual por faixa etária (n = 132)	37
Gráfico 4 - Percentual de amostras clínicas por município de procedência (n = 132).....	37
Gráfico 5 - Quantitativo referente aos sinais/sintomas apresentados pelos indivíduos envolvidos na pesquisa (n=132).....	38
Gráfico 6 - Quantitativo referente a coleta das amostras de acordo com os dias do aparecimento dos primeiros sintomas (n = 132)	38
Gráfico 7 - Dias de sintomas, no momento da coleta, apresentados pelos pacientes positivo para DENV por RT-PCR em tempo real.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LACEN-RR	Laboratório de Saúde Pública do Estado de Roraima
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
DENV	Dengue vírus
MAYV	Mayaro vírus
CHIKV	Chikungunya vírus
ZIKV	Zika vírus
OROV	Oropouche vírus
%	Percentual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
ng	Nanograma
µl	Microlitro
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
LaBMol-UFRR	Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima
LEVE-IB-UNICAMP	Laboratório de Vírus Emergentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas
CEP-UFRR	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
RR	Roraima
UFRR	Universidade Federal de Roraima
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
OMS	Organização Mundial da Saúde
NS1	Proteína não estrutural 1

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	14
2	PROBLEMA.....	16
3	OBJETIVOS.....	17
3.1	OBJETIVO GERAL.....	17
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4	JUSTIFICATIVA.....	18
5	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
5.1	ARBOVIROSES.....	20
5.1.1	Dengue.....	22
5.1.2	Chikungunya.....	24
5.1.3	Mayaro.....	25
5.1.4	Oropouche.....	27
5.1.5	Zika.....	28
5.2	RT-PCR.....	31
6	METODOLOGIA.....	33
6.1	TIPO DE ESTUDO.....	33
6.2	RECORTE TEMPORAL.....	33
6.3	LOCAL DO ESTUDO.....	34
6.4	AMOSTRAGEM E COLETA DE DADOS.....	34
6.5	MÉTODO EXPERIMENTAL.....	39
6.5.1	Extração do RNA.....	40
6.5.2	Quantificação do RNA.....	40
6.5.3	RT-PCR em tempo real (qPCR).....	41
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
7.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
7.1.1	Pesquisa do CHIKV, OROV e ZIKAV por RT-PCR em tempo real.....	48

7.1.2 Pesquisa do MAYV POR RT-PCR em tempo real.....	49
7.1.3 Pesquisa do DENV POR RT-PCR em tempo real.....	53
8 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE A – PRODUTO TÉCNICO	67
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	76
ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA LACEN-RR	83
ANEXO C – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA.....	84
ANEXO D – PROTOCOLO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	86
ANEXO E – PROTOCOLO DE RT-PCR EM TEMPO REAL.....	89

1 APRESENTAÇÃO

As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus (arbovírus) transmitidos na natureza através de artrópodes hematófagos. Produzem viremia nos hospedeiros vertebrados susceptíveis, onde uma vez infectado é capaz de transmitir para outros indivíduos no momento do repasto sanguíneo (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

As arboviroses são zoonoses mantidas em ambientes silvestres principalmente na Amazônia, onde o clima tropical facilita a sua manutenção. Mas com os problemas como: desmatamentos, garimpos e minerações, abertura de estradas e construções de barragem, propiciam o ambiente ideal para a manutenção e nos surtos das arboviroses na região Norte (MENESES, 2013).

O estado de Roraima é o mais setentrional da Federação tendo uma área aproximada de 223.644,527 km² fazendo fronteira com os estados do Amazonas e Pará, e os países Guiana e Venezuela, este último, inclusive vive uma crise humanitária e migratória (IBGE, 2019).

O diagnóstico das Arboviroses é realizado, mediante a notificação compulsória proveniente de todas unidades saúde do Estado, pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), tendo como um dos principais agravos a Dengue, Zika e Chikungunya, onde no ano de 2019 do total de 484 amostras para detecção da Dengue através da captura do antígeno NS1, obtivemos 185 resultados reagentes, 9 indeterminados e 290 negativos (BRASIL, 2020). O método mais comum de diagnósticos destes agravos é através da sorologia (coletada até quinto dia do início dos sintomas) por método de *tratus* (ELISA) para testagem de Dengue NS1 em pacientes que apresentaram síndromes febris no período agudo da doença e outros sintomas relacionados a eles (CRUZ, 2014).

Nesse sentido, estudo preliminar realizado em 2013, mostrou pela técnica de RT-PCR que em 150 amostras negativas para NS1 obteve como resultado 33 amostras positivas para dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEV-4), além de 7 positivas para Mayaro e 13 para Oropouche, revelando a importância do conhecimento da circulação de outros arbovírus no estado de Roraima (MENESES, 2013).

A situação epidemiológica da dengue no país permanece sendo caracterizada pelo número crescente de casos graves e óbitos nos últimos dez anos, além dos novos desafios impostos pela circulação dos vírus das febres de chikungunya, zika, mayaro, ouropouche e outros arbovírus, cujo sintomas são semelhantes com os da dengue (BRASIL, 2016). A circulação desses arbovírus torna difícil o diagnóstico clínico somente pelos sintomas por serem

muito semelhantes, sendo necessário o diagnóstico laboratorial por meio de detecção de anticorpos ou vírus quando coletadas amostras sanguíneas no período oportuno.

O ELISA é a metodologia sorológica mais utilizada no diagnóstico confirmatório das arboviroses no estado de Roraima, fazendo a detecção do antígeno NS1 quando coletado até o quinto dia do início do aparecimento dos sintomas, chikungunya IgM e zika IgM do sexto ao décimo quarto dia dos primeiros sintomas (CRUZ, 2014). A proteína NS1 trata-se de uma glicoproteína não estrutural envolvida no processo de replicação viral, onde no período da fase aguda da doença podem chegar a níveis elevados sendo, portanto, um marcador laboratorial para o diagnóstico da dengue em infecções recentes (LIMA, 2014).

Devido ao crescente número de casos de síndromes febris e não diagnosticados, onde no relatório anual de epidemiologia do ano de 2018 foram notificados 12.224 casos de dengue, chikungunya e zika no ano de 2017, o presente estudo tem como objetivo contribuir com o monitoramento dos arbovírus circulantes no Estado de Roraima e que representam riscos à saúde da população, colaborando com a valiosa informação para uma vigilância epidemiológica eficiente (BRASIL, 2020).

Buscando responder ao objetivo, a pesquisa encontra-se dividido em três eixos principais: (1) Estudos clínicos e epidemiológicos das arboviroses; (2) Estudos moleculares em amostras negativas para dengue NS1 obtidas pelo método de ELISA; (3) Detecção de outras arboviroses por técnicas moleculares.

2 PROBLEMA

Os casos de síndrome febril notificados e que obtiveram resultado negativo para Dengue através da captura de antígeno NS1 por ELISA realizados pelo LACEN-RR, seriam resultados falso negativo para dengue ou positivo para outras arboviroses menos conhecidas ou emergentes?

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os arbovírus circulantes no estado de Roraima (Dengue, Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche), a partir de amostras de pacientes com diagnóstico negativo para dengue através da técnica de captura do antígeno NS1, realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima, no período de 2020 e 2021.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade da técnica de ELISA para a captura do Antígeno NS1 para identificar a dengue, usando como referência a técnica de RT-PCR em tempo real;
- Identificar os sorotipos de dengue nas amostras que apresentarem falso negativo no NS1;
- Analisar nas amostras negativas para dengue em busca da presença dos arbovírus Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche por qPCR;
- Elaborar relatório técnico conclusivo a ser entregue na Secretaria de Estado da Saúde e Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde do estado de Roraima.

4 JUSTIFICATIVA

Os arbovírus são de grande interesse e preocupação para a saúde pública, onde o alto índice de infestação por mosquitos *Culex* e *Aedes aegypti* encontradas em áreas urbanas e rurais corresponde a um fator de risco para a emergência de novos arbovírus na população (FIGUEIREDO, 2007).

A escassez de dados acerca da circulação de outros arbovírus, além da dengue e febre amarela, em amostras humanas, associada aos altos números de notificações para dengue cujos testes laboratoriais específicos, como a detecção do antígeno NS1 e anticorpo IgM, liberados como não reagentes pelo LACEN-RR destaca a importância desta pesquisa, visto que o Estado de Roraima apresenta fatores favoráveis à circulação e manutenção do ciclo dos arbovírus devido às condições climáticas, ambientais e socioeconômicas. Destaca-se também a posição geográfica do Estado, que possui fronteira com o Estado do Amazonas e Pará e ainda com os países Guiana e Venezuela, este último possuindo históricos de reemergência dos arbovírus como Mayaro (MUÑOS; NAVARRO, 2012).

Acosta et al., (2012) aponta que, entre os anos de 1999 e 2011, Roraima foi classificado como Estado hiperendêmico, possuindo os 4 sorotipos da dengue circulantes, aumentando os casos de infecções secundárias e formas grave da doença, tendo um papel importante na introdução e reintrodução no país de novas variantes por meio de suas fronteiras com a Venezuela e Guiana, que têm em circulação da DENV1, 2, 3 e 4.

Roraima, entre os anos de 1981 e 1982, foi o primeiro Estado a registrar epidemia de dengue no Brasil, onde foram identificados os sorotipos da DENV1 e DENV4 provavelmente importadas da Venezuela, com incidência de aproximadamente 11 mil casos em Boa Vista. Após 14 anos houve a reemergência com notificações de casos entre os anos de 1996 e 1998, porém no ano de 1999 foi registrado a segunda epidemia causada pelo sorotipo 2 com concentração de 98,3% dos casos na capital (ACOSTA et al., 2012), desde então a dengue persiste em circulação até o presente momento.

De 2007 a 2009 houve ocorrência da circulação dos 4 sorotipos da dengue no estado (RORAIMA, 2014; CARNEIRO E CARNEIRO, 2011) tendo em 2010 sofrido uma grave epidemia com a reinserção da DENV4 com confirmação de 7.026 casos (NAVECA et al., 2011). Entre 2000 e 2013 foram notificados em Roraima 74.712 casos e 37.799 confirmações (RORAIMA, 2015).

Estudos mostram que entre os anos de 2017 e 2021, nos 15 municípios de Roraima, houve grande discrepância nos números de casos de dengue motivados pela subnotificação de casos suspeitos. O ano de 2019 teve um ápice no registo de casos de dengue, porém nos demais anos houve evidência de subnotificação (Ribeiro et al., 2022).

A chikungunya tem uma grande importância nos históricos de surtos causados por arbovírus em Roraima, onde desde seu aparecimento, em 2014, até setembro de 2018 foram notificados, apenas em Boa Vista, 5.928 casos de CHIKV com confirmação laboratorial de 3.795 (NAVECA, 2019). No ano de 2017 foi registrado a primeira epidemia no estado, quando foram confirmados 3.956 casos de Chikungunya (SESAU, 2018).

Torna-se de suma importância identificar e isolar os agentes etiológicos circulantes no Estado de Roraima, utilizando técnicas moleculares mais sensíveis nas amostras de indivíduos notificados para dengue e que apresentaram sintomas de síndrome febril, dentre outros característicos do agravo, no período agudo da doença e que obtiveram resultados não reagentes através da técnica de ELISA para detecção de NS1.

Desta forma, dados produzidos por essa pesquisa trarão subsídios para o acompanhamento das síndromes febris, onde a Vigilância em Saúde poderá desenvolver mecanismos de monitoramento em tempo oportuno caso haja a entrada de arbovírus emergente no Estado.

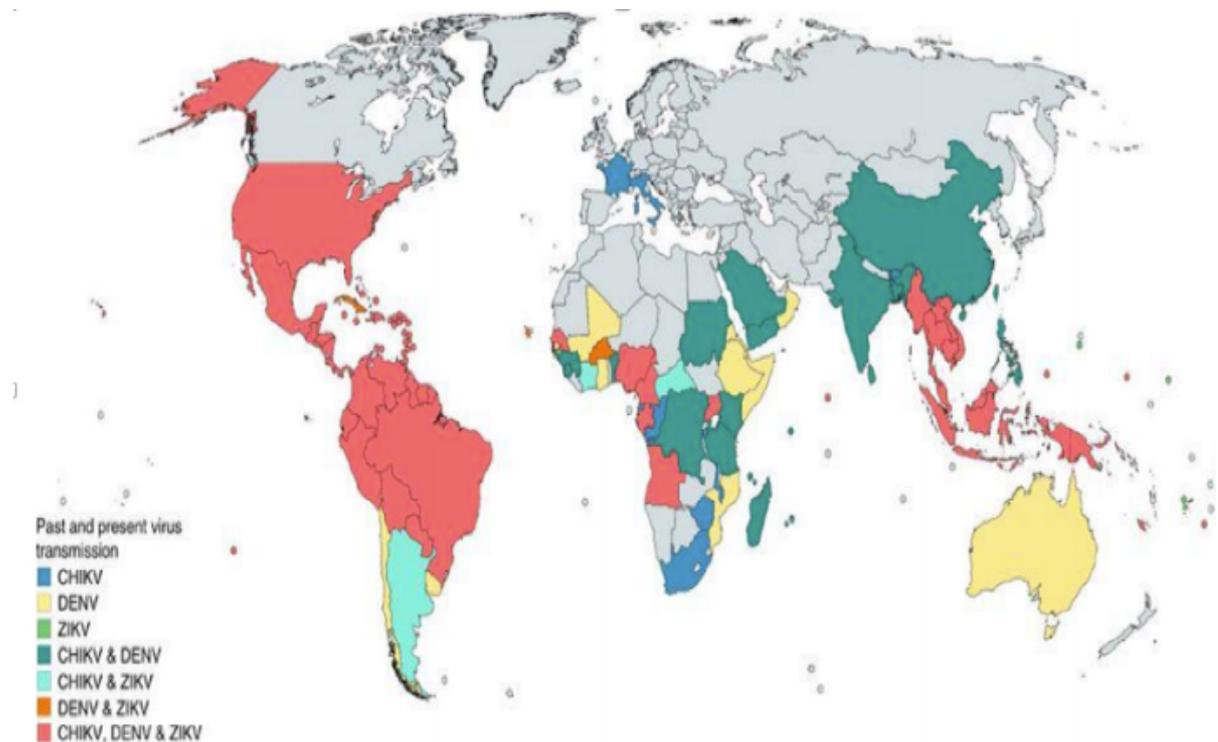
5 REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 ARBOVIROSES

A terminologia arbovírus descende da expressão inglesa *arthropod-borne viruses*, ou seja, vírus transmitidos por artrópodes (FORRATTINI, 1965). Considera-se arbovírus, os vírus transmitidos na natureza por artrópodes hematófagos ou transmissão transovariana e possivelmente por via venérea, multiplicando-se nos tecidos dos artrópodes sendo capaz então de passar para os hospedeiros vertebrados no ato do repasto sanguíneo (OMS, 1985).

Conforme Lopes et al., (2014, p. 01) as arboviroses estão presente nos cinco continentes (África, América, Ásia, Europa e Oceania) com exceção do continente gelado Antártida, onde são catalogadas “mais de 545 espécies de arbovírus, do qual mais de 150 são nocivos aos seres humanos transmitidos por artrópodes (vetores)” (Figura 1).

Figura 1 - Dispersão das arboviroses pelo mundo



Fonte: BADARÓ (2016)

Como se observa, as arboviroses têm origem zoonótica e são mantidas na natureza em ciclos envolvendo um vetor e um animal silvestre. Todavia, devido às ações do homem no meio ambiente, como o crescimento desordenado da população urbana, processos de globalização,

mudanças climáticas e aumento do intercâmbio internacional, estes vetores se tornaram sinantrópicos passando assim a transmitir o patógeno para o vertebrado humano. Tais fatores colaboram com a emergência de arbovírus em várias partes dos países das Américas (LIMA-CAMARA, 2016).

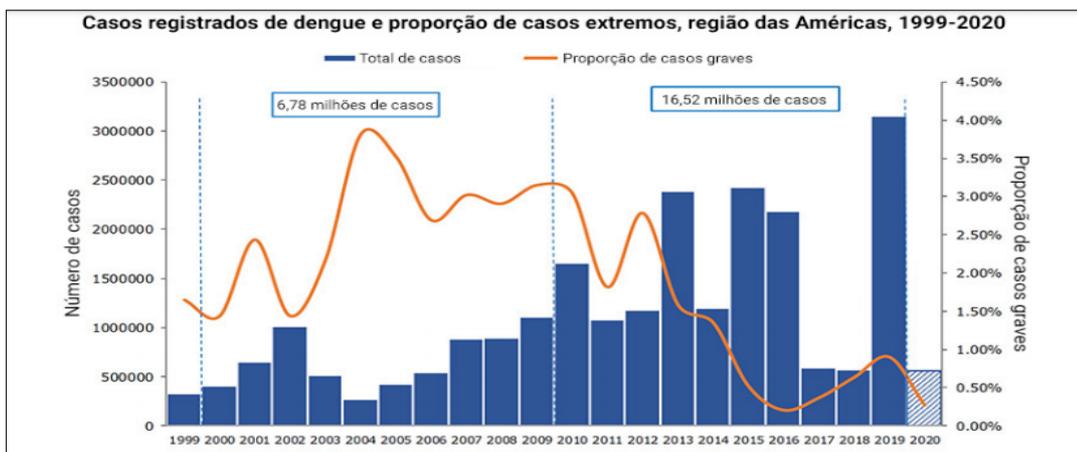
Conforme Teich et al., (2017) a incidência de patologias provocadas por arbovírus tem apresentado um aumento global significativo devido a diversos fatores como:

Dispersão mais rápida e geograficamente mais extensiva dos vírus em razão do crescimento intensivo dos sistemas de transporte globais, adaptação dos vetores à urbanização crescente, incapacidade de conter a população de mosquitos e alterações em fatores ambientais. Além dos fatores que favorecem a dispersão das doenças, o Brasil representa um país com condições ambientais ótimas para a permanência e disseminação de mosquitos vetores, como o *Aedes aegypti* (TEICH; ARINELLI; FAHAM, 2017, p. 01).

Partindo desse princípio, torna-se fundamental o controle e combate de arboviroses, principalmente em regiões tropicais como a América do Sul por isso se faz de extrema importância a detecção a partir de técnicas moleculares dos arbovírus ajudando nos diagnósticos destes agravos (CRUZ, 2014).

No que se refere aos casos de arboviroses no contexto da COVID-19, cabe citar que o SARS-CoV 2 diminuiu a quantidade de identificação de agravos dos arbovírus, pois o governo rejeitou a importância e a gravidade da COVID-19 e se descuidou da dengue, registrando entre 2019 à 2020 a maior notificação da história com mais de 3,14 milhões de casos (WENHAM; LOTTA; PIMENTA, 2020) (Figura 2).

Figura 2 - Casos de Dengue no contexto da COVID-19



Fonte: WENHAM; LOTTA; PIMENTA (2020)

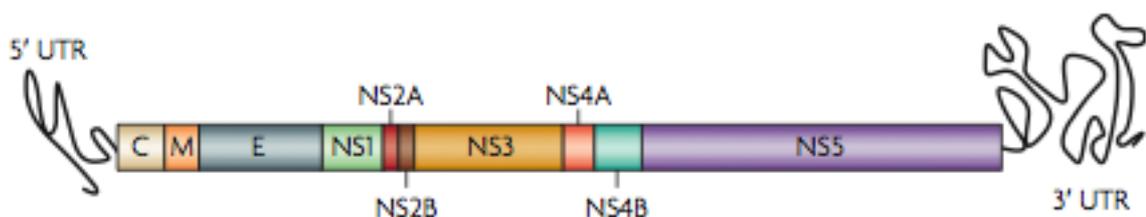
Dessa forma, é importante mencionar a necessidade de aplicar todas as medidas sanitárias para combater a COVID-19, sem deixar de cumprir a rotina de controle vetorial tratando de forma contínua os infectados com arbovírus, para não sobrecarregar o Sistema Nacional de Saúde (SUS) que devido a pandemia trabalhou além de seus limites (WENHAM; LOTTA; PIMENTA, 2020).

5.1.1 Dengue

A dengue, causada pelo DENV é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti*, são pertencentes ao gênero *flavivirus* da família *Flaviviridae* e sendo a mais importante arbovirose do mundo, possui 4 sorotipos antigeneticamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), onde dentro de cada sorotipo existem genótipos que estão relacionadas às formas mais graves ou leves da doença (ACOSTA et al., 2012).

O DENV trata-se de um vírus com capsídeo icosanoédrico e envelopado, conferindo a ele aspecto esférico, medindo aproximadamente 40 – 80nm de diâmetro. Possui uma fita única de RNA capaz de codificar uma longa poliproteína, que ao ser processada, dá origem três proteínas estruturais, C (capsídeo), prM/M (pré-membrana/membrana) e E (envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (ROTHMAN,2004).

Figura 3 - Organização genômica do DENV

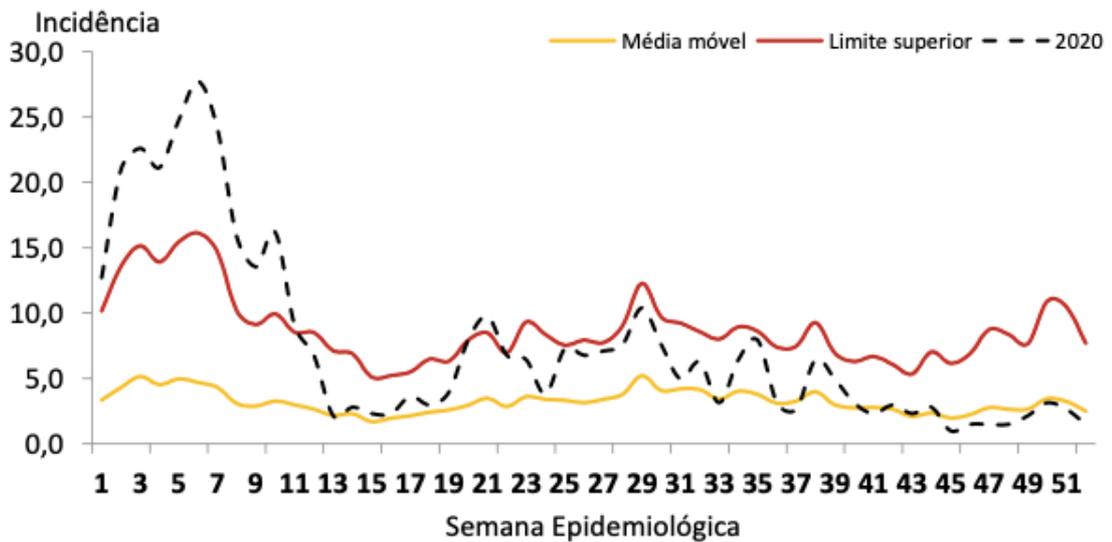


Fonte: Guzmán et al (2010)

Com relação ao surgimento da doença no estado de Roraima, pode-se mencionar que o primeiro caso de dengue registrado no estado foi no ano 1981 enfrentando uma epidemia que durou até agosto de 1982. O Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Roraima teve uma grande colaboração no isolamento e identificação dos sorotipos da dengue, bem como para detectar a introdução de novos sorotipos no Estado de Roraima, sendo o primeiro a ter uma epidemia confirmada no Brasil através de exames laboratoriais (ACOSTA et al., 2012).

