



Centro Universitário de Brasília – UniCEUB
Faculdade de Ciências da Educação e Saúde – FACES
Trabalho de Conclusão de Curso
Biomedicina

Principais métodos de detecção de viroses transmitidas por *Aedes* no Brasil

THAÍS DE MIRANDA GROCHOCKI

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito a obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina no
Centro Universitário de Brasília
(UniCEUB) sob a orientação do professor
Paulo Roberto Martins Queiroz.

Brasília – 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre conduzindo a minha vida, por me dar saúde, proporcionar oportunidades e ajudar nas conquistas dos meus sonhos.

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Roberto Martins Queiroz, pela sua dedicação e amizade, empenho durante toda a minha trajetória da formação acadêmica na Biologia e na Biomedicina, dando-me apoio e incentivo, quando necessários.

Agradeço, também, aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e me deram toda a base de princípios para que hoje eu seja, quem sou. Graças ao apoio deles percebi o caminho certo a seguir e eles estiveram sempre ao meu lado me incentivando a caminhar em frente, ultrapassando assim os obstáculos que surgiram ao decorrer dos anos.

Agradeço, especialmente, à minha amada vó Durcília e a minha tia Dayse, presentes de Deus, por incentivar meus estudos e minha avó por considerá-la a minha amiga de todas as horas que sempre orou por mim, me incentivou a seguir na área da Biomedicina me dando todo o suporte necessário e mesmo quando a distância se fez presente, manteve seu apoio me dando forças e servindo de exemplo de vida.

Agradeço ao Joshua, por me apoiar e me ajudar nos momentos em que precisei durante meu curso de Biomedicina, me incentivando a prosseguir durante meu intercâmbio nos USA.

Principais métodos de detecção de viroses transmitidas por *Aedes* no Brasil

Thaís de Miranda Grochocki ¹;
Paulo Roberto Martins Queiroz ²;

Resumo

Os Arbovírus, que pertencem à família dos flavivírus, são vírus transmitidos por artrópodes e transmitem o vírus para os seres humanos através da picada de artrópodes hematófagos. Dentre os principais, o que vem se destacando no Brasil e no mundo é o *Aedes aegypti*, considerado nos dias atuais como o mais importante vetor de doenças que tem a habilidade de se adaptar às condições do meio ambiente nas áreas urbanas. O *Aedes aegypti* é o transmissor dos vírus da febre amarela, dengue e chikungunya e o *Aedes stegomyia* transmissor do zika vírus. O controle do mosquito *Aedes* spp. e o diagnóstico de forma mais rápida possível das doenças causadas é essencial para o tratamento das pessoas infectadas e a melhoria da Saúde Pública no Brasil. Ensaio moleculares são considerados rápidos e sensitivos para o diagnóstico de infecções por doenças como febre amarela, dengue, zika e chikungunya. O método de detecção molecular mais utilizado atualmente é o RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa), pois identifica o sorotipo viral de forma rápida e detecta pequenas quantidades do vírus quando há algum problema com a amostra, e o PCR em tempo real por ser rápido, de medição quantitativa, com baixo grau de contaminação e de possibilidade de padronização. Devido à reação cruzada que vem ocorrendo entre os anticorpos dos flavivirus para os testes do vírus da febre amarela, dengue e zika tem-se utilizado como diagnóstico para febre amarela o isolamento do vírus, teste de neutralização e redução de plaquetas como confirmação da doença. Com o aumento do número de casos das doenças dengue, zika e chikungunya tem sido importante o rápido diagnóstico através de métodos moleculares de forma a disponibilizar o melhor tratamento para o paciente evitando assim sua morte.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, febre amarela, dengue, zika, chikungunya, diagnóstico, PCR, virologia, métodos moleculares.