Devido ao alto número de casos notificados por suspeita de dengue ocorrido da primeira a décima primeira semana epidemiológica, colocando o início do ano de 2020 em situação de epidemia e posteriormente convertido em endemicidade a partir da décima segunda semana epidemiológica. Tal fato pode ter relação com orientação para somente procurar as unidades de saúde quando apresentado os sintomas da COVID-19 (RORAIMA, 2020).

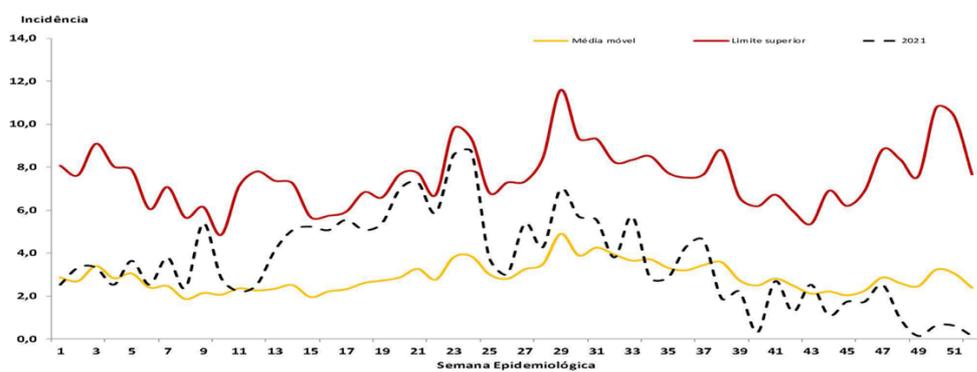
Figura 4 - Diagrama de casos notificados para dengue em Roraima no ano de 2020



Fonte: SINAN/NSIS/DVE/CGVS/SESAU/RR.

Conforme o Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima, em 2021 foram notificados 1.215 casos de dengue com confirmação de 119 e tendo a ocorrência de 1 óbito. Na semana epidemiológica 23 houve um aumento nos registros de notificações para dengue, tendo uma queda a partir da semana 27 e se mantendo até a semana 51, representado no diagrama abaixo.

Figura 5 - Diagrama de casos notificados para dengue em Roraima no ano de 2021



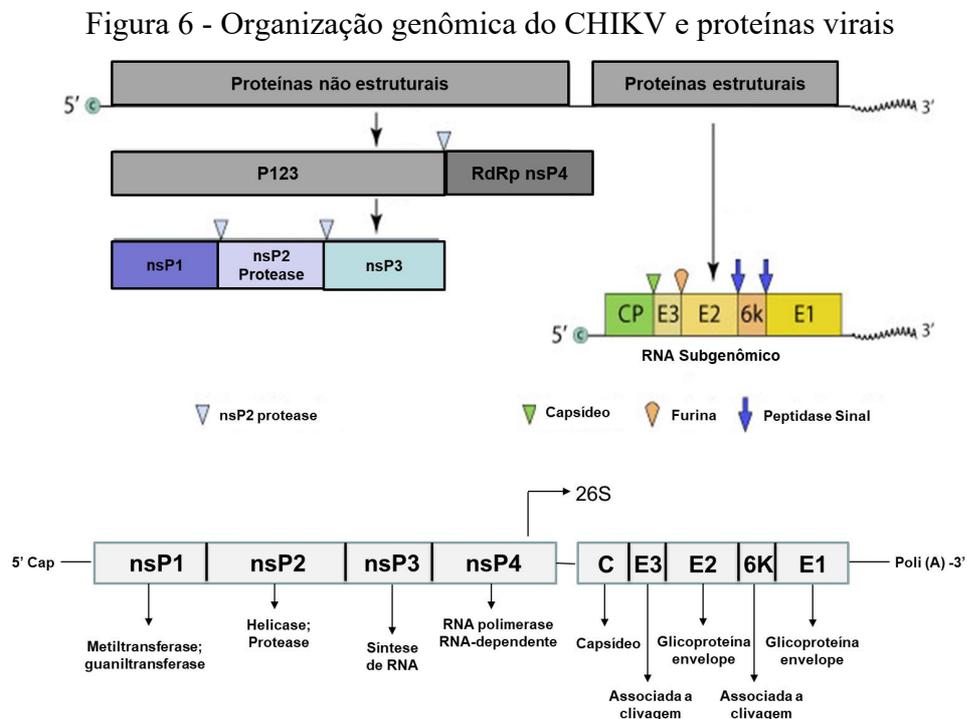
Fonte: SINAN-NET/NCFAD/DVE/CGVS/SESAU-RR

5.1.2 Chikungunya

A Chikungunya (CHIKV) é o vírus causador da arbovirose Febre Chikungunya pertencente à família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*, são transmitidos através da picada do mosquito fêmea *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* quando infectados, pode ocorrer transmissão vertical e ainda por transfusional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O CHIKV mede cerca de 60-70nm de diâmetro possuindo um envelope lipídico, capsídeo com simetria icosaédrica e genoma constituído de uma fita simples de RNA. Em sua superfície encontra-se as glicoproteínas virais E1 e E2, além da glicoproteína E3 presente na periferia. A proteína C e RNA viral são constituintes do seu nucleocapsídeo (KENDALL et al., 2019).

A seu RNA é constituído de aproximadamente 11,8kb onde 2/3 é responsável pela codificação de 4 proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), já na segunda leitura será gerado cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) através da clivagem de um único peptídeo (WEAVER et al., 2012; YAP et al., 2017).



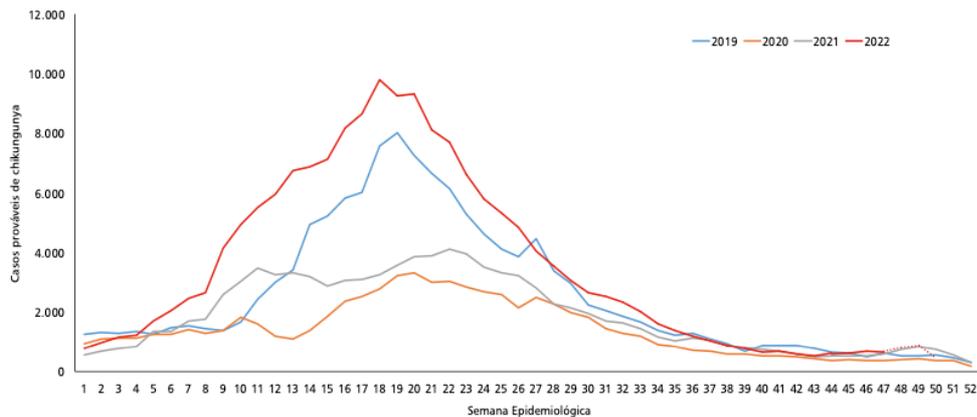
Fonte: Adaptado de VIRALZONE, 1993

Os sintomas apresentados pela febre chikungunya são semelhantes as demais arboviroses de síndrome febril o que torna difícil seu diagnóstico apenas pela avaliação clínica,

porém este agravo possui caráter epidemiológico com elevada taxa de morbidade associada à artralgia persistente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Entre os anos de 2017 a 2020, foram notificados 128.130 casos na região nordeste, destacando-se o ano de 2017 com 82.592 casos (MARQUES,2022). No ano de 2022 (até a 35 semana epidemiológica) houve um aumento de 89,4% dos casos em comparação ao mesmo período de 2021, onde a região nordeste enfrenta atualmente uma epidemia com incidência de 243,7 casos/100 mil habitantes e concentrando 30 óbitos pela doença confirmados dos 60 registrado no País (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2022).

Figura 7 - Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya, por semana epidemiológica, entre os anos de 2019 a 2022 (dados de 2022 até a SE 50)



Fonte: SINAN-NET/NCFAD/DVE/CGVS/SESAU-RR

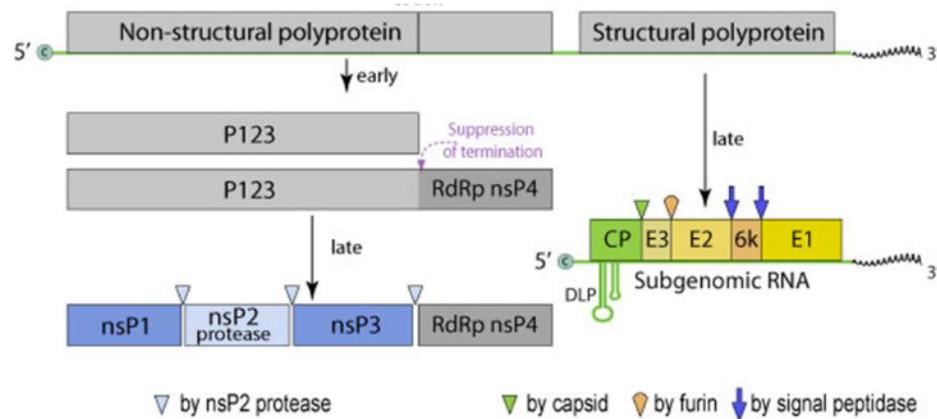
Marinho (2020), relata a existência comum de casos de infecções simultâneas de arbovírus diferentes em áreas que circulam concomitantemente, tendo as mudanças ambientais, migração e imigração como os principais fatores que colaboram com a disseminação desses vírus, apontam a existência de estudos que demonstram a coinfeção dos vírus DENV / CHIKV e DENV, CHIKV e ZIKV durante algumas epidemias ocorridas na América do Sul, trazendo a importância do diagnóstico diferencial para estes agravos.

5.1.3 Mayaro

Vírus da família *Togaviridae* do gênero *Alphavirus*, possuindo genoma de fita simples de RNA com aproximadamente 11kb. O MAYV mede aproximadamente de 60 – 70 nm de diâmetro. Em seu genoma, na extremidade 5', temos 4 proteínas não-estruturais denominada nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). As proteínas estruturais estão presentes na extremidade 3', sendo

elas: proteína C (capsídeo) e as glicoproteínas E1 e E2 (situadas no envoltório da partícula viral) (STRAUSS et al., 1994).

Figura 8 - Organização genômica do MAYV



Fonte: viralzone

Estudos realizados em 2013 em Cuiabá capital do estado de Mato Grosso (MT), objetivava a verificação diversidade de espécies de *Culicidae* e sua frequência de infecções por *flavivirus* e *alfavirus*. Foi realizado a técnica de RT-PCR mostrando a presença do Vírus Mayaro do Genótipo L nos mosquitos, sendo este mesmo genótipo encontrado nas amostras humanas previamente identificados naquela localidade, mostrando que a região, devido sua biodiversidade e ecossistema, é favorável a proliferação de vetores e oferecendo riscos de surtos de arbovírus (SERRA et al., 2016).

Entretanto, segundo Lopes et al., (2014) o vírus Mayaro (MAYV) já estava presente no território nacional em 1954:

O *vírus Mayaro* (MAYV) foi isolado pela primeira vez em 1954 de trabalhadores florestais febris em Trinidad e, posteriormente, de vários indivíduos com febre e dor de cabeça frontal, na área do Rio Guamá, Estado do Pará, Brasil. Posteriormente, foi relatada a presença do vírus no norte da América do Sul e na bacia do rio Amazonas. O MAYV tem sido responsável por surtos de doença febril aguda e síndrome de artralgia na Região Amazônica e no Planalto Central do Brasil, bem como em outros países da América do Sul (Peru, Bolívia e Venezuela) (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014, p. 04).

De acordo com Lopes et al., (2014) os casos de mayaro tem ocorrência o ano todo, e ganham intensidade no período chuvoso, sendo predominante em regiões tropicais e equatoriais como a Manaus, Estado do Amazonas, que apresentou uma transmissão de cerca de 2 milhões de pessoas, no período de 2014 se caracterizando como uma doença de ciclos urbanos tendo o homem como reservatório. Neste mesmo sentido, foi demonstrado posteriormente que o

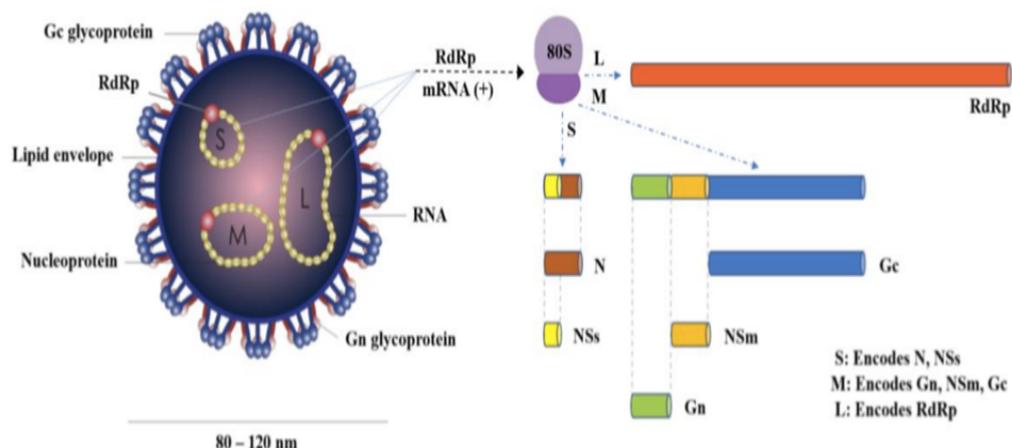
Mosquito *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus* são vetores potenciais o vírus Mayaro através de técnicas de RT-PCR na saliva dos artrópodes após serem detectados experimentalmente. Dados obtidos na pesquisa revelaram que a quantidade de vírus presente na saliva dos mosquitos seria suficiente para garantir a transmissão, apontando que mesmo o *Aedes Aegypti* e *Albopictus* não sendo o principal vetor do vírus Mayaro eles possuíam competência vetorial significativa (PEREIRA et al., 2020).

5.1.4 Oropouche

O vírus Oropouche é pertencente à família *Peribunyaviridae* e pouco estudado na Amazônia, porém causador de surtos na população brasileira e comumente confundida com outras arboviroses devido sua sintomatologia semelhante aos demais. O estudo demonstrou a diversidade genética do vírus e suas implicações no diagnóstico molecular e no desenvolvimento de vacinas (GUTIERREZ et al., 2020).

Trata-se de um vírus de RNA de fita simples de sentido negativo com genoma esférico envolto em lipídeos, com dimensões de 80 a 120 nm de diâmetro, constituído de três segmentos de RNA de fita simples denominado grande (L), médio (M) e pequeno (S), rodeado por um nucleocapsídeo helicoidal e codificando o RNA viral dependente RNA polimerase (RdRp), as glicoproteínas de superfície viral (Gn e Gc) e a proteína do nucleocapsídeo (N), respectivamente. Mais duas proteínas, as NSm não estruturais e NSs, também são codificadas pelo genoma viral, o primeiro pelo segmento M e o último pelo segmento S (ELLIOTT; BLAKQORI, 2011) (figura 6).

Figura 9 - estrutura do OROV e genoma



Conforme Melo et al., (2020) o vírus Oropouche foi identificado e isolado no Brasil em 1960, entretanto, a doença também tem presença em outros países da América Latina como cita os autores:

No Brasil o vírus foi primeiramente isolado em 1960 no sangue de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) durante a construção da rodovia Belém-Brasília, no ano seguinte o vírus gerou uma grande epidemia de febre de Oropouche em Belém com cerca de 11.000 casos estimados e a partir da década de 80 o vírus se proliferou por outras áreas urbanas no norte do Brasil como: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins, e em 1989 foi confirmado que vírus também se proliferava em outros países da América Latina (Trindade e Tobago, Panamá e Peru) (MELO et al., 2020, p. 02).

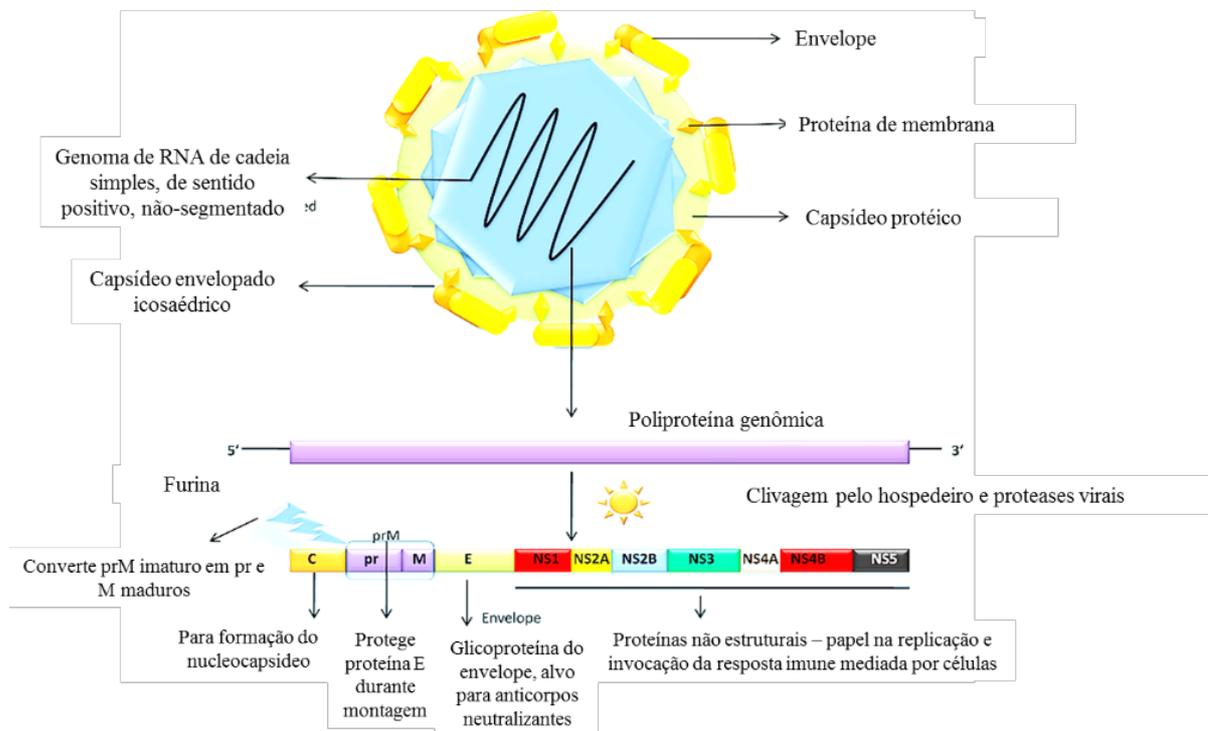
Causador da febre Oropouche, o vírus Oropouche é um arbovírus que ocasionou várias epidemias no Brasil e em outros Países da América Latina entre os anos de 1960 – 2009. Estudos demonstram que o Genótipo I foi o responsável pela emergência de todos os outros genótipos e dispersão do OROV (VASCONCELOS et al., 2011).

No Brasil já foram identificados quatro genótipos do OROV, três (I, II, III) no ano de 2.000 e o IV dez anos depois, onde o seu surgimento e reemergência causaram mais de 30 epidemias no Brasil, Peru, Panamá e Trinidad e Tobago, sendo que dentre os 200 arbovírus diferentes isolados no Brasil o vírus Oropouche é o segundo mais frequente ficando apenas atrás da dengue tendo perspectiva de continuidade de ocorrência desta arbovirose uma vez que há diversos fatores favoráveis a sua propagação e manutenção (SAKKAS et al., 2018).

5.1.5 Zika

Pertencentes da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*, o ZIKV apresenta-se como um vírion envelopado, icosaédrico com diâmetro aproximado de 40 – 50nm (CHANG et al., 2016). Seu genoma de fita simples de RNA, com 11kb, segue a organização padrão dos demais gênero (KUNO E CHANG, 2007). O seu RNA genômico é traduzido gerando uma poliproteína que quando clivada dará origem a 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) e 3 estruturais (E, prM e C) (White et al., 2016).

Figura 10 - Estrutura do ZIKV e organização do genoma



Fonte: SINGH et al., 2016

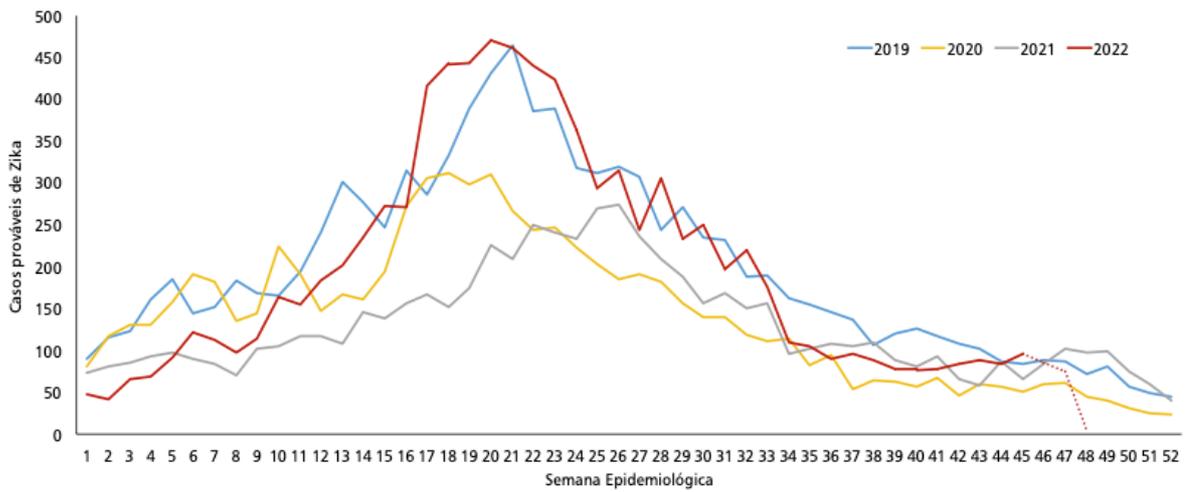
Quando infectados, o mosquito fêmea do *Aedes aegypti* transmite a viremia no momento da picada, sendo que apresentam outras formas de transmissibilidade como: sexual, pós-transfusional e transplacentária (BRASIL, 2019).

Estudos revelam que a ZIKV tenha chegado ao Brasil em 2014 durante a realização do campeonato mundial de canoagem, pois uma variante similar da que circulavam no Brasil foi isolada de um paciente proveniente da Polinésia Francesa. O ponto inicial da introdução deste arbovírus no país foi na região nordeste, levando a uma rápida disseminação por toda América do Sul e Central. Há outras versões que levam a acreditar entrada do vírus no país aconteceu entre outubro de 2013 e março de 2014 ou até mesmo em abril de 2013 (CARVALHO, 2019).

Secretaria de Vigilância em Saúde (2022), através do boletim epidemiológico nº 47 do ano de 2022, aponta que até a semana epidemiológica 48 ocorreram 9.204 casos prováveis de ZIKV no Brasil tendo a região nordeste com o maior número de casos, seguido do norte e centro-Oeste. O ano de 2022 apresentou redução de 8,7% no número de casos em relação a 2019 e um aumento de 42% em relação ao ano de 2021.

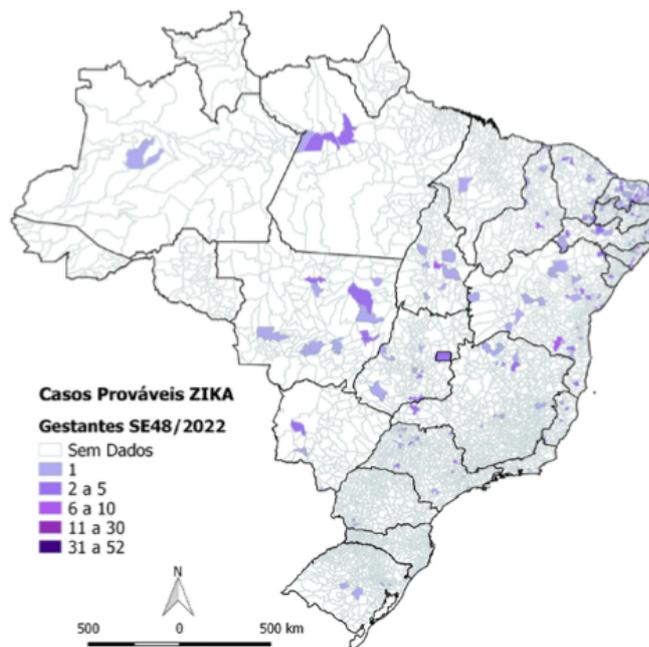
Ainda conforme o boletim, até a semana 48 foram registrados 591 casos prováveis de ZIKV em gestantes, onde 68,9% dos casos se concentraram nos estados do Rio Grande do Norte, Bahia, Paraíba, Alagoas e Pernambuco.

Figura 11 - Curva epidêmica dos casos prováveis de zika, por semana epidemiológica, entre os anos de 2019 a 2022 (dados de 2022 até a SE 48)



Fonte: SINAN NET

Figura 12 - Distribuição de casos prováveis de zika em gestantes, por município, da SE 1 a 48 do ano de 2022



Fonte: SINAN NET

Em Roraima, os primeiros casos de ZIKV foram registrados em 2015, deste ano até 2019 foram confirmados 1.555 casos dos 1.577 notificados. No ano de 2020, todos os 74 casos suspeitos foram confirmados, sendo 48 confirmações laboratoriais e 26 por critérios clínico-epidemiológico (RORAIMA,2020).

No Ano de 2021, se comparado ao ano de 2020, tivemos um aumento de 62% nos casos notificados e 88,46% nas confirmações. Em 2021 houve um aumento de 50% das notificações em gestantes em relação ao ano de 2020, porém sem confirmação laboratorial (RORAIMA, 2021).

A doença do zika vírus é clinicamente caracterizada por quadro febril aguda e com sintomas semelhantes das demais arbovirose, porém podendo causar complicações como microcefalia, malformação fetal do sistema nervoso central, síndrome de Guillain-Barré e demais síndromes neurológicas (CAVALCANTE et al., 2022).

5.2 RT-PCR

A técnica molecular por RT-PCR (*Reverse Transcriptase Chain Reaction*) é o exame considerado padrão ouro para a identificação dos arbovírus, o teste tem por objetivo detectar o RNA do vírus através da amplificação do ácido nucleico pela reação em cadeia da polimerase (VIERIA, 2011). Atualmente o teste tem sido aplicado para identificação do Coronavírus e confirmação da COVID-19, é o exame que vem sendo utilizado nas unidades hospitalares e ambulatoriais da rede pública (ANDRADE, 2020).

A Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) se tornou o método mais indicado devido à alta especificidade e sensibilidade em relação a outras metodologias. A técnica molecular por RT-PCR permite a análise de amostras de diversas naturezas e tem sido amplamente empregada em pesquisas, estudos e diagnósticos na área da virologia (BORGHETTI et al., 2019).

Conforme o Instituto Fiocruz (2008, p. 01) “o diagnóstico da dengue pela técnica de PCR permite a identificação do vírus em apenas 24 horas – procedimento que demoraria de duas a três semanas se realizado pelo método clássico de isolamento viral”.

Devido à emergência e reemergência dos arbovírus em todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, juntamente com as semelhanças de seus sinais e sintomas que tornam um desafio a identificação e diferenciação, faz-se necessário o diagnóstico laboratorial com o desenvolvimento de técnicas cada vez mais eficazes e seguras (tabela 1)

Quadro 1 - Esquema da técnica molecular por RT-PCR

O QUE É?	Busca detectar o RNA do vírus através da amplificação do ácido nucleico pela reação em cadeia da polimerase. Possuem maior sensibilidade e especificidade em relação às técnicas sorológicas.
QUANDO É FEITO?	Quando o indivíduo possui grande quantidade do vírus, especialmente na 1 semana.
ONDE É FEITO?	Diagnóstico realizado pelo LACEN-RR após a notificação, coleta e envio das amostras pelas Unidades básicas de saúde do estado de Roraima.
PRINCIPAIS LIMITAÇÕES:	Só é possível a realização do RT-PCR na fase aguda da doença.

Fonte: Elaborado a partir de ANDRADE (2020).

Além do diagnóstico da Dengue, Zika e Chikungunya, faz-se necessário a pesquisa de outras arboviroses menos conhecidas e que podem reemergir. A disponibilidade de testes moleculares de detecção de Mayaro e Oropouche, tem grande importância e traz imensa contribuição para o diagnóstico diferencial das arbovirose (NAVECA et al., 2017).

6 METODOLOGIA

6.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo tem natureza experimental de aspectos epidemiológicos, apoiado em bases documentais onde foi aplicado o modelo de estudo transversal em seu desenvolvimento. Foram utilizados como recursos pesquisas em literaturas, testes moleculares e informações dos pacientes pertinentes à pesquisa constantes nas fichas de notificações que acompanham as amostras no momento do seu recebimento pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), dos anos de 2020 e 2021.

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Roraima (CEP-UFRR) e seguiu as diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme as Resoluções 466/2012 e 510/2016 do Conselho Nacional de Saúde.

Após a anuência da instituição coparticipante (LACEN-RR) e aprovação do CEP-UFRR, que se deu através do parecer favorável sob nº 5.173.182 (CAAE: 52738521.9.0000.5302), deu-se o início da pesquisa. Foi solicitada e concedida a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por se tratar de estudo que utilizou amostras já coletadas e que mantém o anonimato absoluto dos participantes que tiveram suas amostras utilizadas no experimento, além da dificuldade em realizar a busca ativa dos mesmo uma vez que já foram atendidos em diversas unidades de saúde do Estado de Roraima.

Por fim, foram utilizados dados apenas de interesse e importância para o estudo do agente viral e epidemiológico, onde as informações dos dados encontram-se presentes nas fichas de notificação e que integram o Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN).

6.2 RECORTE TEMPORAL

O recorte temporal especifica o ano de 2020 e 2021, utilizando os dados dispostos nas fichas de notificações, arquivadas no LACEN-RR, dos pacientes que tiveram atendimento nas unidades de saúde da rede básica e especializada do estado de Roraima e que tiveram suspeita de infecções por arboviroses através de avaliação clínica dos sinais e sintomas característicos

da doença. As fichas foram analisadas individualmente onde, obrigatoriamente, deveriam conter febre e exantema por serem sinais/sintomas característicos do agravo.

Após a seleção das fichas de notificações foi realizado a triagem das amostras que continham volumes suficiente para a realização de todas as etapas do experimento, totalizando 132 amostras aptas para o estudo. Importante ressaltar que apesar do LACEN-RR não ser cadastrado como biobanco o mesmo possui função precípua de coleta, análise e armazenamento de amostras para fins de vigilância epidemiológica, portanto, autorizada a fornecer as amostras para realizações de pesquisas conforme definido pela Res. CNS 441/2011 e Portaria MS 2.201/2011.

6.3 LOCAL DO ESTUDO

A parte experimental foi desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Vírus Emergentes – LEVE do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (LEVE-IB-UNICAMP) em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima (LaBMol-UFRR), tendo ainda como instituição coparticipante o Laboratório de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), seguindo as etapas e fluxograma pré-estabelecidos, onde foram realizadas todas as etapas de testagem moleculares das amostras deste estudo.

6.4 AMOSTRAGEM E COLETA DE DADOS

Foram utilizadas para o estudo amostras (n= 132) de pacientes selecionadas entre o período de 2020 e 2021, provenientes de todas as unidades de saúde do estado de Roraima e que obtiveram resultados “não reagente” para detecção do antígeno NS1 realizadas pelo LACEN-RR. As amostras biológicas selecionadas, continham volume de soro suficiente para a realização de todas as técnicas deste projeto e encontravam-se armazenadas no LaBmol (biorrepositório) em freezer -70°C, até serem encaminhadas para processamento no LEVE-IB-UNICAMP, respeitando todos os protocolos de transporte e envio de amostras.

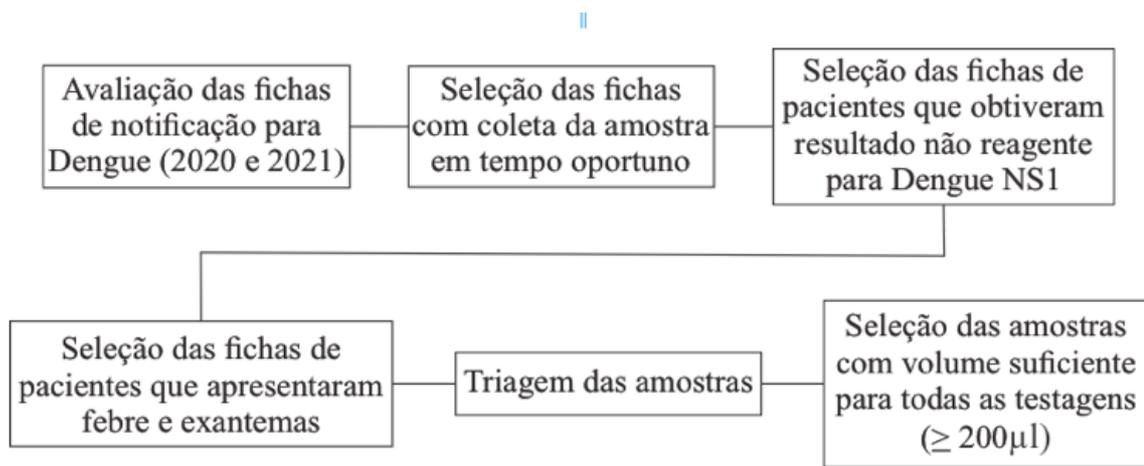
As amostras selecionadas são de pacientes com diagnóstico presuntivo de dengue que encontravam na fase aguda da doença (coletados do primeiro ao quinto dia do início dos sintomas) e que necessariamente apresentaram, além da febre e exantema, outros sintomas típicos da dengue como: calafrio, mialgia, cefaleia, artralgia, dor retrorbital, diarreia e vômito,

os quais foram obtidos através da verificação das fichas de notificação compulsória que acompanham as amostras na entrada no LACEN-RR. Foram excluídos deste estudo as amostras com volume inferior a 200 μ L e/ou com notificações e testagens realizadas para outras arboviroses além da Dengue NS1.

Através da análise das fichas de notificações das amostras selecionadas neste estudo foi possível realizar o levantamento e análise de dados importantes para a pesquisa, como também, de importância epidemiológica sem prejuízo ao anonimato dos integrantes envolvidos na pesquisa.

Para melhor compreensão, segue o fluxograma das etapas de seleção das notificações e amostra (figura 13).

Figura 13 -Fluxograma de seleção das fichas de notificação e amostras



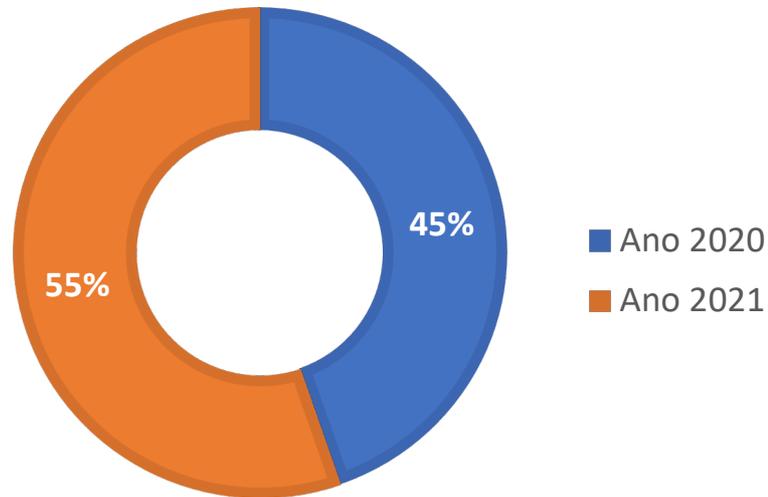
As amostras que compõe este estudo foram selecionadas, primeiramente, através da avaliação de 1.064 fichas de notificações recebidas pelo LACEN-RR nos anos de 2020 e 2021.

Próxima etapa consistiu na seleção das fichas de acordo com os dias de sintomas em relação ao dia coletado, onde deveriam estar entre o dia 0 e 5 (período agudo da doença), restando aptas para a próxima fase 123 fichas referente ao ano de 2020 e 139 do ano de 2021.

As 262 notificações passaram para a fase de seleção de acordo com os critérios clínicos e que apresentaram febre e exantema como sintomas. Nesta etapa restaram 76 fichas do ano de 2020 e 96 de 2021.

A última fase da seleção compreendeu na triagem das amostras que continham o mínimo de 200 μ l de volume, sendo o necessário para realização de todas etapas de testagem molecular. Ao final, tivemos 59 amostras do ano de 2020 e 73 referentes a 2021, chegando ao n=132.

Gráfico 1 - Proporções de amostras do estudo dos anos 2020 e 2021 (n = 132)



A população do estudo é composta por 67 (50,76%) indivíduos do gênero masculino e 65 (49,24%) do sexo feminino, com idade entre 0 à 85 anos, sendo 46 (34,85%) integrantes de 0 à 14 anos, 48 (36,36%) de 15 à 35 anos, 33 (25%) de 36 à 64 anos e 5 (3,79%) com 65 anos ou mais (gráfico 2 e 3)

Gráfico 2 - Quantitativo referente ao gênero dos indivíduos neste estudo (n = 132)

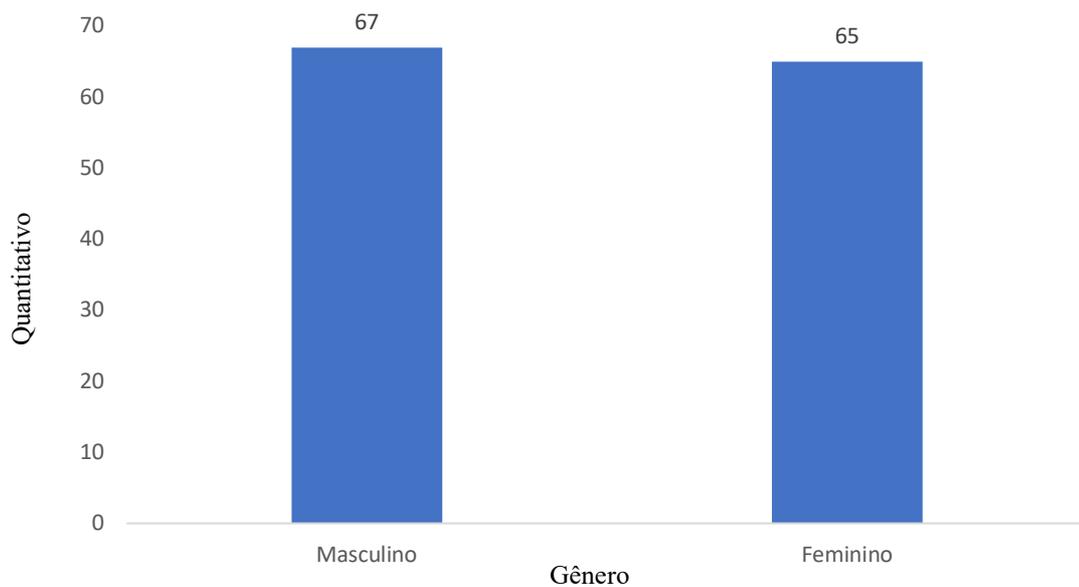
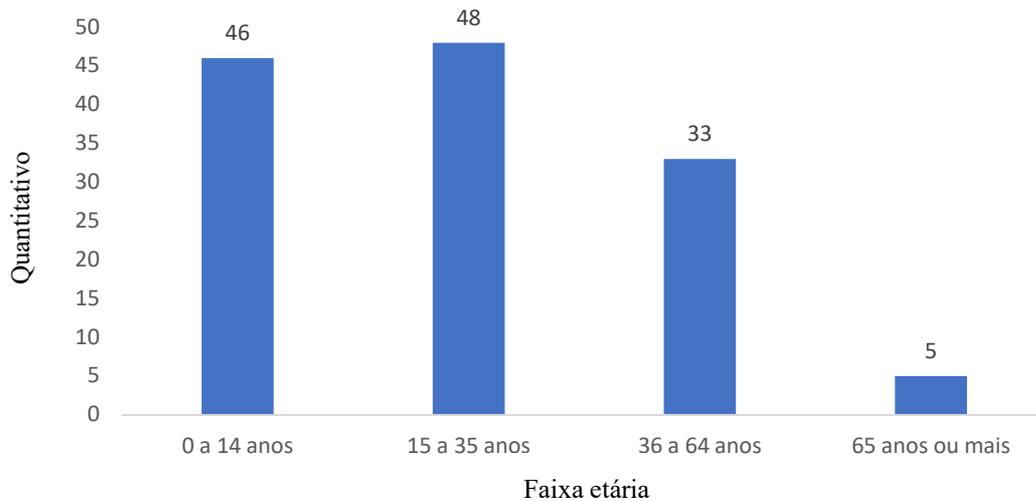
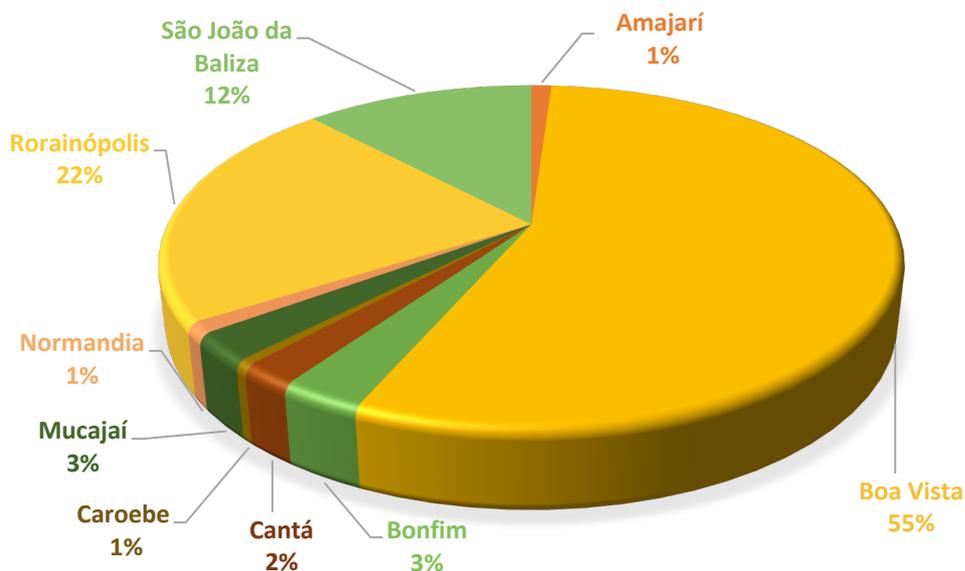


Gráfico 3 - Quantitativo e percentual por faixa etária (n = 132)



As amostras clínicas utilizadas nesta pesquisa são procedentes dos municípios do Estado de Roraima, onde 2 amostras (1%) proveniente do Amajari, 106 (55%) de Boa Vista, 6 (3%) de Bonfim, 4 (2%) cantá, 1 (1%) Caroebe, 5 (3%) Mucajaí, 2 (1%) Normandia, 42 (22%) Rorainópolis e 23 (12%) São João da Baliza, conforme gráfico abaixo.

Gráfico 4 - Percentual de amostras clínicas por município de procedência (n = 132)



Segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a estimativa populacional de Roraima, em 2021, é de 652.713 habitantes sendo Boa Vista o Município que concentra 66,88% da população e que possui a maior rede de saúde da atenção básica, tal fato que resultou no maior número de amostras do estudo.

Os pacientes, quando atendidos nas unidades de saúde do estado, passam por avaliação clínica e devem ser notificados pelas Unidades de Vigilância Epidemiológica (UVE) que registam, entre outros dados, a data do início dos sintomas, data da coleta e os sinais/sintomas apresentados. Tais informações são de grande relevância epidemiológica e laboratorial pois direcionam quais exames laboratoriais devem ser realizados e o provável agente viral causador da patologia.

Conforme alguns dos critérios de inclusão do estudo, estão: a coleta no período agudo da doença (amostras coletadas do primeiro ao quinto dia do início do aparecimento dos sintomas) e a manifestação obrigatória de febre e exantema, podendo apresentar outros sintomas característico do agravo (gráfico 5 e 6).