Main methods of detection of *Aedes* transmitted viruses in Brazil

Abstract

The Arboviruses, belonging to the flavivirus family are viruses transmitted by hematophagous arthropods. They transmit the virus to humans through their bite. Among the main viruses that have been highlighting in Brazil and worldwide are the *Aedes aegypti* considered today as the most important strain of diseases that has the ability to adapt to the conditions of the environment in urban areas. *Aedes aegypti* is the transmitter of the yellow fever, dengue and chikungunya virus. *Aedes stegomyia* transmitter of the zika virus. The control of the *Aedes* spp. and the quickest possible diagnosis of the diseases caused is essential for the treatment of infected persons and the improvement of public health in Brazil. Molecular assays are considered fast and sensitive for the diagnosis of infections due to diseases such as yellow fever, dengue, zika and chikungunya. The most commonly used molecular detection method is RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), because it identifies the viral serotype quickly and detects small amounts of the virus when there is a problem with the sample. Also Real Time PCR because it is rapid, it has quantitative measurement, with low degree of contamination and possibility of standardization. Due to the cross-reactivity that has been occurring between the flavivirus antibodies for the yellow fever, dengue and zika virus tests, virus isolation, neutralization and platelet reduction tests have been used as a diagnosis for yellow fever as confirmation of disease. With the increase in the number of cases of dengue, zika and chikungunya diseases, rapid diagnosis through molecular methods has been important in order to provide the best treatment and outcome for the patient.

Keywords: *Aedes aegypti*, yellow fever, dengue, zika, chikungunya, diagnosis, PCR, virology, molecular methods.

1. INTRODUÇÃO

O Ministério da Saúde criou o Sistema de Vigilância Ambiental em Saúde no ano de 2002 como um conjunto de ações de forma a proporcionar o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que afetam a saúde humana. Este sistema foi criado com a finalidade de recomendar e adotar medidas de prevenção e controle dos fatores de risco e das doenças ou agravos relacionados à variável ambiental como, por exemplo, febre amarela, dengue, zika, chikungunya, dentre outros (PIGNATTI, 2004).

São considerados como agentes de doenças emergentes no Brasil os Arbovírus, que pertencem à família dos flavivírus (MARCONDES; XIMENES, 2016). Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes e transmitem o vírus para os seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos (LOPES *et al.*, 2014). Dentre os principais arbovírus tem-se *Aedes aegypti* que pode transmitir o vírus da febre amarela, dengue e chikungunya e *Ae. stegomyia* que pode transmitir o zika vírus. O diagnóstico das infecções por flavivírus tem sido feito por meio do isolamento do vírus ou teste sorológico (BALEOTTI *et al.*, 2003; BATISTA *et al.*, 2011; MARCONDES; XIMENES, 2016).

O mosquito *Ae. aegypti* é considerado nos dias atuais como o mais importante vetor de doenças que tem a habilidade de se adaptar às condições do meio ambiente nas áreas urbanas (NUNES *et al.*, 2016). Os vetores e parasitas de mosquitos que causam doenças como, por exemplo, o vetor *Aedes*, tem apresentado evolução da resistência contra pesticidas usados para o seu controle nas últimas décadas (AYAAD *et al.*, 2015). A dengue é considerada um dos mais significantes problemas de saúde pública do mundo, levando cerca de 2,5 bilhões de pessoas ao risco de uma infecção por meio do seu vírus, principalmente em países tropicais nos quais possuem um clima mais favorável para a proliferação desse mosquito (NUNES *et al.*, 2016).

A introdução do mosquito do gênero *Aedes* surgiu há muitos anos atrás, na época da escravidão, trazendo consigo a febre amarela que atingiu milhares de pessoas, levando diversas à morte. As alterações climáticas que ocorrem cada vez mais no planeta foi o que mais colaborou para a dispersão de vetores (*Aedes*) e suas doenças. A introdução de novas doenças infecciosas em um país tem ocorrido pelas viagens internacionais que permitem à movimentação de doentes ou pessoas infectadas em período de incubação em

um novo território espalhando assim a doença (WEAVER, 2014; VASCONCELOS, 2015).

No ano de 2014, ano da copa do mundo, o Brasil foi o país sede, e com a copa do mundo de futebol vieram duas doenças para o país, o vírus Chikungunya e o vírus Zika, originalmente vindos da África e Ásia (TIZZOT, 2016). O clima tropical do Brasil é propício para *Aedes*, transmissor da febre amarela, dengue, chikungunya e zika. Por essa razão é importante o controle do mosquito *Aedes* spp. e, principalmente, o diagnóstico de forma mais rápida possível das doenças que ele causa para que as pessoas contaminadas saibam qual é o agente causador da doença e o tratamento indicado e, também, para que haja controle da saúde pública no Brasil (VASCONCELOS, 2015).