Gráfico 5 - Quantitativo referente aos sinais/sintomas apresentados pelos indivíduos envolvidos na pesquisa (n=132)

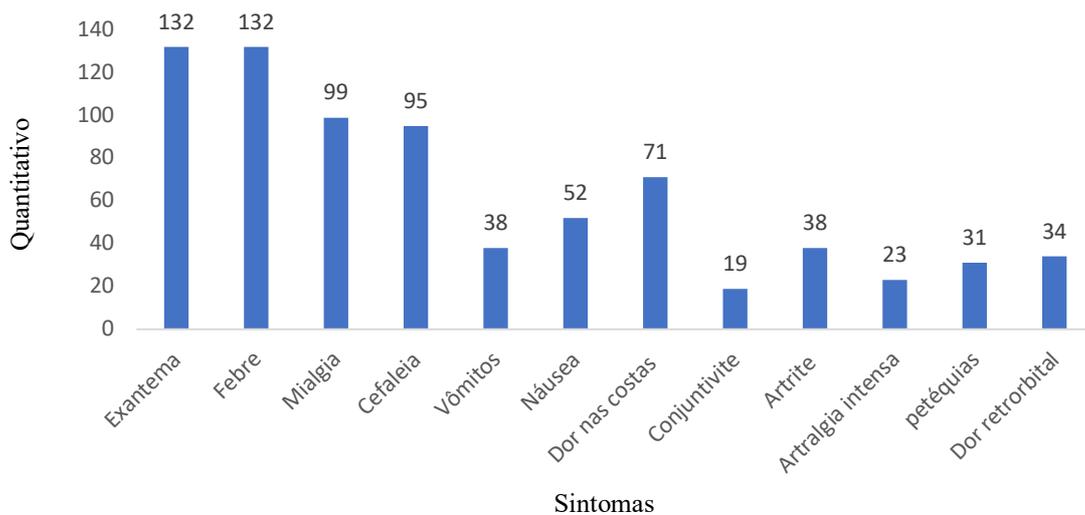
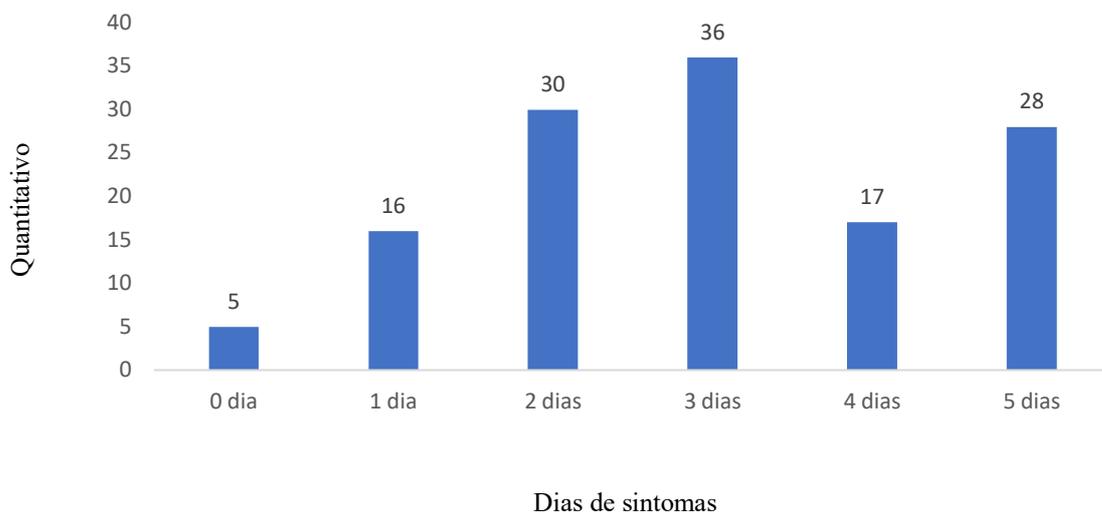


Gráfico 6 - Quantitativo referente a coleta das amostras de acordo com os dias do aparecimento dos primeiros sintomas (n = 132)



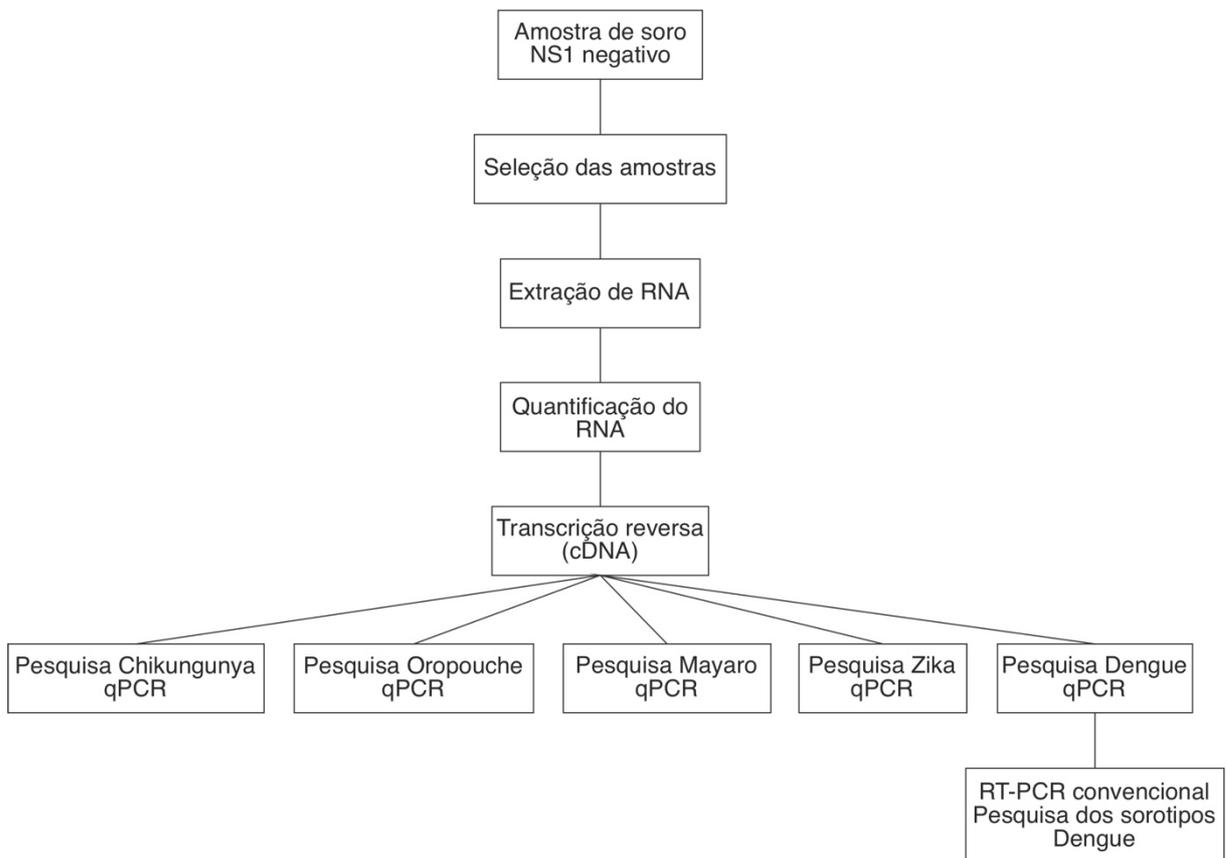
De acordo com o gráfico acima, além da febre e exantema, 99 (75%) dos pacientes apresentaram mialgia, 95 (71,97%) cefaleia, 38 (28,79%) vômito, 53 (39,39%) náusea, 71 (53,79%) dor nas costas, 19 (14,39%) conjuntivite, 38 (28,79%) artrite, 23 (17,42%) artralgia intensa, 31 (23,48%) petéquias e 34 (25,76%) dor retroorbital.

Referente aos dias de sintomas em que a amostra foi coletada, é possível observar que 5 (3,79%) participantes tiveram suas amostras coletada no primeiro dia em que apareceram os sintomas, 16 (12,12%) com 1 dia, 30 (27,73%) 2 dias, 36 (27,27%) 3 dias, 17 (12,88%) com 4 dias e 28 (21,21%) com 5 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas.

6.5 MÉTODO EXPERIMENTAL

O fluxograma da pesquisa para as análises das amostras foi executado conforme descrito na figura abaixo:

Figura 14 - Fluxograma da pesquisa para análise das amostras



A testagem molecular por qPCR para dengue constituiu a última etapa da parte experimental, por se tratarem de amostras que obtiveram resultados não reagentes para DENV através do ELISA para captura do antígeno NS1, exames realizados pelo LACEN-RR. A detecção para dengue em qPCR é composto por 4 etapas diferentes que determinam os diferentes sorotipos de dengue em caso positivo.

6.5.1 Extração do RNA

Para a extração do RNA viral foi utilizado o kit QUICK-RNA™ Viral Kit (ZYMO RESEARCH) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Uma alíquota de 100µl de soro foi acrescida ao mesmo volume de solução “DNA/RNA Shield” (2x concentrada) e homogeneizada no vortex por 15 segundos para realização da lise viral. Posteriormente foi adicionado 800µl da solução “Viral RNA Buffer” para cada 400µl da mistura anterior. A mistura foi então transferida para o interior da coluna “Zymo-Spin IC Column”, sendo a mesma já previamente coletada em um tubo de coleta “Collection Tube” e centrifugada a velocidade máxima (10000 – 160000xg) por 2 minutos. Após a transferência da coluna para um novo tubo de coleta “Collection Tube”, o tubo de coleta antigo foi então descartado.

Adicionamos 1000µl do tampão de lavagem “Viral Wash Buffer” no interior da coluna, e centrifugamos por 30 segundos a velocidade máxima (10000 – 160000xg) e posteriormente descartamos o que passou, este passo sendo novamente repetido. Ao adicionarmos 1000µl de etanol 100% no interior da coluna, centrifugamos por 1 minuto a velocidade máxima (10000 – 160000xg) garantindo assim a total remoção do tampão de lavagem da coluna.

Cuidadosamente, transferimos a coluna para um tubo livre de nucleases utilizando RNase. Foi adicionado 50µl de água livre de DNA/RNase “DNase/RNase-Free Water” diretamente no centro da coluna e incubamos por 1 minuto e posteriormente centrifugamos a velocidade máxima (10000 – 160000xg) por 30 segundos, finalizando assim o procedimento de extração.

6.5.2 Quantificação do RNA

Após a extração do RNA, foi realizada a etapa de quantificação dos produtos de todas as extrações utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific,

EUA) para determinação da absorbância nos comprimentos de 260/280nm e verificando assim a quantidade e qualidade do RNA obtido.

O RNA eluído foi armazenado imediatamente a -80°C até a realização da Transcrição reversa para obtenção do cDNA.

6.5.3 RT-PCR em tempo real (qPCR)

6.5.3.1 Produção do cDNA

Por se tratar de vírus que contém RNA como material genético, foi necessário a realização da técnica de transcrição reversa para obtenção do DNA complementar (cDNA), para isto utilizamos o kit “High-Capacity RNA-to-cDNA™” da *appliedbiosystems*.

Para a produção do cDNA foram utilizados os primers randômicos que compõe o kit, onde estes não são revelados pelo fabricante.

6.5.3.2 Sondas e iniciadores

Todas as amostras desta pesquisa foram avaliadas por qPCR para a identificação dos vírus: CHIKV, OROV, MAYV, ZIKV, DENV 1, DENV 2, DENV 3 e DENV 4, utilizando o kit qPCR Bio Probe Mix Separete-Rox (PCRBiosystems, UK), onde as sondas e primers estão dispostos na tabela 2.

Quadro 2 - Lista de primers utilizados na pesquisa para detecção das arboviroses

		Primer	
	Alvo	Sequência (5' → 3')	Direção
CHIKV	NSP1	AAAGGGCAAACCTCAGCTTCAC	Forward
	NSP1	GCCTGGGCTCATCGTTATTC	Reverse
		CGCTGTGATACAGTGGTTTCGTGTG	Probe
OROV	N	TACCCAGATGCGATCACCAA	Forward
	N	TTGCGTCACCATCATTCCAA	Reverse
		TGCCTTTGGCTGAGGTAAGGGCT	Probe
MAYV	NSP1	AAGCTCTTCTCTGCATTGC	Forward
	NSP1	TGCTGGAAACGCTCTCTGTA	Reverse 1
		TGCTGGAAATGCTCTTTGTA	Reverse 2
		GCCGAGAGCCCGTTTTTAAAATCA	Probe
ZIKV	NS5	AARTACACATACCARAACAAAGTGGT	Forward

	NS5	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG CTYAGACCAGCTGAAR	Reverse Probe
DENV1	NS5	GACACCACACCCTTTGGACAA	Forward
	NS5	CACYTGGGCTGTCACCTCCAT	Reverse
		AGAGGGTGTTTAAAGAGAAAGTTGACACGCG	Probe
DENV2	M	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	Forward
	M	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	Reverse
		CTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	Probe
DENV3	C	GGGAAAACCGTCTATCAATA	Forward
	C	CGCCATAACCAATTTTCATTGG	Reverse
		CACAGTTGGCGAAGAGATCTCAAGAGGA	Probe
DENV4	C	TGAAGAGATTCTCAACCGGAC	Forward
	C	AATCCCTGCTGTTGGTGGC	Reverse
		TCATCACGTTTTTTCGAGTCCTTTCCA	Probe

6.5.3.3 RT-PCR em tempo real para identificação dos CHIKV, OROV, MAYV, ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4.

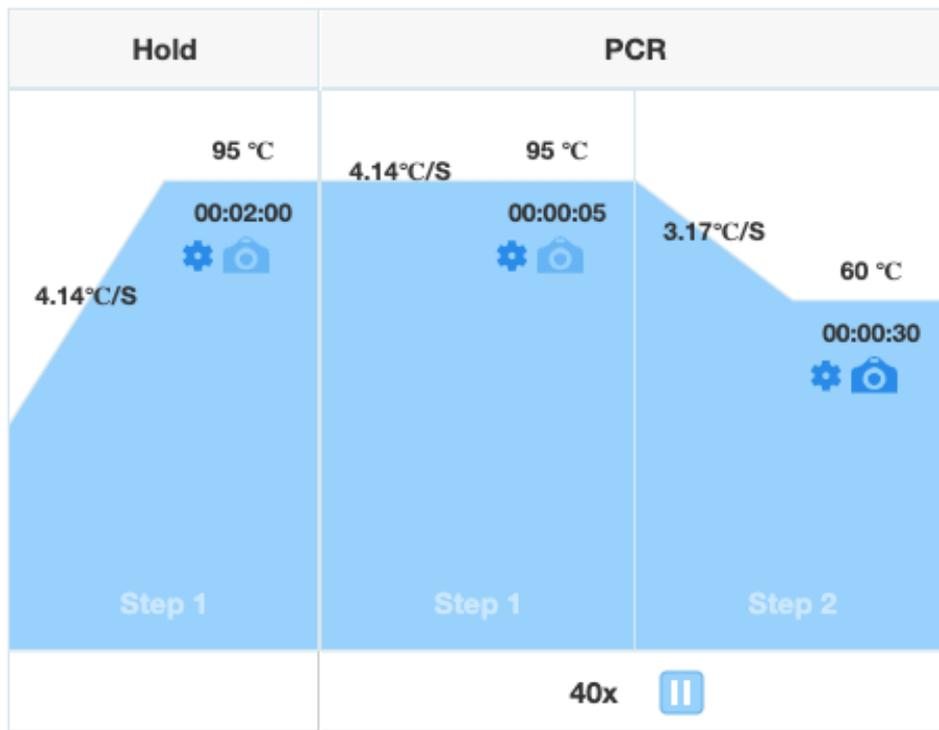
Para a identificação dos arbovírus desta pesquisa, as 132 amostras foram submetidas à análise por RT-PCR em tempo real utilizando o kit qPCR Bio Probe Mix Separate-Rox (PCRBiosystems, UK), utilizando as proporções otimizadas pelo LEVE-IB-UNICAMP. Foi utilizado 5µl Mix + Rox, 1µl Forward (10µM), 1µl Reverse (10µM), 0,5µl de Probe (10µM), 7,3µl Água (~variável) e 3µl de amostra (variável), totalizando um volume final de 20µl que foram utilizados então para o processo de amplificação. As condições de reação foram de 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5 segundos e 40 ciclos térmicos de 60°C por 30 segundos, com as leituras realizadas no equipamento de amplificação QuantStudio 3 (AppliedBiosystems). Utilizamos controles positivos e negativos com intuito de validação da análise e detecção de possíveis contaminações.

Quadro 3 - Protocolo com proporções otimizadas do kit qPCR Bio Probe Mix Separate-Rox (PCRBiosystems, UK)

Kit qPCR Bio Probe Mix Separate-Rox (PCRBiosystems, UK)	
<p>Detecção de CHIKV Detecção de ZIKV Detecção de OROV Detecção de DENV1</p>	<p>Detecção de MAYV</p>

Detecção de DENV2			
Detecção de DENV3			
Detecção de DENV4			
1X			
Mix + Rox	5ul	Mix + Rox	5ul
Forward (10uM)	1ul	Forward (10uM)	1ul
Reverse (10uM)	1ul	Reverse (10uM)	1ul
Probe (10uM)	0,5ul	Reverse (10uM)	1ul
Água	7,3ul (~variavel)	Probe (10uM)	0,5ul
Amostras	3ul (~variavel)	Água	7,3ul (~variavel)
		Amostras	3ul (~variavel)
Total		20ul	

Figura 15 - Ciclo de ampliação QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)



Fonte: software QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)

Para quantificação e obtenção dos resultados da amplificação, foi determinado o ciclo threshold ($Ct \leq 38,99$) sendo possível indicar a positividade da amostra quando há o aumento significativo em relação a fluorescência basal. Os níveis de limiar do ciclo (Ct), em 40 ciclos realizados, é inversamente proporcional à quantidade de ácido nucleico alvo da amostra, isto significa que quanto maior o Ct , menor será a quantidade do RNA do alvo na amostra.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), recebeu 534 amostras em 2020 e 530 no ano de 2021, devidamente acompanhada de suas fichas de notificação compulsória. Tais amostras se enquadravam no critério para realização de exame laboratorial para Dengue NS1 através da metodologia de ELISA.

Foram coletados e utilizados os dados que compõe as fichas de notificação, como: Sexo, idade, município de procedência da amostra, data dos primeiros sintomas, data da coleta da amostra, dias de sintomas e sintomas, conforme disposta na tabela abaixo.

Quadro 4 - Dados referente às informações disponibilizadas nas fichas de notificações das amostras que compõe a pesquisa

Variáveis	Ano					
	2020		2021		total	
	n	%	n	%	n	%
Faixa etária						
0 a 14	27	45,76%	19	26,03%	46	34,85%
15 a 35	20	33,90%	28	38,36%	48	36,36%
36 a 64	12	20,34%	21	28,77%	33	25,00%
65 ou mais	0	0,00%	5	6,85%	5	3,79%
Sexo						
Masculino	29	49,15%	38	52,05%	67	50,76%
Feminino	30	50,85%	35	47,95%	65	49,24%
Município de procedência						
Amajari	1	1,69%	0	0,00%	1	0,76%
Boa Vista	36	61,02%	34	46,58%	70	53,03%
Bonfim	3	5,08%	0	0,00%	3	2,27%
Cantá	2	3,39%	0	0,00%	2	1,52%
Caroebe	0	0,00%	1	1,37%	1	0,76%
Mucajá	1	1,69%	3	4,11%	4	3,03%
Normandia	1	1,69%	0	0,00%	1	0,76%
Rorainópolis	15	25,42%	12	16,44%	27	20,45%
São João da Baliza	0	0,00%	23	31,51%	23	17,42%
Dias de sintomas						
0 dia	3	5,08%	2	2,74%	5	3,79%

1 dia	8	13,56%	8	10,96%	16	12,12%
2 dias	16	27,12%	14	19,18%	30	22,73%
3 dias	16	27,12%	20	27,40%	36	27,27%
4 dias	6	10,17%	11	15,07%	17	12,88%
5 dias	10	16,95%	18	24,66%	28	21,21%
Sinais/Sintomas						
Exantema	59	100,00%	73	100,00%	132	100,00%
Febre	59	100,00%	73	100,00%	132	100,00%
Mialgia	43	72,88%	56	76,71%	99	75,00%
Cefaleia	41	69,49%	54	73,97%	95	71,97%
Vômitos	15	25,42%	23	31,51%	38	28,79%
Náusea	21	35,59%	31	42,47%	52	39,39%
Dor nas costas	31	52,54%	40	54,79%	71	53,79%
Conjuntivite	13	22,03%	6	8,22%	19	14,39%
Artrite	21	35,59%	17	23,29%	38	28,79%
Artralgia intensa	8	13,56%	15	20,55%	23	17,42%
petéquias	16	27,12%	15	20,55%	31	23,48%
Dor retrorbital	17	28,81%	17	23,29%	34	25,76%

Torna-se de suma importância informar que fora mantido o anonimato dos pacientes que tiveram as amostras utilizadas nesta pesquisa, sendo disponibilizados apenas os dados relevantes de importância epidemiológica e do agente viral. Para isso, as amostras clínicas foram novamente numeradas buscando manter o sigilo dos indivíduos envolvidos na pesquisa.

A primeira etapa da fase experimental deste estudo foi realizar a extração do RNA e quantificá-lo através da espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260/280 nanômetros (tabela 5).

Quadro 5 - Quantificação do RNA por Espectrofotometria NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific, EUA)

Ano							
2020				2021			
nº de ordem	ng/µl						
1	1,3	38	2,8	60	13,1	97	12,4
2	1,9	39	0,6	61	0,7	98	12,5
3	0,7	40	5,0	62	96,7	99	0,7
4	0,5	41	1,7	63	13,7	100	1,2
5	0,7	42	1,3	64	0,4	101	5,4
6	2,7	43	0,5	65	3,2	102	6,4
7	0,4	44	1,6	66	2,6	103	2,4

8	2,4	45	0,2	67	1,1	104	3,9
9	1,7	46	1,7	68	35,0	105	1,8
10	5,1	47	26,1	69	2,8	106	1,0
11	0,4	48	0,1	70	39,1	107	2,0
12	0,7	49	0,2	71	1,3	108	2,0
13	0,8	50	21,0	72	98,3	109	16,9
14	0,3	51	0,1	73	41,4	110	20,9
15	0,8	52	0,1	74	104,4	111	27,3
16	1,0	53	1,0	75	93,3	112	2,4
17	0,6	54	40,9	76	54,0	113	1,6
18	1,7	55	42,3	77	52,6	114	1,1
19	0,6	56	2,9	78	62,4	115	6,7
20	0,5	57	0,2	79	43,1	116	10,0
21	0,4	58	0,9	80	9,0	117	5,2
22	0,0	59	0,5	81	105,2	118	1,5
23	0,8			82	20,0	119	2,4
24	6,5			83	12,4	120	1,5
25	4,1			84	0,5	121	1,4
26	3,0			85	29,5	122	1,4
27	18,3			86	0,7	123	2,2
28	23,6			87	46,7	124	1,4
29	0,5			88	1,2	125	1,3
30	18,2			89	13,7	126	1,1
31	3,9			90	13,2	127	1,3
32	7,1			91	6,5	128	0,9
33	39,4			92	2,4	129	1,0
34	0,3			93	2,7	130	0,8
35	0,5			94	14,5	131	1,4
36	13,3			95	1,7	132	2,0
37	1,0			96	1,0		

Posteriormente realizamos a transcrição reversa para obtenção do cDNA, uma vez que só é possível amplificação em DNA. Após a realização da transcrição reversa as amostras de cDNA foram novamente submetidas a quantificação (tabela 6).