O vírus da dengue é um arbovírus membro da família Flaviviridae, do gênero *Flavivirus*, sendo composto por 4 sorotipos: dengue 1, 2, 3 e 4. A dengue pode causar severos sintomas parecidos com a gripe e às vezes complicações letais como a dengue hemorrágica e a síndrome do choque. O principal mosquito transmissor do vírus da dengue é *Ae. aegypti* (WU *et al.*, 2010).

Segundo Musso e colaboradores (2015) o vírus da Zika é um arbovírus da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus*. O vírus da zika foi encontrado pela primeira vez em 1947 na Uganda. Casos humanos foram reportados na Ásia e África em 1960, demonstrando assim que o vírus da Zika existe há pelo menos 56 anos no mundo, sendo relatado no Brasil somente a partir do ano de 2015. Os sintomas mais comuns que ocorrem na zika são: erupções na pele (brotoejas e manchas), febre, artralgia, mialgia, astenia e conjuntivite. Geralmente os pacientes relatam sintomas moderados, sendo também relatados os casos nos quais há infecções assintomáticas pelo vírus da Zika.

CHIKV é um vírus composto por ácido ribonucleico (RNA) que pertence à família Togaviridae do gênero *Alphavirus*, sendo dividido em dois grupos de transmissão, um selvagem (*Ae. albopictus*) e um da Ásia urbana (*Ae. Aegypti*). Sua primeira descrição foi feita no ano de 1950 na Tanzânia, sendo assim um vírus que está presente há mais de 50 anos no mundo (DONALISIO; FREITAS, 2015), estando presente no Brasil a partir de setembro de 2014 (AGUIAR, 2014). Os sintomas causados pelo vírus Chikungunya são: febre associada com dores articulares severas e debilitantes, dor de cabeça e mialgia. Sua sintomatologia é muito parecida com o da dengue, diferenciando em relação às poliartrites que aparecem na Chikungunya e que geralmente melhora após 10 dias, porém pode durar por meses depois da febre. Manifestações neurológicas (como encefalite, mielite), pele com bolhas e miocardite podem agravar os casos de Chikungunya, principalmente em

crianças e idosos. Replicações virais no *Ae. albopictus* e, também, no *Ae. aegypti* aumentam a extensão geográfica das regiões que possuem a circulação do vírus. No Brasil há um risco de acontecer um ciclo enzoótico do vírus Chikungunya pelos mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* impossibilitando a erradicação da doença no país (WEAVER, 2014).

Ensaio moleculares são rápidos e sensitivos para o diagnóstico de infecções por doenças como febre amarela, dengue, zika e chikungunya. O diagnóstico que tem sido usado para essas doenças é feito por meio da reação de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; ZANLUCA *et al.*, 2015) e o PCR em tempo real (LANCIOTTI *et al.*, 2008). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem trazido vários benefícios e desenvolvimentos científicos e dentre eles está o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (NOVAIS; ALVES, 2004). A PCR em tempo real possui muitas vantagens comparado aos outros métodos pois ele é rápido, de medição quantitativa, com baixo grau de contaminação e de possibilidade de padronização (FAYE *et al.*, 2013). A RT-PCR identifica o sorotipo viral de forma rápida, por isso sendo tão usado para o diagnóstico de febre amarela, dengue, zika e chikungunya. Essa técnica se destaca por detectar pequenas quantidades do vírus quando há algum problema com a amostra (PRADO, 2015).

Os cuidados em relação às doenças emergentes incluem a prevenção e o diagnóstico rápido da doença por meio da detecção rápida e segura do agente patogênico. Segundo Cavalcanti e colaboradores (2008) os métodos de diagnóstico mais rápidos ajudam na vigilância epidemiológica de forma que as doenças infecciosas são eficientemente controladas ao serem identificadas precocemente, evitando maiores consequências para a saúde pública da população afetada. Devido a importância da identificação correta do melhor diagnóstico para se tratar as doenças transmitidas pelo *Aedes spp*, foi escolhido esse tema para descrever as principais e melhores técnicas na detecção e confirmação dos vírus causadores da febre amarela, dengue, zika e chikungunya.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi descrever as principais técnicas utilizadas na detecção de doenças transmitidas pelo mosquito *Aedes spp*.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi baseado em uma revisão bibliográfica no formato narrativo, que segundo Rother (2007) é uma revisão ampla, apropriada para descrever e discutir o desenvolvimento de um determinado assunto, sob o ponto de vista teórico ou contextual. Para a pesquisa foram consultadas as bases bibliográficas Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), NCBI, Google Acadêmico e EBSCO, buscando artigos nos idiomas português e inglês publicados entre os anos 2003 a 2016, utilizando as palavras-chave: PCR, febre amarela, dengue, zika, chikungunya, virologia, métodos moleculares. Os indexadores foram usados tanto independentemente quanto em combinação. Ainda, os indexadores escolhidos foram usados em português e em inglês. Para a execução da pesquisa também foram obtidas dissertações, monografias e livros para a complementação da pesquisa.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Febre Amarela

O vírus da febre amarela pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, assim como, o vírus da dengue e da zika (KWALLAH *et al.*, 2013). O seu primeiro isolamento ocorreu em 1927 no país de Gana na África Ocidental. É transmitido pelos mosquitos *Aedes spp.*, causando os seguintes sintomas: dor de cabeça severa, dor nas costas e no corpo, febre elevada, náuseas e vômitos aparecendo tais sintomas após 3 a 6 dias de exposição ao vírus (BASILE *et al.*, 2015). A febre amarela tem sido diagnosticada no Brasil desde 1997 até os dias atuais, sendo os estados do Pará e Goiás os mais afetados por sua epidemia se estendendo para as regiões do Mato Grosso do Sul e por todo o Goiás (MONATH; VASCONCELOS, 2015).

3.1.1. Diagnóstico da Febre Amarela

Devido à reação cruzada que tem ocorrido entre os anticorpos dos flavivirus para os testes do vírus da febre amarela, dengue e zika por pertencerem à mesma família e gênero, tem-se utilizado como diagnóstico para febre amarela, o isolamento do vírus e teste de neutralização e redução de plaquetas como confirmação nos laboratórios de referência. Já os testes moleculares utilizados são RT-PCR e RT-qPCR (KWALLAH *et*

al., 2013). Com o teste de ELISA através da captura do IgM é possível detectar todas as amostras positivas para febre amarela sem que ocorra reação cruzada com o vírus da dengue (ADUNGO *et al.*, 2016).

Devido ao aumento da circulação do vírus da febre amarela, assim como, os surtos que ocorreram na América Latina, inclusive no Brasil, muitos países incluíram em seus programas de imunização a vacinação contra a febre amarela de forma que o índice de casos e incidências de febre amarela caiu drasticamente (MONTEIRO *et al.*, 2015).

O diagnóstico de doenças transmitidas pelos arbovírus tem sido um desafio para os pesquisadores pois existem barreiras que dificultam o diagnóstico como: pessoas infectadas que não possuem sintomatologia ou pessoas que apresentam sintomatologia similar à outras doenças, reação cruzada entre os testes sorológicos principalmente nas regiões endêmicas, dificuldade de acesso à laboratórios de referência. Um diagnóstico correto e feito de forma rápida é essencial para um tratamento de sucesso. O método RT-PCR e os diferentes testes que seguem a mesma linhagem podem ajudar no correto e rápido diagnóstico do paciente de forma que é um método com alta sensibilidade e especificidade, o que permite a identificação do vírus com pequenas amostras e detectar o tipo viral que o paciente contraiu (MORELI; COSTA, 2013). De acordo com a Figura 1 o PCR convencional é uma técnica que leva mais tempo para ser realizada durante seus ciclos do que o PCR em tempo real. O PCR convencional necessita de um par de oligonucleotídeos específicos que reconheçam o DNA de forma que seja amplificado, ocorrendo a desnaturação da dupla fita do DNA e depois seu anelamento e hibridização. Após o término dos ciclos faz-se necessário a ocorrência da eletroforese para leitura da banda (NASCIMENTO; SUAREZ, PINHAL, 2010). Já o PCR em tempo real é uma técnica de fluorescência em que todo o processo ocorre concomitantemente em uma única etapa permitindo a quantificação da expressão gênica, apresentando maior grau de sensibilidade do que o PCR convencional (NISHI *et al.*, 2009).