Quadro 6 - Quantificação do cDNA por Espectrofotometria NanoDrop™ One/One (Thermo Fischer Scientific, EUA)

Ano							
2020				2021			
n° de ordem	ng/µl						
1	2053,4	38	2102,5	60	2336,5	97	2143,9
2	2050,7	39	2066,8	61	2099,4	98	2229,9
3	2049,5	40	2064,2	62	2137,1	99	2181,3
4	2044,5	41	2053,9	63	2237,3	100	2182,2
5	2047,9	42	213,0	64	2133,4	101	2223,7
6	2058,9	43	2055,2	65	2145,2	102	2181,3
7	2043,4	44	2020,4	66	2165,3	103	2201,3
8	2079,1	45	2046,6	67	2128,4	104	2206,7
9	2059,6	46	2118,8	68	2170,7	105	2178,9
10	2052,6	47	2071,4	69	2159,1	106	2245,0
11	2040,8	48	2078,0	70	2160,2	107	2198,7
12	2044,1	49	2049,6	71	2192,8	108	2195,9
13	2036,9	50	2059,0	72	2076,1	109	2236,4
14	2048,3	51	2016,1	73	2300,5	110	2216,3
15	2053,3	52	2142,1	74	2158,1	111	2210,6
16	2029,5	53	2115,6	75	2254,0	112	2208,4
17	2084,3	54	2162,2	76	2136,6	113	2224,3
18	2057,3	55	2085,9	77	2200,7	114	2187,3
19	2039,0	56	1534,3	78	2176,9	115	2179,3
20	2062,8	57	2106,8	79	2170,6	116	2295,8
21	2075,0	58	2113,6	80	2140,9	117	2226,3
22	2056,5	59	2067,6	81	2147,3	118	2224,1
23	2096,7			82	2177,3	119	2180,5
24	2118,2			83	2208,9	120	2209,9
25	2062,2			84	2122,7	121	2163,8
26	2041,5			85	2146,2	122	2149,0
27	2037,7			86	2173,0	123	2194,6
28	2047,5			87	2150,3	124	2199,4
29	2031,1			88	2189,1	125	2207,8
30	2082,0			89	2112,9	126	2193,4
31	2033,2			90	2145,3	127	2170,8
32	2094,0			91	2117,8	128	2173,3
33	2109,0			92	2122,4	129	2184,2
34	2076,9			93	1908,8	130	2199,4
35	2087,3			94	2125,4	131	2181,3
36	2155,1			95	2148,7	132	2215,7
37	2059,7			96	2126,2		

Na tabela acima podemos observar a concentração elevada de cDNA, todas acima de 100 ng/ μ l, sendo necessário a realização da normalização, uma vez que o kit Kit qPCR Bio Probe Mix Seperate-Rox (PCRBiosystems, UK), em seu protocolo, preconiza uma concentração menor que 100 ng/ μ l para a realização da amplificação.

O processo de quantificação do produto extraído e convertido a cDNA através da espectrofotometria é uma importante etapa do estudo, pois através da quantidade e qualidade é possível garantir o melhor aproveitamento na amplificação proporcionando resultados satisfatórios.

A última etapa realizada foi as testagens por RT-PCR para as arboviroses que integram este estudo, onde todas as amostras (n= 132) foram testadas para CHIKV, OROV, MAYV, ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, uma vez que estudos relatam a existência de co-infecções, DENV/ZIKV, DENV/CHIKV ou ZIKV-CHIKV, por mais de uma arbovirose em localidades onde há circulação simultânea de diferentes tipos na mesma região (LICÍNIO; AYRES, 2021).

As técnicas moléculares têm se mostrado um importante aliado nos diagnósticos das arboviroses, quando coletadas as amostras no período agudo da doença. A técnica molecular do RT-PCR em tempo real utilizada neste estudo traz grandes vantagens em relação a técnica do ELISA, uma vez que possuem sensibilidade e especificidade superiores à técnica sorológica, diminuindo a probabilidade de resultados falso-negativo e reações cruzadas. A técnica molecular utilizada traz maior benefício até mesmo em relação ao RT-PCR convencional, pois toda a reação de amplificação e quantificação ocorre em um sistema fechado reduzindo o tempo gasto na reação e diminuindo a possibilidade de contaminação (LICÍNIO E AYRES, 2021).

7.1.1 Pesquisa do CHIKV, OROV e ZIKAV por RT-PCR em tempo real

Neste estudo não foram detectados nas amostras clínicas os Vírus da Chikungunya, Oropouche e Zika, o que não reflete na inexistência da circulação dos mesmos, pois conforme os relatórios anuais de epidemiologia de Roraima dos anos de 2020 e 2021 constam casos confirmados de CHIKV e ZIKV.

O estudo realizado por Menezes (2013), além de detectar o vírus Oropouche em 13 amostras clínicas coletadas no ano 2012, traz informações colhidas junto à Coordenação Geral de Vigilância em Saúde de Roraima referente a identificação do vírus OROV em amostras

aleatórias dos anos de 2004 e 2005 e que tiveram resultado negativo para DENV, estudo esse realizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC).

Há de se considerar que a viremia por ZIKV em amostras sanguíneas, além de baixa, persistem por um curto período de tempo nos humanos, sendo que em amostras de urina e sêmen podem persistir por 3 semanas ou até mesmo meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (OZKURT E TANRIVERDI, 2017). Como alternativa para a diminuição dos casos falso-negativo no RT-PCR para ZIKV seria a utilização da técnica tanto na amostra sanguínea quanto na urina (CORMAN et al., 2016).

Outro fator a ser considerado é a quantidade de material genético insuficiente para que fosse detectada na amplificação e/ou degradação devido o transporte e os processos de descongelamento.

7.1.2 Pesquisa do MAYV POR RT-PCR em tempo real

As 132 amostras que obtiveram resultados negativo para NS1, também foram testadas para MAYV através da técnica do RT-PCR em tempo real utilizando o primer de Wanggoner (WAGGONER et al., 2018), onde 3 amostras tiveram resultado positivo para o agente viral, sendo 1 amostra referente ao ano de 2020 e 2 do ano de 2021, correspondendo a 2% das amostras do estudo.

Quadro 7- Amostras negativas para NS1 e testadas para MAYV por RT- PCR em tempo real

Amostras negativas para NS1	Amostras testadas para MAYV por RT-PCR em tempo real	
	NEGATIVAS	POSITIVAS
132	129	3
	98%	2%

Referente às curvas de amplificação, o eixo Y (vertical) corresponde a quantidade de RNA amplificado enquanto o eixo X (horizontal) aponta a quantidade de ciclos realizados na ampliação. Através da fluorescência emitida pela sonda foi possível detectar a presença da sequência alvo da pesquisa. Através do Ct foi possível indicar a medida relativa de concentração (eixo X – Y), pois quanto menor a quantidade de ciclos necessários para a detecção do alvo maior será a quantidade de RNA viral presente na amostra clínica testada (figura 16 e 17).

Figura 16 - Curvas de amplificação das amostras 46 e 68 para MAYV por RT-PCR em tempo real

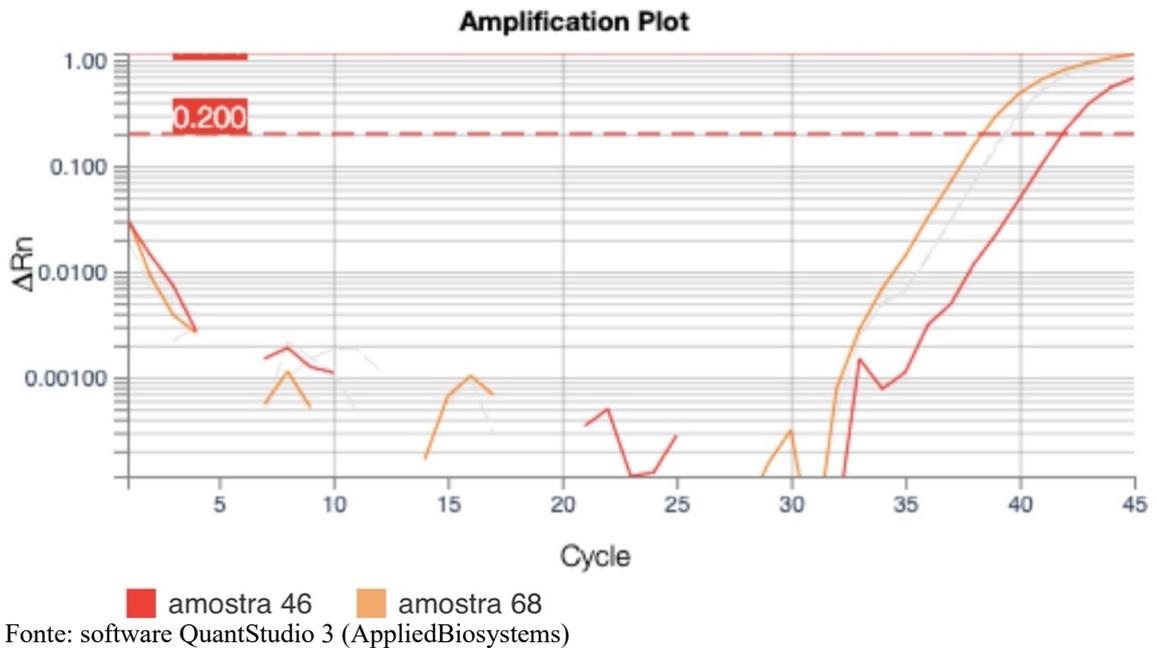
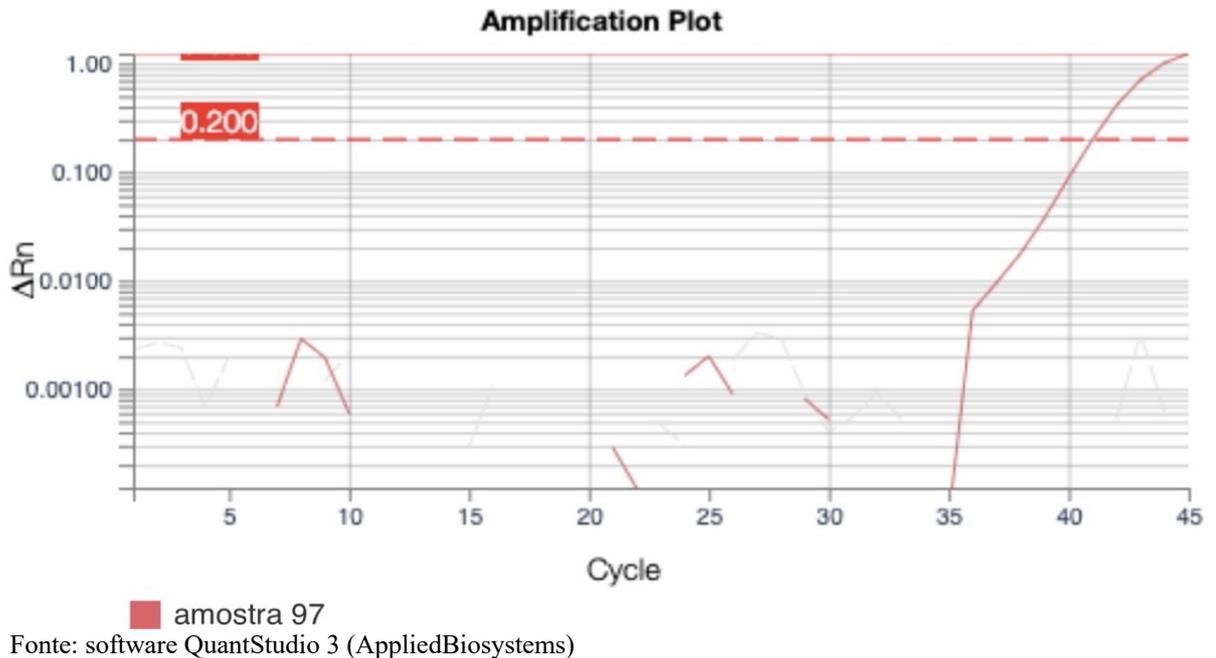


Figura 17 - Curva de amplificação da amostra 97 para MAYV por RT-PCR em tempo real



Os dados referentes ao MAYV no Estado são insipientes, pois não há registros dos mesmo por parte dos órgãos de vigilância epidemiológica, porém estudo realizado em 2013 confirma a circulação do vírus no ano 2012, onde foram testadas 72 amostras com resultados negativos para NS1 e foi detectado o agente viral em 7 amostras (9,7%) através da técnica de RT-PCR convencional (MENEZES, 2013).

O Brasil é um país de clima tropical onde possui cerca de 30% do seu território constituído de florestas, principalmente a região amazônica, fatores propícios a manutenção dos arbovírus e seus vetores (KARABATSOS, 2001).

Um relevante fator a ser considerado é a localização geográfica do Estado de Roraima que possui limites de fronteira com o Estado do Amazonas e Pará, além dos Países Venezuela e Guiana, ocasionando um constate deslocamento populacional que contribui para a emergência e reemergência das arboviroses. Vale reforçar que a Venezuela, que possui histórico de casos de MAYV, passa atualmente uma crise humanitária ocasionando um enorme fluxo de imigrantes que utilizam a fronteira como porta de entrada para o Estado de Roraima.

Estudos revelam que na Venezuela houve registros de casos confirmado do vírus Mayaro nos anos de 2010 no Município La Estación (ALBERT et al., 2015) e Ospina (MANUEL et al., 2012), ambos do Estado de Portuguesa. Tais relatos abrem um alerta, devido o alto número de imigrantes que buscam refúgio nos estados brasileiros e principalmente em Roraima.

No Estado do Pará houve a confirmação de 5 casos de MAYV em 2019, 2 crianças e 3 adultos, conforme informado no Boletim Epidemiológico disponível no site do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2019). Já no Amazonas, estudos realizados em 2017, isolaram o MAYV em 261 amostras sanguíneas em Coari – AM e 63 na capital Manaus (PEREIRA, 2017).

Os pacientes que tiveram suas amostras testadas e que foram detectadas para Mayaro encontravam-se entre o 2º e o 5º dia do início dos sintomas (tabela 8).

Quadro 8 - Dados epidemiológicos dos pacientes positivos para MAYV

Nº da amostra	dias de sintomas no momento da coleta	Idade	Sexo	Nacionalidade	Município de Procedência
46	2	25 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista
68	3	26 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista
97	5	42 anos	Feminino	Brasileira	Mucajaí

Para se chegar a um diagnóstico confiável é primordial que se considere a fase aguda da doença e a fase de convalescência. Na fase aguda (0 a 5 dias do aparecimento dos sintomas) é possível detectar o RNA viral através do RT-PCR em tempo real, pois a viremia poderá estar alta no sangue do paciente, diferentemente da fase de convalescência onde há o decréscimo do número de partículas virais (DULGHEROFF et al., 2015), tornando-se primordial que os

profissionais de saúde tenham atenção voltada aos dias de sintomas para que se realize a escolha do teste laboratorial mais adequado de acordo com as janelas de detecção (SOUSA,2019).

Quanto a procedências das amostras positivas, 2 são provenientes das unidades de saúde do município de Boa Vista e 1 Mucajaí, porém o paciente da amostra 46, mesmo sendo notificado e com coleta realizada na capital Boa Vista, reside no município do Cantá.

A procedência da amostra é um dado de grande valia no campo epidemiológico, pois revelam o ponto onde há a circulação do agente viral dando subsídios para a que a vigilância em saúde realize estratégias e tome as medidas necessárias para o combate e controle vetorial da região.

Quanto aos sintomas apresentados, além da febre e exantema, todos os 3 pacientes positivos para MAYV apresentaram como sintoma comum a mialgia, vômito e dor nas costas, seguido de cefaleia e náuseas (tabela 9).

Quadro 9 - Sintomas apresentados pelos pacientes positivos para MAYV

Sintomas	Nº da amostra positiva para MAYV		
	46	68	97
Exantema	Sim	Sim	Sim
Febre	Sim	Sim	Sim
Mialgia	Sim	Sim	Sim
Cefaleia	Não	Sim	Sim
Vômito	Sim	Sim	Sim
Nauseas	Sim	Não	Sim
Dor nas costas	Sim	Sim	Sim
Artrite	Não	Não	Não
Artralgia intensa	Não	Não	Sim
Petéquias	Não	Não	Não
Dor retorbital	Não	Sim	Não

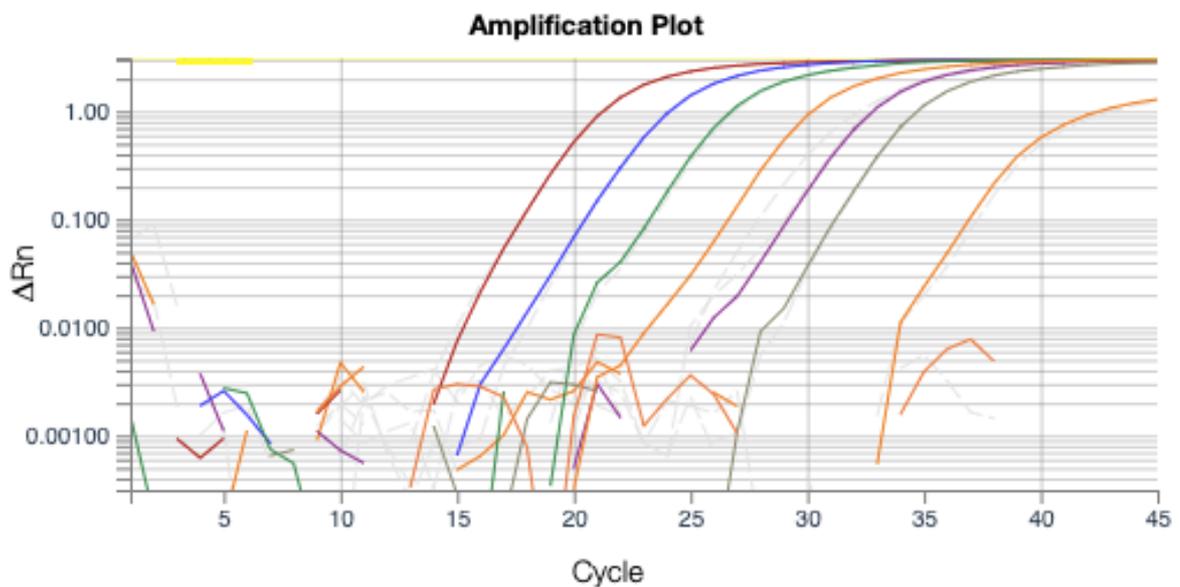
Fica possível observar que os sintomas apresentados pelos pacientes acometidos pelo MAYV são similares as demais arboviroses como chikungunya, oropouche, zika e dengue, tornando difícil o diagnóstico somente pela clínica.

O diagnóstico diferencial se faz necessário frente aos casos de síndromes febris com resultados negativos ou falso-negativos, devido os aspectos clínicos em infecções por arbovírus que apresentam sintomas dengue símile (SOUSA,2019).

7.1.3 Pesquisa do DENV POR RT-PCR em tempo real

Das 132 amostras testadas através do RT-PCR em tempo real, proveniente de pacientes que obtiveram resultados negativos para Dengue realizadas através da técnica de ELISA utilizando o kit Panbio Dengue Early ELISA (ABBOTT), obtivemos nesta etapa do estudo positividade para DENV em 8 amostras, correspondendo 6% das amostras clínicas testadas.

Figura 18 - Curvas de amplificação das amostras positivas para DENV por RT-PCR em tempo real



Fonte: software QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)

Todas as amostras deste estudo foram testadas para os 4 sorotipos da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), cujo resultados obtidos estão dispostos na tabela abaixo.

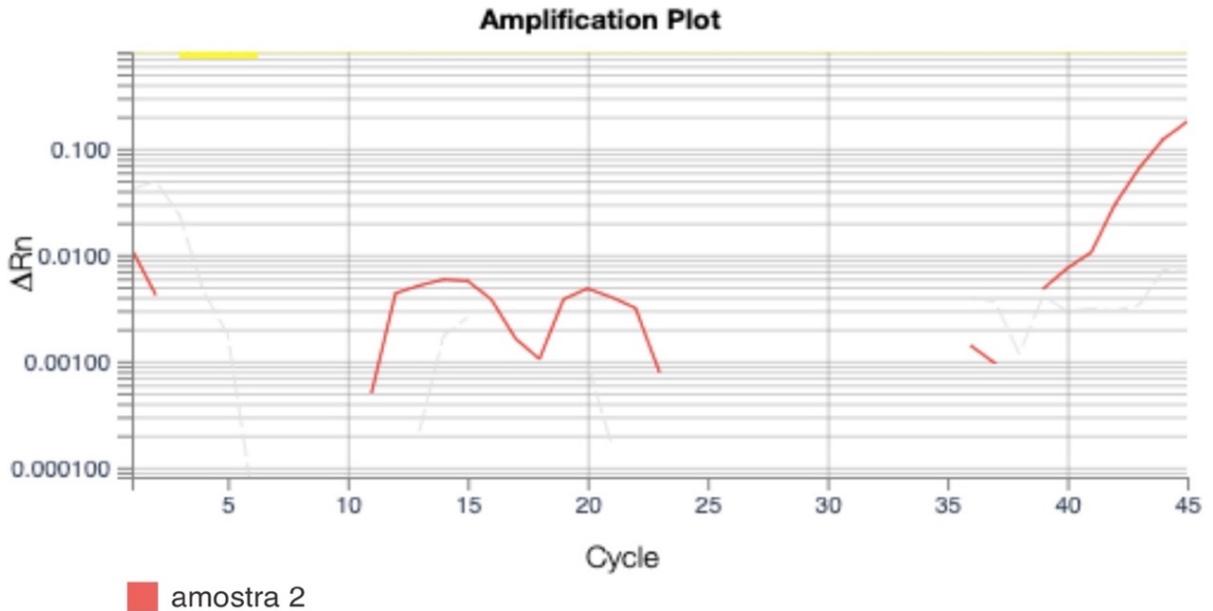
Quadro 10 - Quantidade de amostras NS1 negativas testadas por RT-PCR para DENV com identificação dos sorotipos

Amostras testadas e negativas para NS1	Amostras testadas para DENV por RT-PCR		Amostras testadas e positivas para os sorotipos da DENV por qPCR			
	NEGATIVAS	POSITIVAS	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
132	124	8	3	5	0	0
	94%	6%	2%	4%	0%	0%

Podemos observar que das 132 amostras testadas foram encontradas 8 (6%) amostras positivas para Dengue, sendo 3 positivas para o sorotipo 1 (2%) e 5 (4%) para o sorotipo 2, não

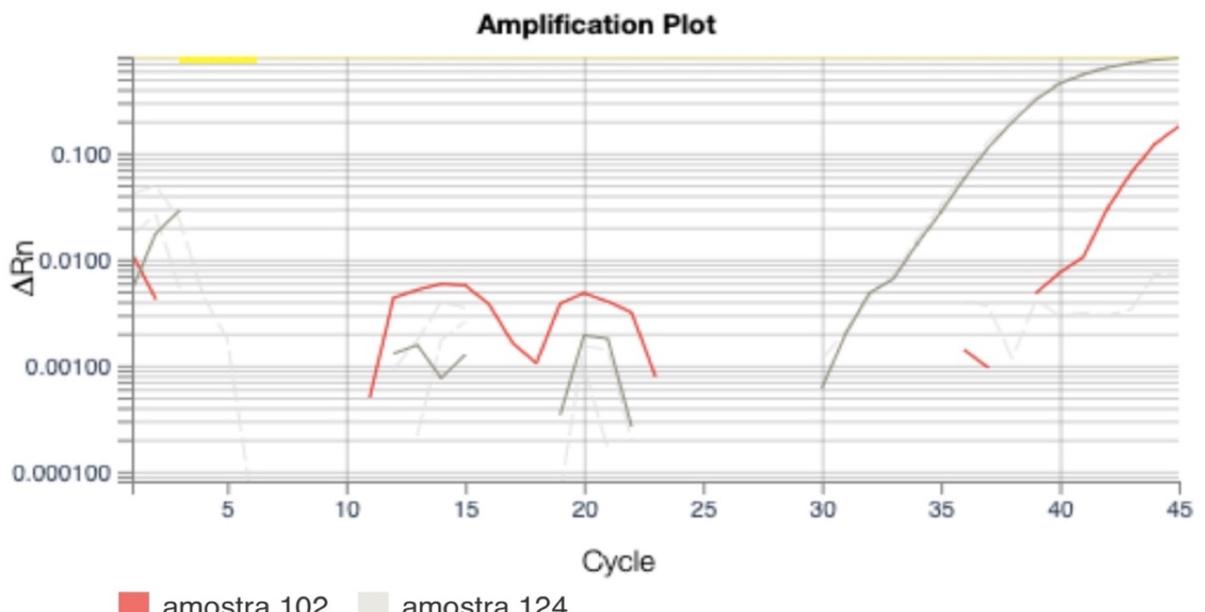
tendo nenhum resultado positivo para os sorotipos 3 e 4. Foram utilizados, como referência, os primers de Callahan (CALLAHAN et al., 2001) para identificação dos sorotipos 1, 3 e 4 e para o sorotipo 2 os primers de Johnson, Russell e Lanciotti (JOHNSON; RUSSELL; LACIOTTI, 2005).