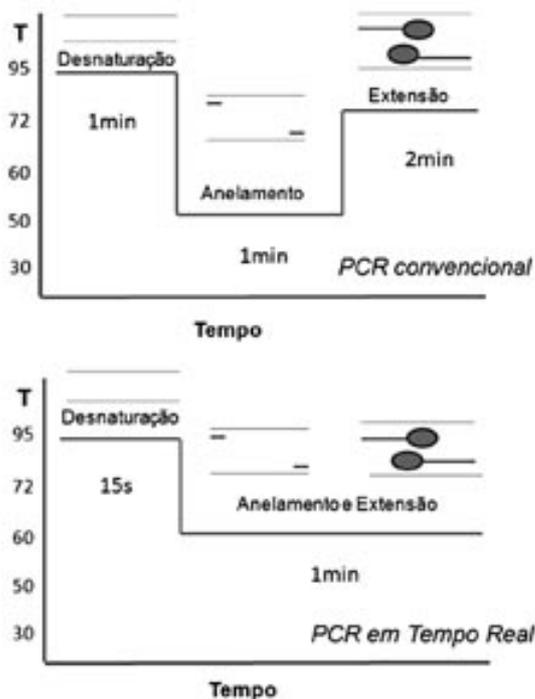


Figura 1: Demonstração da diferença entre a técnica PCR convencional e a técnica PCR em tempo real (NASCIMENTO; SUAREZ, PINHAL, 2010).

3.2. Epidemiologia da Dengue

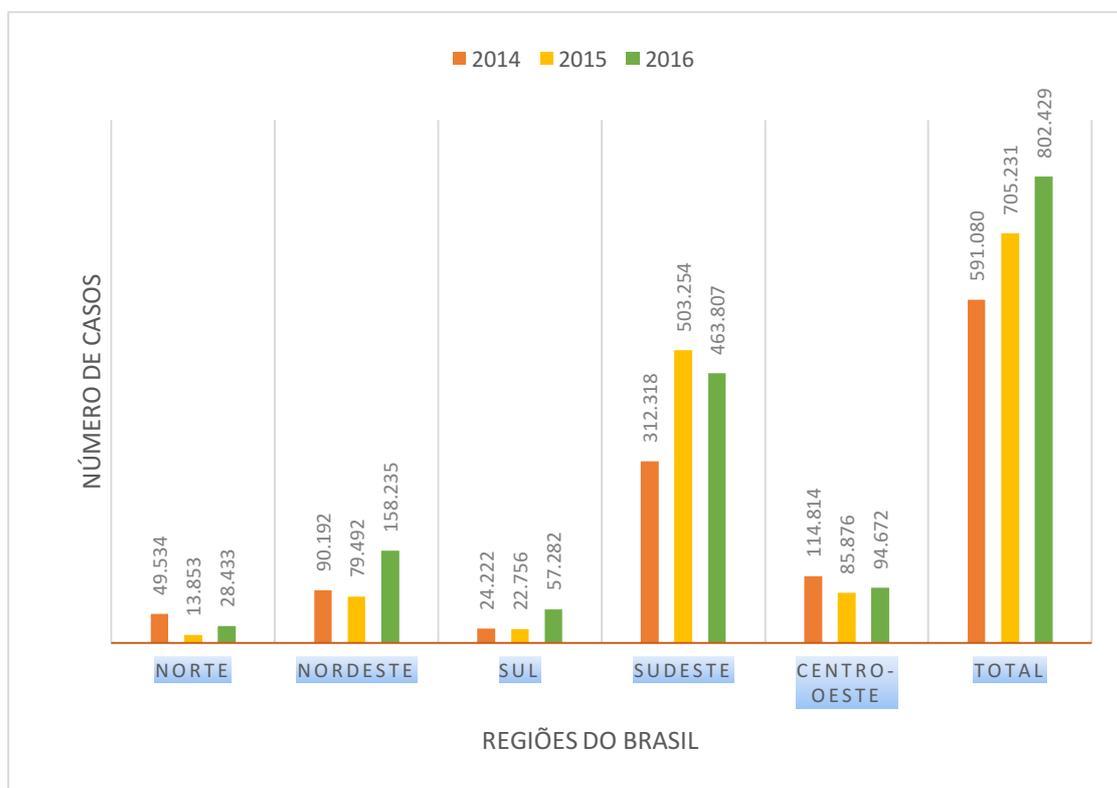
A dengue possui cinco sorotipos já identificados, porém só quatro desses vírus estão presentes no Brasil (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). Quando uma pessoa é infectada por um destes vírus a sua imunidade é vitalícia contra esse sorotipo ocorrendo uma proteção parcial e transitória contra a infecção subsequente dos outros vírus. Porém, caso o mesmo paciente contraia um dos outros sorotipos isso aumenta o risco de doença mais grave, podendo levar o paciente à uma febre hemorrágica (LUPI *et al.*, 2007).

De acordo com os dados encontrados à cerca da dengue até a Semana Epidemiológica 53 de 2014 (28/12/14 a 03/01/15), foram registrados 591.080 casos prováveis de dengue no Brasil, a distribuição do número de casos nas regiões foram as seguintes: Norte com 49.534 casos, Nordeste 90.192 casos, Sul com 24.222 casos, Sudeste 312.318 casos e Centro-Oeste com 114.814 casos. Analisando esses dados pode-se concluir que a região Sudeste dominou no ano de 2014 com o maior número provável de casos de dengue. Em segundo lugar a região Centro-Oeste, com uma diferença de 197.504 casos a menos que a região Sudeste. Já a região Sul obteve o menor índice de

casos prováveis de dengue, com uma diferença de 288.096 casos a menos que a região Sudeste e 90.592 a menos em relação à região Centro-Oeste (Figura 2).

Segundo o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde os dados epidemiológicos de dengue no Brasil registrados até a semana epidemiológica 13, no período de 03/01/2016 a 02/04/2016 foram de 802.429 casos. Destes foram registrados na região Sudeste 463.807 casos, equivalendo a 57,8% em relação ao total do país, sendo assim a região com mais casos registrados no período. Em segundo lugar em relação ao maior número de casos registrados está a região Nordeste com 158.235 casos, o que equivale a 19,7%, havendo uma diferença de 38,1% a menos entre a região Sudeste e Nordeste em relação ao número total de casos do país. Na região Centro-Oeste o número de casos foi de 94.672, equivalendo a 11,8%. Na região Sul, o número de casos foi de 57.282, equivalendo 7,1% ao total de casos, e na região Norte 28.433 casos registrados (3,5%), sendo a porcentagem mais baixa em relação ao total do país, com uma diferença de 54,3% a menos comparado ao número de casos registrados na região Sudeste (Figura 2).

Figura 2: Comparativo de casos prováveis de dengue entre 2014 a 2016, até a Semana Epidemiológica 13, por região.



Fonte: Brasil (2014;2015;2016) (atualizado em 05/01/2015- ano 2014; 04/01/16 – ano 2015; 04/04/16- ano 2016).

3.2.1. Principais técnicas de Diagnóstico da dengue

É extremamente relevante a correta identificação do diagnóstico da virose pois os sintomas de dengue, zika e chikungunya são parecidos e, por meio do diagnóstico, é possível distinguir qual doença o paciente está manifestando e também pelo resultado do diagnóstico escolher o melhor tratamento a ser ministrado em cada caso, evitando assim que o paciente vá à óbito. O diagnóstico também é um importante passo pois quanto mais rápido for diagnosticado qual vírus o paciente contraiu, mais rápido será seu tratamento, evitando assim uma dengue grave como a dengue hemorrágica ou levar o paciente à morte. De acordo com a literatura é evidente que o diagnóstico clínico de dengue não é específico e por essa razão requer um método de diagnóstico adicional para confirmar a probabilidade de ser um caso de dengue (CASTELLANOS; RUIZ, 2014).

Os casos de dengue podem ser confirmados pelo isolamento do vírus, antígeno ou detecção do RNA, soroconversão ou pela avaliação dos níveis de IgM ou IgG e através da detecção da proteína NS1 (padrão ouro para o Ministério da Saúde) (LAI *et al.*, 2007; OSORIO *et al.*, 2015).

Na metade dos anos 80 foi desenvolvida a reação em cadeia pela polimerase (PCR), assim como, sua automação revolucionando assim o diagnóstico molecular, vindo logo em seguida na década de 90 a descoberta do PCR em tempo real (BARRA *et al.*, 2015). A técnica de PCR tem uma vantagem em comparação às outras técnicas pois por meio dela é possível saber qual é o sorotipo da dengue que a pessoa está infectada (LAI *et al.*, 2007). A PCR em tempo real se tornou um avanço em relação aos métodos moleculares (Tabela 1) por facilitar na quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (LADEIRA *et al.*, 2011).