Figura 19 - Curva de amplificação da amostra 02 para DEV1 por RT-PCR em tempo real



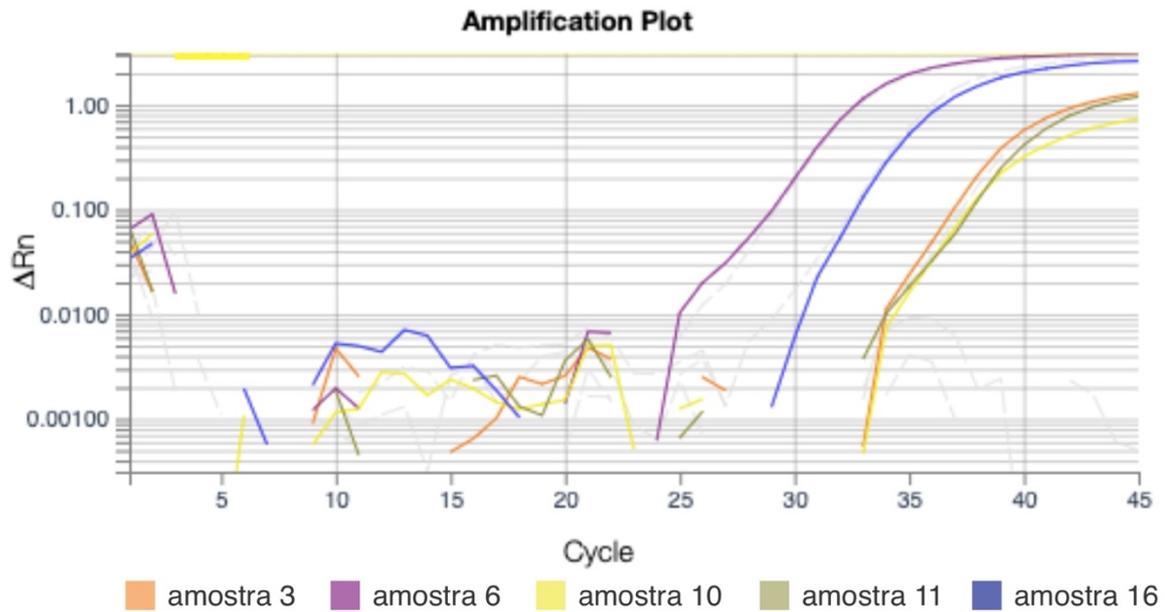
Fonte: software QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)

Figura 20 - Curvas de amplificação das amostras 102 e 124 para DEV1 por RT-PCR em tempo real



Fonte: software QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)

Figura 21 - Curvas de amplificação das amostras 03, 06, 10, 11 e 16 para DEV2 por RT-PCR em tempo real



Fonte: software QuantStudio 3 (AppliedBiosystems)

Quando avaliamos os resultados referente ao ano correspondente da notificação, nota-se que das 59 amostras analisadas de 2020 tivemos positividade para DENV em 6 amostras, sendo 1 para DENV1 e 5 para DENV2, já nas amostras do ano de 2021 obtivemos 2 amostras positivas, sendo estas referente ao sorotipo 1.

Quadro 11- Quantitativo de amostras positivas para os sorotipos da DENV 1 – 4 nos anos de 2020 e 2021

Ano	Sorotipo da DENV detectada por RT-PCR em Tempo Real			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV 4
2020	1	5	0	0
2021	2	0	0	0

Conforme o Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima dos anos de 2020 e 2021, tivemos no estado 2.383 casos notificados com 495 confirmações e 1.215 casos notificados com 119 confirmações, respectivamente.

Apesar das notificações para as arboviroses terem diminuído, possivelmente devido a situação pandêmica da COVID-19, o Estado de Roraima ainda possui 6 municípios com

classificação de alto risco epidêmico, 8 com médio risco e 1 município de baixo risco. Ainda conforme os relatórios, os mesmos mostram o sorotipo 2 com maior intensidade de circulação em 2020 e no ano de 2021 houve apenas a identificação do vírus circulante em uma amostra, sendo a mesma do sorotipo 1. Tais dados estão condizentes com os achados no estudo, uma vez que foram identificados os dois sorotipos em questão.

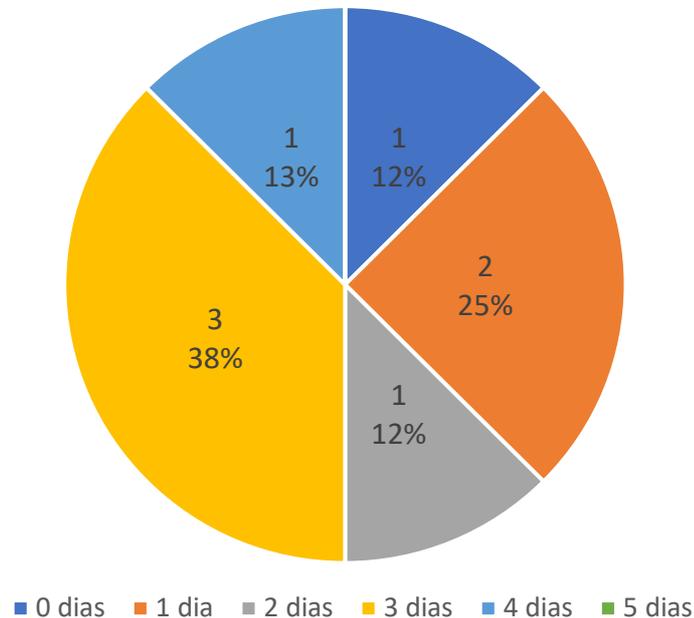
As informações presentes na bula do KIT Panbio Dengue Early ELISA (ABBOTT), utilizado para o diagnóstico da dengue pelo LACEN-RR, aponta a sensibilidade entre 76 e 77,7%, porém existe estudo de meta-análise que contradiz os dados informados, apontando a sensibilidade a nível global do referido kit em 66% (COSTA, 2015).

Importante ressaltar que durante muitos anos Roraima teve a circulação simultânea dos quatro sorotipos indicando prováveis infecções secundárias, podendo gerar resultados falso-negativos quando aplicada a metodologia de ELISA para detecção do antígeno NS1, pois tal fator contribui para diminuição da sensibilidade do teste devido a formação de imunocomplexos, antígeno/anticorpo, impedindo a ligação do antígeno aos anticorpos Anti-NS1 ligados à superfície dos poços da microplaca (MONTEIRO, 2018). Como um fator também a ser considerado é a apresentação da baixa viremia no momento da coleta, ocasionando a não detecção do antígeno NS1 na técnica do ELISA.

Para que se tenha um aumento na detecção da DENV e conseqüentemente a diminuição da ocorrência de resultados falso-negativo, aconselha-se a realização de mais de uma técnica (sorológicas, isolamento viral e métodos moleculares) laboratorial de acordo com o estágio da doença e o período da coleta do material biológico (SOUSA,2019).

Como abordado anteriormente, um dos critérios importantes a ser considerado para a escolha da metodologia correta é a realização da coleta da amostra no período agudo da doença (coleta realizada entre 0 a 5 dias do início dos sintomas), onde o LACEN-RR efetua a testagem para dengue NS1 pela técnica do ELISA. Os pacientes que tiveram resultados falso-negativo para dengue, cujo amostras foram submetidas a testagem molecular nesta pesquisa, encontravam-se dentro dos critérios exigidos para a realização da testagem sorológica, conforme gráfico abaixo.

Gráfico 7 - Dias de sintomas, no momento da coleta, apresentados pelos pacientes positivo para DENV por RT-PCR em tempo real



As amostras que obtiveram resultados positivo nesta pesquisa, são provenientes do município de Boa Vista e Cantá, tendo nacionalidade brasileira, de ambos sexos e idade entre 6 meses e 43 anos. Apesar do paciente da amostra 16 ter sido atendido e notificado em uma unidade de saúde do município de Boa vista, o mesmo reside no município do Cantá.

Quadro 12 - Dados epidemiológicos dos pacientes positivos para DENV

Nº da amostra	Idade	Sexo	Nacionalidade	Município de Procedência	Sorotipo detectado
2	34 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista	DENV1
3	8 anos	Feminino	Brasileira	Boa vista	DENV2
6	14 anos	Feminino	Brasileira	Cantá	DENV2
10	14 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista	DENV2
11	35 anos	Feminino	Brasileira	Boa vista	DENV2
16	43 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista	DENV2
102	6 meses	Feminino	Brasileira	Boa vista	DENV1
124	33 anos	Masculino	Brasileira	Boa vista	DENV1

É possível observar que das 8 amostras positivas para DENV, 4 estão na faixa etária de economicamente ativos os tornando os mais susceptíveis, pois são indivíduos que tendem a

se locomover com mais frequência por serem provedores da sua família e incumbidas de responsabilidade, impactando até mesmo o impulsionamento da economia do estado (GONÇALVES, 2020).

Os sintomas apresentados pelos pacientes são de suma importância do ponto de vista epidemiológico, pois através da clínica apresentada podem ser enquadrados como caso suspeito e assim serem notificados para o agravo.

Quadro 13 - Sintomas apresentados pelos pacientes positivos para DENV

Sintomas	Sorotipo		
	DENV1 e 2 8 casos	DENV1 3 casos	DENV2 5 casos
Exantema	8 (100%)	3 (100%)	5 (100%)
Febre	8 (100%)	3 (100%)	5 (100%)
Mialgia	8 (100%)	3 (100%)	5 (100%)
Cefaleia	4 (50%)	2 (67%)	2 (40%)
Vômito	3 (38%)	1 (33%)	2 (40%)
Náuseas	5 (63%)	1 (33%)	4 (80%)
Dor nas costas	4 (50%)	2 (67%)	2 (40%)
Artrite	3 (38%)	0 (0%)	3 (60%)
Artralgia intensa	4 (50%)	1 (33%)	3 (60%)
Petequeias	1 (13%)	1 (33%)	0 (0%)
Dor retro-orbital	3 (38%)	1 (33%)	2 (40%)

Além da febre e exantema que foram critérios de inclusão, todos os pacientes positivos para DENV apresentaram como sintoma comum a mialgia. Quando avaliamos os sintomas de acordo com o sorotipo, temos no DENV1 a cefaleia e dor nas costas com 67%, enquanto no DENV2 80% dos pacientes tiveram náuseas seguido artrite e artralgia intensa.

Todos os sintomas apresentados são condizentes com as sintomatologias descritos em literaturas, onde apenas o diagnóstico clínico se torna ineficaz por terem os sintomas semelhantes.

A realização das análises para dengue se torna de suma importância, pois através dela será possível detectar as amostras que obtiveram resultados falso-negativos para captura do antígeno NS1 através da técnica de ELISA, uma vez que literaturas relatam a superioridade da sensibilidade e especificidade da técnica de biologia molecular (CHAU et al., 2011), além da rapidez na obtenção dos resultados, detecção do produto da qPCR e quantificação dos números de cópias produzidas a cada ciclo. Um importante fator para o monitoramento e tomadas de ações nos enfrentamentos das arboviroses é ter o conhecimento dos sorotipos da dengue bem como outros vírus da síndrome febril circulantes no estado de Roraima.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, o RT-PCR se mostrou mais sensível em relação a técnica do ELISA para captura do antígeno NS1 (kit Panbio Dengue Early ELISA – ABBOTT), pois foi detectado o DENV em 8 (6%) amostras falso-negativo dos anos de 2020 e 2021 provenientes do LACEN-RR.

Através da pesquisa por qPCR para os 4 sorotipos da dengue, foi possível a identificação do DENV1 em 1 amostra sanguínea e o DENV2 em 5 amostras, referente ao ano de 2020. Já no ano de 2021 foi identificado o DENV1 em duas amostras clínicas, mostrando a circulação destes 2 sorotipos no Estado de Roraima.

Foi detectado em 3 amostras clínicas, através do RT-PCR em tempo real, a presença do MAYV nos dois anos que compreende este estudo, indicando a circulação deste arbovírus no estado.

Apesar de não ter sido detectado nas amostras do estudo o CHIKV, OROV e ZIKV, tal fato não exclui a possibilidade da circulação dos mesmos, pois de acordo com a Vigilância em Saúde do estado foi confirmado casos de chikungunya e zika nos anos de 2020 e 2021. Quanto ao OROV, em 2013 estudo indicou a circulação deste arbovírus em Roraima, quando avaliou amostras 2012 com resultados negativos para dengue NS1.

O diagnóstico diferencial laboratorial das arboviroses se faz necessário, visto que os indivíduos acometidos por estes vírus apresentam sintomas muito semelhantes tornando o diagnóstico clínico ineficaz.

O Monitoramento das arboviroses nos municípios, principalmente do interior do estado, precisam ser intensificados visto os baixos números de casos suspeitos notificados em relação a capital Boa Vista.

Fica comprovado a necessidade do monitoramento e diagnóstico laboratorial para as outras arboviroses, além da dengue, pois para ser ter uma Vigilância em Saúde eficiente é indispensável que se tenha o conhecimento dos arbovírus circulantes no Estado de Roraima.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, P. O. A. et al. **Dengue in the northernmost part of Brazil from 1999 to 2011: characterization of circulating DENV strains.** *Dengue Bulletin*, v. 36, p. 50-63, 2012.

ANDRADE, G. **RT-PCR ou sorológico? Entenda as diferenças entre os testes para a COVID-19.** Portal Faculdade de Medicina de Minas Gerais – UFGM, publicado em 23 de junho de 2020. Disponível em: <<https://www.medicina.ufmg.br/rt-pcr-ou-sorologico-entenda-as-diferencas-entre-os-testes-para-a-covid-19/#:~:text=O%20que%20%C3%A9%20o%20RT,rea%C3%A7%C3%A3o%20em%20cadeia%20da%20polimerase>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BADARÓ, R. M. D. **Ação multi-setorial no enfrentamento de epidemias.** Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. Salvador: UFBA/ITS-CIMATEC, 2016. Disponível em: <<https://www.cosemsba.org.br/wp-content/uploads/2016/06/2.-APRESENTA%C3%87%C3%83O-PLATAFORMA-DE-CONTROLE-DO-Aedes-aegypti.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BENEDETTI, M. S. G. (Org.). Secretaria de Saúde do Estado de Roraima. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima 2019.** Boa Vista: SESAU, 2020, p. 62 – 66. Disponível em: <https://saude.rr.gov.br/cgvs/phocadownloadpap/relatorio_epidemiologico/relatorioanualdeepidemiologia_2019.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2021.

BORGHETTI, I. A. **External Control Viral-Like Particle Construction for Detection of Emergent Arboviruses by Real-Time Reverse-Transcription PCR.** *Bio Med Research International*, v. 2019, p. 4, 2019.

BRASIL. Ministério da saúde: **casos de Mayaro no brasil** [internet]. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre de Chikungunya.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre de Chikungunya.** Brasília: Ministério da Saúde, 2015. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico nº 12: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika)**, Semanas Epidemiológicas 1 a 11, 2020. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <<http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-12-2020.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

CALLAHAN, J D et al. **Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus**. Journal of clinical microbiology vol. 39,11 (2001): 4119-24. doi:10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001

CARNEIRO, I.; CARNEIRO, C.O. **Plano de Contingência Para o Enfrentamento de Epidemia de Dengue no Município de Boa Vista – Roraima**. Superintendente da Vigilância em Saúde/SMSA, Boa Vista – Roraima, 2011.

CARVALHO, L. R. D. **Análise da presença do Zika vírus em pacientes sintomáticos e sem sintomas clínicos para arboviroses**. 2019.

CAVALCANTE, G. A. et. al. **Perfil epidemiológico dos casos notificados de gestantes com Zika vírus no estado do Maranhão**. 2022. Revista Eletrônica Acervo Saúde, 15(10), e11002-e11002.

CHAU, K. B. et al. **A comparative evaluation of dengue diagnostic tests based on single-acute serum samples for laboratory confirmation of dengue**. Malaysian J Pathol, v. 33, n. 1, p. 13-20, 2011.

CORMAN, V. et al. **Assay optimization for molecular detection of Zika virus**. Bull World Health Organ. 94(12):880-892. doi:10.2471/BLT.16.175950, 2016.

COSTA, V. G. **Acurácia diagnóstica de dois kits comerciais ELISA para captura do antígeno NS1 no diagnóstico precoce do vírus dengue: uma meta-análise**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2015.

CRUZ, J. S. **Avaliação de testes diagnósticos para a identificação da infecção pelo vírus da dengue em pacientes com síndrome febril aguda**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia em saúde e Medicina Investigativa). Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

DULGHEROFF, A. C. B. et al. **Zika Vírus: O Estado da Arte**. Revista Científica do ITPAC, v. 9, n. 2, p. 34– 41, 2015. Disponível em: <http://www.itpac.br/arquivos/Revista/78/Artigo_4.pdf>.

ELLIOTT, R. M.; BLAKQORI, G. **Molecular Biology of orthobunyaviruses**. Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology. Norfolk: Caister Academic Press, p. 1-39, 2011.

FAYE, O. et al. **Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes**. Virology journal vol. 10 311. 22 Oct. 2013, doi:10.1186/1743-422X-10-311

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

FIOCRUZ. Instituto Oswaldo Cruz. **Técnica permite diagnóstico molecular da dengue**. Portal Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, publicado em 15/09/2008. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/tecnica-permite-diagnostico-molecular-da-dengue#:~:text=Capacita%C3%A7%C3%A3o%20permite%20diagn%C3%B3stico%20molecular%20da%20dengue&text=O%20diagn%C3%B3stico%20da%20dengue%20pela,m%C3%A9todo%20cl%C3%A1ssico%20de%20isolamento%20viral.>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

FORATTINI, O. P. Entomoiogica medica. **Culicini**: Culex, Aedes y Psorophora. São Paulo: Edit. Univ, v. 2, p. 506, 1965.

GONÇALVES, C. W. B. et al. **Análise de aspectos epidemiológicos da dengue no estado do tocantins**. Revista de Patologia do Tocantins, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 7, 2020. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/7125>. Acesso em: 30 dez. 2022.

GURUKUMAR, K. R. et al. **Developed of real time PCR for detection and quantitation of Dengue Viruses**. Virology Journal, v. 6, n.10, p.1-8, 2009.

GUTIERREZ, B. et al. **Evolutionary dynamics of Oropouche virus in South America**. Journal of Virology, v. 94, p. 17, 2020.

GUZMÁN, M. G. et al. **Dengue**: a continuing global threat. Nature Reviews Microbiology, London, p. S7-S16, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades** – panorama. Rio de janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/panorama>>. Acesso em: 02 set. 2020.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades** – panorama. Rio de Janeiro: IBGE, 2021. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rr/panorama>>. Acesso em: 27 dez. 2021.

JOHNSON, B. W et al. **Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay**. Journal of clinical microbiology vol. 43,10 (2005): 4977-83. doi:10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005.

KENDALL C. et al. **Structural and Phenotypic Analysis of Chikungunya Virus RNA Replication Elements**. Nucleic Acids Res, 47(17):9296-9312, 2019.

KUNO, G., et al. **Genomic sequencing of deer tick virus and phylogeny of powassan-related viruses of North America**. The American journal of tropical medicine and hygiene 65.5: 671-676, 2001.

KUNO, G.; CHANG, G.-JJ. **Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses**. Archives of virology, v. 152, n. 4, p. 687-696, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. **Chikungunya Virus in US travelers Returning from India, 2006**. Emerging Infectious Diseases Journal, Atlanta, v. 13, n. 5, p. 764-767, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. **Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction**. Journal of Clinical Microbiology, v. 30, n. 3, p. 545-551, 1992.

LICÍNIO, C. O. L.; AYRES, F. M. **The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online]. 2021, v. 57 [Acessado 26 Dezembro 2022], e2882021. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210048>>. Epub 29 Nov 2021. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210048>.

LIMA-CAMARA T. N. **Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil**. Revista Saúde Pública, p 50-36, 2016.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**. Revista Pan-Amazônica de Saúde (RPAS), Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014.

MARINHO, R. S. S. et al. **Detection of coinfection with Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 in serum samples of patients in State of Tocantins, Brazil**. Journal of Infection and Public Health, São Paulo, v. 13, p. 274-279, 2020.

MARQUES, R. M. C. et al. **Prevalence of Arboviruses in Northeast Capitals**. Research, Society and Development, [S. l.], v. 11, n. 14, p. e303111436280, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i14.36280. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/36280>. Acesso em: 28 dec. 2022.

MELO, K. F. L. de. et al. **O vírus oropouche e o seu contexto epidemiológico na América Latina no período de 2009 a 2019**. Revista Eletrônica Acervo Saúde, n. 57, p. e4138-e4138, 2020.

MENESES, C. A. R. **Identificação de arbovírus dengue, mayaro e oropouche em amostras com dengue negativo pela técnica NS1 no estado de Roraima, no ano de 2012**. Boa Vista, p. 63, 2013.

MUNÕZ, M.; NAVARRO, J. C. **Virus Mayaro: um arbovírus reemergente em Venezuela y Latino América**. Biomédica, Bogotá, v. 32, n. 2, 2012.

NAVECA, F. G. et al. **Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112, p. 510-513, 2017.

NAVECA, F. G. et al. **Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon**. PLoS neglected tropical diseases, v. 13, n. 3, p. e0007065, 2019.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Viroses transmitidas por artrópodos y roedores**. Informes técnicos, n. 719, p. 126, 1985.

OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. **Global alert: Zika virus-an emerging arbovirus**. The Eurasian journal of medicine, v. 49, n. 2, p. 142, 2017.

PEREIRA, N. C. **Soroprevalência do vírus Mayaro em Manaus e em Coari**. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

RIBEIRO, L. V. et al. **Casos de dengue ocorridos no estado de Roraima entre os anos de 2017 a 2021**. Ciências da Saúde: desafios e potencialidades em pesquisa, v. 1, n. 1, p. 82-88, 2022.

RORAIMA. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima. 2014**. Secretaria de Saúde do Estado de Roraima.

RORAIMA. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima. 2015.** Secretaria de Saúde do Estado de Roraima.

RORAIMA. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima. 2020.** Secretaria de Saúde do Estado de Roraima.

RORAIMA. **Relatório Anual de Epidemiologia de Roraima. 2021.** Secretaria de Saúde do Estado de Roraima.

ROTHMAN, A. L. **Dengue: defining protective versus pathologic immunity.** The Journal of Clinical Investigation, Ann Arbor, v. 113, p. 946-951, 2004.

SAKKAS, H. et al. **Oropouche Fever: A Review.** Viruses, v. 175, p. 1-16, 2018.

SERRA, O. P. et al. **Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 111, p. 20-29, 2016.

SESAU–CGVS **Secretaria de Estado da Saúde de Roraima.** 2018. Coordenadoria geral de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância Epidemiológica.

SINANWEB - SINAN NET. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Ministério da Saúde. Saúde de A – Z,. Boa Vista: SINAN/DVE/CGVS/SESAU/RR, 2018. Disponível em: <<http://portalmis.saude.gov.br>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SINANWEB - SINAN NET. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação.** Ministério da Saúde. Notícias do mundo 2018. Boa Vista: O POVO, 2018. Disponível em: <<https://www.opovo.com.br>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SIGH, R. K. et al. **Zika virus—emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives—a comprehensive review.** Veterinary Quarterly, 36(3), 150-175. 2016.

SOUSA, A. R. V. **Avaliação sorológica e molecular de pacientes com quadro clínico de dengue símile atendidos no hospital das forças armadas. 2019.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2019.

SOUSA, L. et al. **Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients.** Journal of medical virology vol. 89,6 (2017): 1108-1111. doi:10.1002/jmv.24722

STRAUSS, A., & CORBIN, J. **Grounded theory methodology: An overview.** In N. K. Denzin & Y. S. Lincoln (Eds.), *Handbook of qualitative research* (pp. 273–285). Sage Publications, Inc. 1994.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. **Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil.** JBES: *Jornal Brasileiro de Economia da Saúde*, v. 9, n. 3, 2017.

VASCONCELOS, B. H. *et al.* **Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 5, p. 800-806, 2011.

VIEIRA, B. D. P. **Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações.** v. 18, 2011. Disponível em: <<http://www.imt.usp.br/wp-content/uploads/proto/protocolos/aula1.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

VIRALZONE. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org>. Acessado em: 28/12/2022, 2016.

WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D.H.; BIRLEY, M. H. **Deforestation: Effects on Vector-Borne Disease.** *Parasitology*, 106 Suppl: S55-75, 1993.

WAGGONER, J. J. *et al.* **Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine.** *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* vol. 98 (2018): 1-4. doi:10.1016/j.jcv.2017.11.006

WEAVER, S. C. *et al.* **Chikungunya virus and prospects for a vaccine.** *Expert Rev Vaccines*, 11(9):1087-101, 2012.

WENHAM, C.; LOTTA, G.; PIMENTA, D. **Mosquitos e Covid-19 são uma bomba-relógio para a América Latina.** *LSE Latin America and Caribbean Blog*, 2020.

APÊNDICE A – PRODUTO TÉCNICO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CÁSSIO ALENCAR MEIRA

RELATÓRIO TÉCNICO CONCLUSIVO

**IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA, MAYARO
E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA
DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021**

**BOA VISTA, RR
2022**

Organização: Universidade Federal de Roraima (UFRR)

Discente: Cássio Alencar Meira

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Granja

Dissertação vinculada: IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA, MAYARO E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021

Data da defesa: 25 de janeiro 2023

Setor beneficiado com a pesquisa realizada no âmbito do programa de mestrado:

Secretaria de Estado da Saúde de Roraima – SESAU/RR e Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde – CGVS

Classificação: Produção de alta relevância e teor inovativo

✓ **Conexão com a pesquisa**

Projeto de pesquisa: O produto é resultado do estudo realizado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PROCISA), vinculado à Universidade Federal de Roraima.

Linha de pesquisa vinculada à produção: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica.

Descrição da finalidade: Este relatório é o produto final da dissertação apresentada à UFRR e tem como finalidade proporcionar a gestão em saúde em Agravos de notificação compulsória para arboviroses do estado de Roraima, especificamente a Secretaria de Estado da Saúde de Roraima e Coordenadoria Geral de vigilância em Saúde, com informações acerca das arboviroses circulantes no estado de Roraima nos anos de 2020 e 2021.

Aplicabilidade – descrição da abrangência realizada:

Descrição da replicabilidade: o produto apresentado pode ser considerado de acessível aplicação e as recomendações proposta neste relatório poderão subsidiar ações dos mais diversos atores envolvidos no combate e controle dos arbovírus, bem como o aprimoramento e ampliação nos diagnósticos laboratoriais das arboviroses.

APRESENTAÇÃO

Este relatório foi produzido como resultado da dissertação de mestrado intitulada “IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, ZIKA, MAYARO E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021”. A pesquisa teve como principal objetivo determinar os arbovírus circulantes no estado de Roraima (Dengue, Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche), a partir de amostras de pacientes com diagnóstico negativo para dengue através da técnica de captura do antígeno NS1, realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima, no período de 2020 e 2021.

O estudo justifica-se devido ao grande fator de risco para a saúde da população frente ao alto índice de infestação dos mosquitos *Culex* e *Aedes aegypti* para a emergência e reemergência dos arbovírus, associados aos altos números de casos febris notificados para dengue cujo obtiveram resultados laboratoriais “não reagente” através da testagem para capturado do antígeno NS1 pelo método de *Enzyme Linked immunosorbent assay* (ELISA). A circulação dos vírus das febres de chikungunya, zika, mayaro e outros arbovírus, cujo sintomas são semelhantes aos da dengue, torna o diagnóstico clínico ineficaz sendo necessário o emprego de diagnóstico laboratorial por meio de detecção de anticorpos ou vírus quando coletados amostras sanguíneas no período oportuno da doença.

Diante disto, através do estudo clínico e epidemiológico, associado à aplicação de técnicas moleculares para dengue, Chikungunya, zika, mayaro e Oropouche, em amostras negativas para dengue NS1 realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), este estudo visa contribuir para o monitoramento dos arbovírus circulantes no estado de Roraima trazendo valiosas informações para uma vigilância epidemiológica eficiente.

METODOLOGIA

O relatório consiste na descrição e análise dos resultados obtidos na pesquisa de mestrado supracitada. Para o estudo foi utilizado como recurso pesquisas em literaturas, testes moleculares e informações dos pacientes pertinentes à pesquisa constantes nas fichas de notificações que acompanham as amostras no momento do seu recebimento pelo LACEN-RR, nos anos de 2020 e 2021.

Foram selecionadas um total de 132 amostras clínicas, n=59 dos anos de 2020 e n=73 de 2022, de pacientes que foram atendidos em todas as unidades de saúde do estado de Roraima e com suspeita de infecções por arboviroses através da avaliação clínica dos sinais e sintomas característicos do agravo, e que obtiveram resultados negativos para Dengue através da testagem do antígeno NS1 pelo método de ELISA realizados pelo LACEN-RR.

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Vírus Emergentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (LEVE-IB-UNICAMP) em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima (LaBMol-UFRR), tendo ainda como instituição coparticipante o Laboratório de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), onde foram realizadas as etapas de testagens moleculares das amostras que compõe o estudo.

As amostras clínicas que compõe a referida pesquisa, passaram pelo processo de extração do RNA viral, quantificação do material genético da extração, transcrição reversa para obtenção do cDNA e testagem para chikungunya, oropouche, mayaro, zika e dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

De maneira sucinta a metodologia aplicada à dissertação pode ser apresentada da seguinte forma: tratou-se de estudo de natureza experimental de aspectos epidemiológicos, apoiado em bases documentais onde foi aplicado o modelo de estudo transversal em seu desenvolvimento, com o emprego de testes moleculares de RT-PCR em tempo real.

RESULTADOS

Para o recorte temporal dos anos de 2020 e 2021, foram avaliadas 1.064 fichas de notificações recebidas pelo LACEN-RR, que após observados dias de sintomas, coleta em tempo oportuno, critérios clínicos e epidemiológicos, e volume suficiente de amostra necessário para a realização de todas as etapas experimental do estudo, obtivemos n=132 de amostras aptas para o experimento.

Após realização das testagens moleculares por qPCR para chikungunya, oropouche, mayaro, zika e dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e análise dos dados obtidos na pesquisa, tivemos os seguintes resultados:

Pesquisa do CHIKV, OROV e ZIKAV por RT-PCR em tempo real

Não foram detectadas a presença dos vírus da chikungunya, oropouche e zika, o que não reflete a inexistência das circulações dos mesmos, pois conforme os relatórios anuais de epidemiologia de Roraima dos anos de 2020 e 2021 constam casos confirmados de CHIKV e ZIKV. A viremia por ZIKV em amostras sanguíneas, além de baixa, persistem por um curto período de tempo nos humanos, sendo que em amostras de urina e sêmen podem persistir por 3 semanas ou até mesmo meses após o aparecimento dos primeiros sintomas (OZKURT E TANRIVERDI, 2017). Como alternativa para a diminuição dos casos falso-negativo no RT-PCR para ZIKV seria a utilização da técnica tanto na amostra sanguínea quanto na urina (CORMAN et al., 2016).

Em relação ao OROV, estudo realizado por Menezes (2013), além de detectar o vírus Oropouche em 13 amostras clínicas traz informações colhidas junto à Coordenação Geral de Vigilância em Saúde de Roraima referente a identificação do vírus OROV em amostras aleatórias dos anos de 2004 e 2005 e que tiveram resultado negativo para DENV, estudo esse realizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC).

Um importante fator a ser considerado é a quantidade de material genético insuficiente para que fosse detectada na amplificação e/ou degradação devido o transporte e os processos de descongelamento.

Pesquisa do MAYV POR RT-PCR em tempo real

As 132 amostras que obtiveram resultados negativo para NS1, também foram testadas para MAYV através da técnica do RT-PCR em tempo real, onde 3 amostras tiveram resultado positivo para o agente viral, sendo 1 amostra referente ao ano de 2020 e 2 do ano de 2021, correspondendo a 2% das amostras do estudo. Os pacientes que tiveram suas amostras testadas e que foram detectadas para Mayaro encontravam-se entre o 2º e o 5º dia do início dos sintomas;

Quanto a procedências das amostras positivas, 2 são provenientes das unidades de saúde do município de Boa Vista e 1 de Mucajaí, porém o paciente da amostra 46, mesmo sendo notificado e com coleta realizada na capital Boa Vista, reside no município do Cantá;

Quanto aos sintomas apresentados, além da febre e exantema, todos os 3 pacientes positivos para MAYV apresentaram como sintoma comum a mialgia, vômito e dor nas costas, seguido de cefaleia e náuseas. Fica possível observar que os sintomas apresentados pelos

pacientes acometidos pelo MAYV são similares as demais arboviroses como chikungunya, oropouche, zika e dengue, tornando difícil o diagnóstico somente pela clínica;

Pesquisa do DENV POR RT-PCR em tempo real

Das 132 amostras testadas através do RT-PCR em tempo real, proveniente de pacientes que obtiveram resultados negativos para Dengue realizadas através da técnica de ELISA utilizando o kit Panbio Dengue Early ELISA (ABBOTT), obtivemos nesta etapa do estudo positividade para DENV em 8 amostras, correspondendo 6% das amostras clínicas testadas.

Todas as amostras deste estudo foram testadas para os 4 sorotipos da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), onde 8 (6%) amostras positivas para Dengue, sendo 3 positivas para o sorotipo 1 (2%) e 5 (4%) para o sorotipo 2, não tendo nenhum resultado positivo para os sorotipos 3 e 4.

As amostras que obtiveram resultados positivo nesta pesquisa, são provenientes do município de Boa Vista e Cantá, tendo nacionalidade brasileira, de ambos sexos e idade entre 6 meses e 43 anos. Apesar do paciente da amostra 16 ter sido atendido e notificado em uma unidade de saúde do município de Boa vista, o mesmo reside no município do Cantá.

Das 8 amostras positivas para DENV, 4 estão na faixa etária de economicamente ativos os tornando os mais susceptíveis, pois são indivíduos que tendem a se locomover com mais frequência por serem provedores da sua família e incumbidas de responsabilidade, impactando até mesmo o impulsionamento da economia do estado (GONÇALVES, 2020).

Além da febre e exantema que foram critérios de inclusão, todos os pacientes positivos para DENV apresentaram como sintoma comum a mialgia. Quando avaliamos os sintomas de acordo com o sorotipo, temos no DENV1 a cefaleia e dor nas costas com 67%, enquanto no DENV2 80% dos pacientes tiveram náuseas seguido artrite e artralgia intensa. Todos os sintomas apresentados são condizentes com as sintomatologias descritos em literaturas, onde apenas o diagnóstico clínico se torna ineficaz por terem os sintomas semelhantes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no estudo, o RT-PCR se mostrou mais sensível em relação a técnica do ELISA para capturado antígeno NS1 (kit Panbio Dengue Early ELISA

– ABBOTT), pois foi detectado o DENV em 8 (6%) amostras falso-negativo dos anos de 2020 e 2021 provenientes do LACEN-RR.

Através da pesquisa por qPCR para os 4 sorotipos da dengue, foi possível a identificação do DENV1 em 1 amostra sanguínea e o DENV2 em 5 amostras, referente ao ano de 2020. Já no ano de 2021 foi identificado o DENV1 em duas amostras clínicas, mostrando a circulação destes 2 sorotipos no Estado de Roraima.

Foi detectado em 3 amostras clínicas, através do RT-PCR em tempo real, a presença do MAYV nos dois anos que compreende este estudo, indicando a circulação deste arbovírus no estado.

Apesar de não ter sido detectado nas amostras do estudo o CHIKV, OROV e ZIKV, tal fato não exclui a possibilidade da circulação dos mesmos, pois de acordo com a Vigilância em Saúde do estado foi confirmado casos de chikungunya e zika nos anos de 2020 e 2021. Quanto ao OROV, em 2013 estudo indicou a circulação deste arbovírus em Roraima, quando avaliou amostras 2012 com resultados negativos para dengue NS1.

O diagnóstico diferencial laboratorial das arboviroses se faz necessário, visto que os indivíduos acometidos por estes vírus apresentam sintomas muito semelhantes tornando o diagnóstico clínico ineficaz.

O Monitoramento das arboviroses nos municípios, principalmente do interior do estado, precisam ser intensificados visto os baixos números de casos suspeitos notificados em relação a capital Boa Vista.

Fica comprovado a necessidade do monitoramento e diagnóstico laboratorial para as outras arboviroses, além da dengue, pois para ser ter uma Vigilância em Saúde eficiente é indispensável que se tenha o conhecimento dos arbovírus circulantes no Estado de Roraima.

RECOMENDAÇÕES

A partir dos dados obtidos, organizados e analisados, foi possível identificar a necessidade de melhorias quanto ao diagnóstico das arboviroses através de técnicas laboratoriais mais sensíveis e que contemplem a pesquisa de outras arboviroses além da dengue, zika e Chikungunya. Sabe-se que o conhecimento, monitoramento e combate dos arbovírus, através do diagnóstico laboratorial e dados epidemiológicos são importantes ferramentas no campo da vigilância epidemiológica e fundamentais para o planejamento e tomadas de ações para a prevenção e controle desses agravos.

Dessa forma, propõe-se:

- Implementação e ampliação do diagnóstico diferencial das arboviroses, visto que os indivíduos acometidos por estes vírus apresentam sintomas muito semelhantes tornando o diagnóstico clínico ineficaz.
- Utilização do RT-PCR em tempo real para detecção das arboviroses, uma vez que esta técnica molecular se mostrou mais sensíveis e específicos em relação ao ELISA, visando a diminuição de resultados falso-negativo;
- Além das pesquisas para dengue, zika e Chikungunya, se faz necessária a implementação de forma definitiva e contínua do diagnóstico molecular para os arbovírus Mayaro e Oropouche, uma vez comprovada a circulação destes arbovírus no estado de Roraima e inexistência de registros dos mesmos nos relatórios anuais de epidemiologia do estado de Roraima;
- Utilização da técnica de RT-PCR em tempo real para detecção do ZIKV tanto em amostras sanguíneas quanto em urina objetivando a diminuição dos casos falso-positivo;
- Intensificação do monitoramento das arboviroses nos municípios, principalmente do interior do estado, visto os baixos números de casos suspeitos notificados em relação a capital Boa Vista.

Por fim, cabe ressaltar a importância de se identificar e isolar os agentes etiológicos circulantes no estado de Roraima através do monitoramento e diagnóstico laboratorial das arboviroses com a utilização de técnicas mais sensíveis e específicas, pois tais agravos apresentam um grande risco à saúde da população sendo um grande fator morbidade e com impactos socioeconômicos na população de Roraima.

REFERÊNCIAS

- CALLAHAN, J D et al. **Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus.** Journal of clinical microbiology vol. 39,11 (2001): 4119-24. doi:10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001
- CORMAN, V. et al. **Assay optimization for molecular detection of Zika virus.** Bull World Health Organ. 2016;94(12):880-892. doi:10.2471/BLT.16.175950
- GONÇALVES, C. W. B. et al. **Análise de aspectos epidemiológicos da dengue no estado do tocantins.** Revista de Patologia do Tocantins, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 7, 2020. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/patologia/article/view/7125>. Acesso em: 30 dez. 2022.
- MENESES, C. A. R. Identificação de arbovírus dengue, mayaro e oropoucheem amostras com dengue negativo pela técnica NS1 no estado de Roraima, no ano de 2012. Boa Vista, p. 63, 2013.
- OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. **Global alert: Zika virus-an emerging arbovirus.** The Eurasian journal of medicine, v. 49, n. 2, p. 142, 2017.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, MAYARO E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021.

Pesquisador: CASSIO ALENCAR MEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52738521.9.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.173.182

Apresentação do Projeto:

Introdução: As arboviroses são doenças causadas por um grupo de vírus (arbovírus) transmitidos na natureza através de artrópodes hematófagos. Produzem viremia nos hospedeiros vertebrados susceptíveis, onde uma vez infectado é capaz de transmitir para outros indivíduos no momento do repasto sanguíneo (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). São zoonoses mantidas em ambientes silvestres principalmente na Amazônia, onde o clima tropical facilita a sua manutenção. Mas com os problemas como: desmatamentos, garimpos eminações, abertura de estradas e construções de barragem, propiciam o ambiente ideal para a manutenção e nos surtos das arboviroses na região Norte (MENESES, 2013). A situação epidemiológica da dengue no país permanece sendo caracterizada pelo número crescente de casos graves e óbitos nos últimos dez anos, além dos novos desafios impostos pela circulação dos vírus das febres de chikungunya, zika, mayaro, ouropouche e outros arbovírus, cujo sintomas são semelhantes com os da dengue (BRASIL, 2016). A circulação desses arbovírus torna difícil o diagnóstico clínico somente pelos sintomas por serem muito semelhantes, sendo necessário o diagnóstico laboratorial por meio de detecção de anticorpos ou vírus quando coletados amostras sanguíneas no período oportuno. O estado de Roraima é o mais setentrional da Federação tendo uma área aproximada de 223.644,527 km² fazendo fronteira com o estado do Amazonas e Pará, e os países Guiana e Venezuela, este último, inclusive vive uma crise humanitária e migratória (IBGE, 2019), sendo a fronteira com estes dois

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.

Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000

UF: RR **Município:** BOA VISTA

Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 5.173.182

países uma região endêmica para as arboviroses com um enorme fluxo de pessoas que se deslocam para estes outros países para turismo, comércio e garimpos. O ELISA é a metodologia sorológica mais utilizada no diagnóstico confirmatório das arboviroses no estado de Roraima, fazendo a detecção do antígeno NS1 quando coletado até o quinto dia do início do aparecimento dos sintomas, chikungunya IgM e zika IgM do sexto ao décimo quarto dia dos primeiros sintomas (CRUZ, 2014). O diagnóstico das Arboviroses é realizado, mediante a notificação compulsória, pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima (LACEN-RR), tendo como um dos principais agravos a Dengue, Zika e Chikungunya, onde no ano de 2019 do total de 484 amostras obtivemos 185 resultados reagentes, 9 indeterminados e 290 negativos (BRASIL, 2020). O método mais comum de diagnósticos destes agravos é através da sorologia (coletada até quinto dia do início dos sintomas) por método de Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA) para testagem de Dengue NS1 em pacientes que apresentaram síndromes febris no período agudo da doença e outros sintomas relacionados a eles (CRUZ, 2014). Nesse sentido, estudo preliminar realizado em 2013, através da pesquisa de "IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, MAYARO E OROPOUCHE EM AMOSTRAS COM DENGUE NEGATIVO PELA TÉCNICA DE NS1 NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2012." mostrou pela técnica de RT-PCR que, em 150 amostras negativas para NS1 obteve como resultado 33 amostras positivas para dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DEV-4), além de 7 positivas para Mayaro e 13 para Oropouche, revelando a importância do conhecimento da circulação de outros arbovírus no Estado de Roraima (MENESES, 2013). Devido ao crescente número de casos de síndromes febris e não diagnosticados, onde no relatório anual de epidemiologia do ano de 2018 foram notificados 12.224 casos de dengue, chikungunya e zika no ano de 2017, o presente projeto tem como objetivo contribuir com o monitoramento dos arbovírus circulantes no Estado de Roraima e que representam riscos à saúde da população, colaborando com a valiosa informação para uma vigilância epidemiológica eficiente (BRASIL, 2020). Buscando responder ao objetivo, o projeto encontra-se dividido em três eixos principais: (1) Estudos clínicos e epidemiológicos das arboviroses; (2) Estudos moleculares em amostras negativas para dengue NS1 obtidas pelo método de ELISA; (3) Detecção de outras arboviroses por técnicas moleculares. Hipótese: A inferioridade da técnica de ELISA, quanto à sensibilidade e especificidade, leva ao alto número de resultados negativos dos casos de síndrome febril que foram notificados para dengue pela detecção do antígeno NS1. Portanto é de suma importância o uso de técnicas moleculares, como o RT-PCR, visando a diminuição dos resultados falsos negativos, bem como a necessidade de se realizar diagnóstico laboratorial diferencial para detecção de outras arboviroses emergentes no estado de Roraima, que por apresentarem sintomas muito semelhantes aos da dengue tornam

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 5.173.182

difíceis os diagnósticos apenas pela clínica apresentada.

Metodologia: TIPO DE ESTUDO: Trata-se de uma pesquisa experimental de aspectos epidemiológicos, sendo aplicado o modelo de estudo transversal para o seu desenvolvimento. Serão utilizados como recursos pesquisas em literaturas, testes moleculares e informações dos pacientes pertinentes à pesquisa constantes nas fichas de notificações. **LOCAL DO ESTUDO:** A parte experimental será desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular (LaBMol) tendo o LACEN-RR como instituição coparticipante. **POPULAÇÃO DO ESTUDO:** Serão utilizadas para o estudo amostras clínicas (n= até 150) de pacientes que serão selecionadas entre as amostras do ano de 2020 e 2021, provenientes de todas unidades de saúde do estado de Roraima e que obtiveram resultados “não reagente” para detecção do antígeno NS1 realizadas pelo LACEN-RR. As amostras clínicas serão de pacientes com diagnósticos presuntivo de dengue que estejam na fase aguda da doença (coletados do primeiro ao quinto dia do início dos sintomas) que apresentaram, além da febre, outros sintomas típicos da dengue: calafrio, mialgia, cefaleia, artralgia, dor retroorbital, diarreia, vômito e exantema e, através da verificação das fichas de notificação compulsória que acompanha na entrada da amostra no LACEN-RR. **COLETAS DE DADOS:** Para este estudo, serão coletados e utilizados os dados que compõe as fichas de notificação, como: Sexo, idade, município de procedência da amostra, data dos primeiros sintomas, data da coleta da amostra, dias de sintomas, sintomas. Todos os dados coletados e que serão divulgados, são apenas os de importância para o estudo do agente viral e epidemiológico, onde serão utilizados dados secundários presente nas fichas de notificações e que integram o Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN), sendo mantido o anonimato dos participantes. **MÉTODO EXPERIMENTAL:** Primeiramente as amostras passarão por processo de extração do RNA viral e posteriormente serão submetidas à transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real para dengue em etapa única que será capaz de identificar quaisquer sorotipos virais da dengue, sem identificação de sorotipo específico, através do seu genoma utilizando a técnica desenvolvida por Gurukumar et al. (2009), onde será possível comparar a sensibilidade entre esta técnica com a de ELISA para antígeno NS1 uma vez que é relatada em literatura a sensibilidade superior da técnica de biologia molecular em relação ao ELISA (CHAU et al., 2011). Posteriormente serão utilizados primers e a técnica de RT-PCR convencional, conforme descrito por Lanciotti et al., (1992), nas amostras falsos negativas para dengue realizadas pelo ensaio do antígeno NS1 para a identificação dos sorotipos de dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), pois esta técnica tem sido a mais adotada como padrão ouro. As amostras que obtiverem resultados negativos na etapa de RT-PCR em tempo real para

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 5.173.182

dengue serão testados para Chikungunya por esta mesma técnica (LANCIOTTI et al., 2007). A última etapa será a testagem para Mayaro/Oropouche simultaneamente em etapa única por RT-PCR em tempo real com transcrição reversa multiplexada nas amostras que obtiveram resultados negativos para Chikungunya, será utilizado para esta etapa o protocolo desenvolvido por Naveca et al. (2017). ANÁLISE DE DADOS: Após finalização do estudo, os dados serão tabulados em planilha para fins estatísticos, analisados e divulgados através da elaboração de um artigo científico que conterá os dados moleculares obtidos na pesquisa. PRODUÇÃO TÉCNICA: Com os dados obtidos através desta pesquisa, será produzido e disponibilizado para a população um material educativo com as principais semelhanças e diferenças clínicas entre as arboviroses, além de um relatório técnico conclusivo com dados moleculares e epidemiológico das possíveis arboviroses emergentes e seus principais sintomas a ser entregue na Secretaria de Estado da Saúde e Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde do Estado de Roraima. Metodologia de Análise de Dados: Após finalização do estudo, os dados serão tabulados em planilha do software Excel (versão 2101, Microsoft) e será utilizado o programa estatístico Epi Info para fins estatísticos, para posterior divulgação através da elaboração de um artigo científico que conterá os dados moleculares obtidos na pesquisa.

Critério de Inclusão: Serão utilizadas amostras biológicas de pacientes que foram notificados para dengue e que obtiveram resultado negativo para captura de antígeno NS1 pelo método de ELISA; Amostras coletadas na fase aguda da doença (coletados do primeiro ao quinto dia do início do aparecimento dos sintomas); Amostras de pacientes que apresentaram sintomas característicos da síndrome febril, como: febre, calafrio, mialgia, cefaleia, artralgia, dor retroorbital, diarreia, vômito e exantema;- Amostras que contenham volume de 200 microlitros ou mais.

Critério de Exclusão: Amostras com volume inferior a 200 microlitros; Amostras de pacientes que forma notificados e testados para outras arboviroses além da dengue NS1.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar os arbovírus circulantes no estado de Roraima (Dengue, Chikungunya, Mayaro e Oropouche), a partir de amostras de pacientes com diagnóstico negativo para dengue através da técnica de captura do antígeno NS1, realizadas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima, no período de 2020 e 2021.

Objetivos Secundários: Avaliar a sensibilidade da técnica de ELISA para a captura do Antígeno NS1 para identificar dengue, usando como referência a técnica de RTPCR em tempo real; Identificar os sorotipos de dengue nas amostras que apresentarem falso negativo no NS1; Analisar nas amostras negativas para dengue a presença dos arbovírus Chikungunya e Mayaro/Oropouche por qPCR em

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 5.173.182

etapa única; Produzir material educativo para a população sobre as arboviroses emergentes e seus principais sintomas. Elaborar relatório técnico conclusivo a ser entregue na Secretaria de Estado da Saúde e Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde do estado de Roraima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O presente estudo não oferecerá riscos aos participantes pois não haverá contato com os mesmos e suas amostras já estão coletadas e armazenadas no LACEN-RR, uma vez que as mesmas já foram analisadas para a detecção do Antígeno NS1 pelo método de ELISA. Os dados que serão analisados e divulgados por esta pesquisa (sexo, idade, município de procedência da amostra, data dos primeiros sintomas, data da coleta da amostra, dias de sintomas, sintomas) são dados secundários e encontram-se dispostos nas fichas de notificação integrando o banco de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação, de todo o modo será mantido o anonimato dos participantes cujo terão suas amostras analisadas por este estudo.

Benefícios: Este projeto de pesquisa mostra-se de grande relevância, pois visa demonstrar a importância da utilização de técnicas moleculares mais sensíveis e específicas em relação ao ELISA, além de se investigar outras arboviroses através do diagnóstico diferencial laboratorial, pois os sintomas apresentados são muito semelhantes aos da dengue, sendo difícil o diagnóstico apenas pela clínica. Com o produto técnico que será produzido a partir dos dados obtidos por este estudo, pretende-se informar a população acerca das arboviroses circulantes no estado de Roraima e que são menos conhecidas, como também as principais semelhantes e diferenças entre os sintomas apresentados. Através da elaboração de um relatório técnico conclusivo a ser disponibilizado para à Secretaria de Estado da Saúde e Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde do Estado de Roraima, os possibilitarão realizar a elaboração de estratégias e tomada de ações, em tempo oportuno, para o combate e enfrentamento das arboviroses emergentes ou reemergentes no estado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um Projeto de Mestrado apresentado ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Roraima (UFRR), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Vigilância Epidemiológica e Indicadores de Agravos à Saúde na Fronteira Pan-Amazônica. Sob orientação da profa. Dra. Fabiana Granja que retorna ao CEP/UFRR, na segunda versão para sanar a seguinte pendência: PENDÊNCIA ÚNICA: Anexar o na Plataforma Brasil um documento que informe que o LACEN-RR é cadastrado como Biobanco junto à CONEP, uma vez que somente as instituições cadastradas podem armazenar e ceder amostras biológicas para pesquisa.

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 5.173.182

Em relação a pendência única, o pesquisador não encaminhou a carta resposta ao CEP/UFRR. Entretanto, o pesquisador anexou um arquivo contendo resposta de um e-mail datado de 29 de novembro de 2021, respondida por Daiane Franciele Francisco Sertorio em nome da CONEP BIOBANCOS, em que consta a seguinte redação: Os LACENs de todos os estados têm a função precípua de coleta, análise e armazenamento de amostras para fins de vigilância epidemiológica, não estão, portanto, obrigados a constituir um biobanco para fins de pesquisa, como definido pela Res. CNS 441/2011 e Portaria MS 2.201/2011. Os materiais biológicos oriundos dos LACENs, remanescentes das atividades de diagnóstico, podem ser utilizados em projetos de pesquisas aprovados pelo Sistema CEP/Conep, após consentimento dos pacientes (TCLE específico do projeto de pesquisa) ou dispensa de consentimento, se aplicável. Nesse sentido, para atendimento de sua solicitação e devido esclarecimento ao Comitê de Ética em Pesquisa, recomendamos que estas informações sejam transformadas em arquivo PDF e anexadas na submissão de resposta ao CEP da UFRR na Plataforma Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória constam no projeto de pesquisa, com exceção do TCLE. Justificativa: Para este estudo, serão coletados e utilizados os dados que compõem as fichas de notificação, como: Sexo, idade, município de procedência da amostra, data dos primeiros sintomas, data da coleta da amostra, dias de sintomas, sintomas. Todos os dados coletados e que serão divulgados, são apenas os de importância para o estudo do agente viral e epidemiológico, onde serão utilizados dados secundários presente nas fichas de notificações e que integram o Sistema de Informações de Agravos de Notificações (SINAN). De todo modo será mantido o anonimato dos participantes que tiverem suas amostras utilizadas neste estudo e não haverá contato com os mesmos, mas apenas com o material biológico para o qual se buscou a dengue como agravo. Ressalta-se que a busca ativa dos envolvidos nesta pesquisa se torna difícil, por vezes impossível, pois os mesmos foram atendidos e tiveram amostras coletadas nas diversas unidades de saúde da rede básica e especializada do estado de Roraima, além da inexistência de riscos aos participantes, pois as amostras encontram-se devidamente coletadas e armazenadas na soroteca do LACEN-RR. Diante de todo o exposto, se propõe a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido junto ao CoEP-UFRR.

Recomendações:

Vide conclusões ou pendências e lista de inadequações.

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR**



Continuação do Parecer: 5.173.182

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, recomenda-se que o protocolo seja aprovado, uma vez que não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério 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_1835445.pdf	29/11/2021 19:29:35		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	RESPOSTA_CONEP_BIOBANCO.pdf	29/11/2021 19:29:07	CASSIO ALENCAR MEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSA_TCLE.pdf	06/10/2021 19:18:08	CASSIO ALENCAR MEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_DE_ANUENCIA_LACEN.pdf	06/10/2021 19:16:59	CASSIO ALENCAR MEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	06/10/2021 19:16:13	CASSIO ALENCAR MEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	06/10/2021 19:15:15	CASSIO ALENCAR MEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOA VISTA, 17 de Dezembro de 2021

Assinado por:
Bianca Jorge Sequeira Costa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.310-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA LACEN-RR

CARTA DE ANUÊNCIA PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA

À: **Direção Geral do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Roraima**

Eu, CÁSSIO ALENCAR MEIRA, venho pelo presente, solicitar autorização para realizar a pesquisa parte da pesquisa intitulada "IDENTIFICAÇÃO DE ARBOVÍRUS DENGUE, CHIKUNGUNYA, MAYARO E OROPOUCHE EM AMOSTRAS NEGATIVAS PARA DENGUE PELA TÉCNICA DE NSI NO ESTADO DE RORAIMA, NO ANO DE 2020 E 2021." a ser realizada neste LACEN-RR, sob minha responsabilidade.

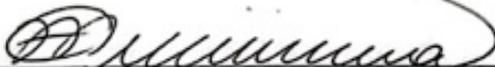
Assumo a responsabilidade de fazer cumprir os termos da Resolução nº 466/CNS/MS, de 12 de dezembro de 2012, e demais resoluções complementares à mesma, viabilizando a produção de dados da pesquisa citada, para que se cumpram os objetivos do projeto apresentado.

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, a coleta de dados deste projeto será iniciada, atendendo todas as solicitações administrativas desta direção.

Contando com a autorização desta instituição, coloco-me a disposição para qualquer esclarecimento.

Pesquisador principal: Cássio Alencar Meira. Tel.: (95) 98111-5711. E-mail: cassioa.meira@hotmail.com

Pesquisador assistente: Prof. Dra. Fabiana Granja. Tel.: (95) 98804-0174. E-mail: fabiana.granja@ufr.br


 Cássio Alencar Meira
 Pesquisador Responsável

Concordamos com a solicitação

Não concordamos com a solicitação


 Marconi Aragão Gomes
 Diretor Geral do Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima
 SESAUCGVS/LACEN-RR

Boa Vista, 21/10/21

ANEXO C – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA



Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes -
LEVE
Prof. Dr. José Luiz Proença Módena Instituto de
Biologia
Universidade Estadual de Campinas



EXTRAÇÃO DE RNA Soro, urina, lágrima, LCR, fluidos corporais em geral

9 Materiais

QUICK-RNA™ Viral Kit (cat no R1034)
Etanol 100% Merk
Falcon de 15 mL
Eppendorfs de 1,5 mL RNase free
Centrifuga
Descarte
Ponteiras

10 Notas

Na primeira utilização do Kit:

- Adicione beta-mercaptoetanol (fornecido pelo usuário) ao Viral RNA Buffer para uma diluição final de 0,5% (v/v) ou seja, 250µl por 50ml ou 500µl por 100ml.
- Adicione 24ml de etanol 100% (26ml a 95% de etanol) ao concentrado de tampão Viral Wash de 48ml.

11 Procedimento

1. Adicionar 100µl da solução “DNA/RNA Shield” (2x concentrada) em 100µl da amostra clínica. Homogenizar no vórtex por 15 segundos.
2. Adicionar 400µl da solução “Viral RNA Buffer” para cada 200µl da mistura anterior. Homogenizar no vórtex por 15 segundos.
3. Transferir a mistura para o interior da coluna “Zymo-Spin IC Column”, já previamente colocada em um tubo de coleta “Collection tube” e centrifugue a velocidade máxima (10000-160000xg) por 2 minutos.
4. Transfira a coluna para um novo tubo de coleta “Collection tube”. Descarte o tudo de coleta antigo.
5. Adicione 500µl do tampão de lavagem “Viral Wash Buffer” no interior da coluna, centrifugue por 30 segundos a velocidade máxima (10000-160000xg) e descarte o que passou (flow-through). Repita o passo 5.



6. Adicione 500µl de etanol 100% no interior da coluna e centrifugue por 1 minuto a velocidade máxima (10000-160000xg) para garantir que o tampão de lavagem foi completamente removido da coluna.
7. Cuidadosamente transfira a coluna para um tubo de 1,5ml livre de nucleases, como a RNase (não disponível no Kit).
8. Adicione 15µl de água livre de DNA/RNase “DNase/RNase-Free Water” diretamente no centro da coluna. Incube por 1 minuto e centrifugue a velocidade máxima (10000-160000xg) por 30 segundo.
9. O RNA eluído pode ser utilizado imediatamente na reação de RT-PCR ou deve ser congelado imediatamente a -80°C.

ANEXO D – PROTOCOLO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

appliedbiosystems

QUICK REFERENCE

High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit

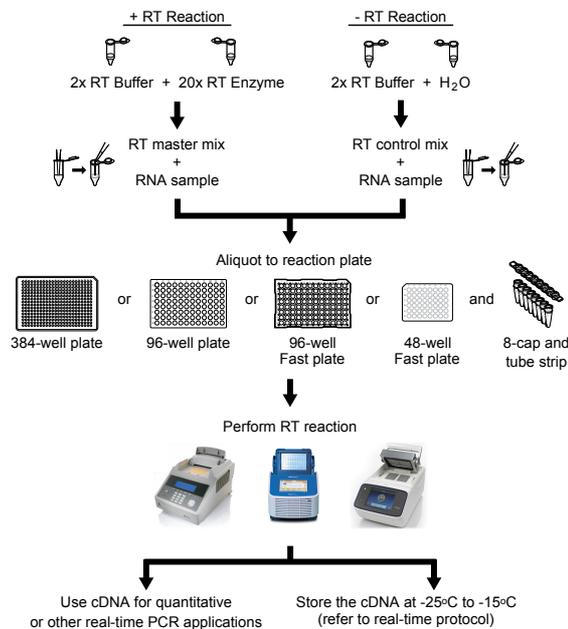
Catalog Numbers 4387406 (50 reactions), 4388950 (500 reactions)

Pub. No. MAN0017979 Rev. A

Note: For safety and biohazard guidelines, see the “Safety” appendix in the *High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit User Guide* (Pub. No. 4387951). Read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Workflow

To synthesize single-stranded cDNA from total RNA using the Applied Biosystems™ High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit:



Guidelines for RNA

Use up to 2 µg of total RNA per 20-µL reaction.

For optimal performance of the kit, we recommend that you use RNA that is:

- Free of inhibitors of reverse transcription and PCR
- Dissolved in TE Buffer or PCR-compatible buffer
- Free of RNase activity

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Methods

- 1 Prepare the RT reaction mix** Prepare the RT reaction mix (per 20- μ L reaction) using the kit components before preparing the reaction plate:
1. Allow the kit components to thaw on ice.
 2. Calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.

Component	Volume per reaction	
	+RT reaction	-RT reaction
2X RT Buffer Mix	10.0 μ L	10.0 μ L
20X RT Enzyme Mix	1.0 μ L	—
RNA sample	up to 9 μ L	up to 9 μ L
Nuclease-free H ₂ O	Q.S. ^[1] to 20 μ L	Q.S. ^[1] to 20 μ L
Total per reaction	20.0 μ L	20.0 μ L

^[1] Quantity Sufficient

Note: Prepare the RT reaction mix on ice. Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.

- 2 Prepare the reverse transcription reactions**
- a. Prepare the reaction plate or tubes:
 1. Aliquot 20 μ L of RT reaction mix into each well or tube.
 2. Seal the plates or tubes.
 3. Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
 - b. Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler or Applied Biosystems™ Real-Time PCR system.

- 3 Perform reverse transcription**
- a. Using one of the required thermal cyclers listed in the *High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit User Guide* (Pub. No. 4387951), program the thermal cycling conditions:

IMPORTANT! These conditions are optimized for use with the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit.

Setting	Step 1	Step 2	Step 3
Temperature	37°C	95°C	4°C
Time	60 minutes	5 minutes	∞

- b. Set the reaction volume to 20 μ L.
 - c. Load the reactions into the thermal cycler or Real-Time PCR system.
 - d. Start the reverse transcription run.
- 4 Store the cDNA**
- a. Store cDNA RT plates or tubes prepared using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit for short-term or long-term storage:
 - Short-term (up to 24 hours before use)—Store at 2–8°C.
 - Long-term—Store at –25°C to –15°C.
 - b. If required, briefly centrifuge the archive plates or tubes before storing to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.

Limited product warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.thermofisher.com/support.



Manufacturer: Thermo Fisher Scientific Baltics UAB | V.A. Graiciuno 8, LT-02241 | Vilnius, Lithuania

The information in this guide is subject to change without notice.

DISCLAIMER: TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. AND/OR ITS AFFILIATE(S) WILL NOT BE LIABLE FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE, OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING YOUR USE OF IT.

Revision history: Pub. No. MAN0017979

Revision	Date	Description
A	28 June 2018	Baseline for this revision history

Important Licensing Information: These products may be covered by one or more Limited Use Label Licenses. By use of these products, you accept the terms and conditions of all applicable Limited Use Label Licenses.

Corporate entity: Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1 800 955 6288

©2018 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

ANEXO E – PROTOCOLO DE RT-PCR EM TEMPO REAL

PB20.24



PCRBIO SYSTEMS
simplifying research

qPCRBIO Probe Mix Separate-ROX



Product description:

Combined with the latest advancements in polymerase technology and advanced buffer chemistry qPCRBIO Probe Mix offers market leading performance with minimal optimisation.

PCR Biosystems real-time PCR probe mixes have been designed for use on a wide range of probe technologies including TaqMan®, Scorpions® and molecular beacon probes.

qPCRBIO Probe Mix uses antibody-mediated hot start technology that prevents the formation of primer-dimers to improve reaction sensitivity and specificity.

High-throughput screening has resulted in a buffer system that allows efficient amplification from GC-rich and AT-rich templates, under fast and standard cycling conditions.

Pack size	2x qPCRBIO Probe Mix No-ROX	50µM ROX Additive
100 reactions	1 x 1mL	1 x 200µL
500 reactions	5 x 1mL	1 x 200µL
2000 reactions	20 x 1mL	4 x 200µL
5000 reactions	1 x 50mL bottle	2 x 520µL
5000 reactions	50 x 1mL tubes	2 x 520µL

Shipping and storage

On arrival the kit should be stored between -30°C and -15°C. Avoid prolonged exposure to light. If stored correctly the kit will retain full activity for 12 months. The kit can be stored at 4°C for 1 month.

Limitations of product use

The product may be used only for in vitro research purposes.

Technical support

Help and support is available on our website at <https://pcrbio.com/resources/> including answers to frequently asked technical questions. For technical support and troubleshooting you can submit a technical enquiry online, or alternatively email technical@pcrbio.com with the following information:

- Amplicon size
- Reaction setup
- Cycling conditions
- Screen grabs of amplification traces and melting profile

50µM ROX Additive

Instrument compatibility: Different real-time PCR instruments require different levels of ROX passive reference. Generally, modern instruments do not require passive reference but include the option to use it for normalisation. Please check our qPCR BIO Selection Tool to determine which ROX concentration your instrument requires (<https://pcrbio.com/resources/qpcr-selection-tool/>).

ROX additive protocol: The 50µM ROX Additive supplied is formulated to be added directly to the 1ml tube of 2x qPCR BIO master mix supplied. Once the ROX is added, the reagent may be used straight away or stored between -30°C and -15°C for future use. Please use the following 2 charts to add the correct amount of ROX for your instrument. Vortex thoroughly after ROX addition.

ROX for Hi-ROX instruments:

Reagent	Hi-ROX instruments	Final concentration	Reaction concentration
2x qPCR BIO Probe Mix No-ROX	1.0mL	2x	1x
50µM ROX Additive	20.0µL	1µM	500nM

ROX for Lo-ROX instruments:

Reagent	Lo-ROX instruments	Final concentration	Reaction concentration
2x qPCR BIO Probe Mix No-ROX	1.0mL	2x	1x
50µM ROX Additive	2.0µL	100nM	50nM

Important considerations

Primer design: For efficient amplification under fast cycling conditions we recommend amplicon lengths between 80bp and 200bp. With all manufacturers master mixes the shorter the amplicon length the faster the reaction can be cycled. Amplicon lengths should not exceed 400bp. Primers should have a predicted melting temperature of around 60°C, using default Primer 3 settings (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>). For TaqMan® probes choose probe close to 5' primer, avoid terminal guanosine residues.

Reaction setup

- Before starting, briefly vortex 2x qPCR BIO Probe Mix.
- Prepare a master mix based on the following table:

Reagent	20µL reaction	Final concentration	Notes
2x qPCR BIO Probe Mix	10µL	1x	
Forward primer (10µM)	0.8µL	400nM	See above for optimal primer design
Reverse primer (10µM)	0.8µL	400nM	
Probe (10µM)	0.4µL	200nM	
Template DNA	<100ng cDNA, <1µg genomic	Variable	See above for template considerations
PCR grade dH ₂ O	Up to 20µL final volume		

- Program the instrument using the following conditions, acquiring data on the appropriate channel:

Cycles	Temperature	Time	Notes
1	95°C	2min	Polymerase activation, 2 minutes for cDNA and 3 minutes for genomic
40	95°C 60°C to 65°C	5 seconds 20-30 seconds	Denaturation Anneal/Extension, do not exceed 30 seconds, do not use temperatures below 60°C
Melt analysis	Refer to instrument instructions		Optional melt profile analysis, available for hybridisation probes only