Arbovírus	Referência	Ano de Publicação	Método Molecular
Febre amarela	NUNES <i>et al.</i> (2011) MORENO <i>et al.</i> (2008)	2011	Semi-Nested RT-PCR, Green RT-qPCR, RT-qPCR
Dengue	DOS SANTOS <i>et al.</i> (2008)	2008	RT-PCR, Nested RT-PCR, RT-qPCR
Dengue	CALZAVARA- SILVA <i>et al.</i> (2009)	2009	RT-qPCR
Dengue	POLONI <i>et al.</i> (2010); SANTANA <i>et al.</i> (2010)	2010	RT-PCR, RT-PCR multiplex nested, RT-qPCR
Dengue	COSTA; FAÇANHA (2011)	2011	RT-PCR
Dengue	ROCCO <i>et al.</i> (2012)	2012	Nested RT-PCR, RT-qPCR

Tabela 1: Principais técnicas moleculares utilizadas na detecção da febre amarela (2011) e da dengue (2008-2012) segundo vários autores (modificado de MORELI; COSTA, 2013).

A técnica de PCR transcriptase reversa e a PCR em tempo real são rápidas, confiáveis, sensíveis e específicas para os sorotipos da dengue (CASTRO *et al.*, 2012). A PCR transcriptase reversa é uma técnica na qual ocorre uma reação de formação de DNA fita dupla a partir de RNA através de uma DNA polimerase RNA-dependente, produzindo DNA a partir de um molde de RNA (LADEIRA *et al.*, 2011).

A técnica de PCR em tempo real é uma técnica sensível e rápida para a detecção do vírus DEN e seus sorotipos, porém requer um equipamento especializado para que esse exame possa ser realizado sendo assim uma técnica de alto valor econômico. Além de ser mais sensível, tem a vantagem de ser capaz de processar um grande número de amostras de uma vez só e ser usado tanto quantitativamente quanto qualitativamente (CORDEIRO, 2012).

Foi criado um teste rápido da dengue, que é de baixo valor econômico ao se comparar com as técnicas moleculares como PCR, é também um teste como o próprio

nome diz bem rápido levando só 15 minutos para a detecção da presença do vírus. É um método de imunocromatografia que detecta qualitativamente o antígeno NS1, uma proteína não estrutural da dengue (FRY *et al.*, 2011). Este método não é tão sensível quanto a PCR, porém é um método rápido sendo importante na detecção rápida da dengue em um paciente que está apresentando sintomas, caso o resultado seja positivo este poderá começar o tratamento para dengue, caso dê negativo o médico poderá pedir outros exames para se descartar ou confirmar outras doenças, como Chikungunya e Zika.

A proteína viral não estrutural NS1 pode ser detectada com a técnica de ELISA (Técnica de Imunoensaio enzimático) em aproximadamente 60-80% dos testes mesmo depois de terem se passado 3 ou 4 dias da fase virótica. A detecção do NS1 pela técnica de ELISA é rápida e sensível como a PCR em tempo real porém não distingue os sorotipos da dengue, como ocorre com a RT-PCR (CORDEIRO, 2012). Quando a pessoa está no período agudo da infecção os níveis de anticorpos IgM não são detectáveis em 50% dos pacientes, sendo melhor detectado após o período virótico (a partir do sexto dia) ocorrendo um crescimento de aproximadamente 43% em relação ao período agudo, sendo 100% detectável após 10 dias da ocorrência da infecção podendo permanecer o anticorpo IgM positivo por até 3 meses. Em relação ao IgG, há detecção pela técnica de ELISA após 2 a 3 semanas dos sintomas clínicos terem aparecido sendo maior o pico do anticorpo IgG quando ocorre uma infecção secundária e sendo maior o anticorpo IgM quando ocorre uma infecção primária (CASTELLANOS; RUIZ, 2014).

3.3. Epidemiologia da Zika

Segundo Brasil (2016) o vírus mais recente que entrou no Brasil, foi o vírus Zika (ZIKV), ocorrendo a partir de abril de 2015, sendo notificados 91.387 casos prováveis de febre pelo vírus ZIKV até 04/04/16, dos quais 31.616 casos foram confirmados, indicando uma diferença significativa ao se comparar com o número de casos confirmados de dengue no mesmo período (6.159).

Ao analisar o número de casos prováveis de Zika no período de 2015/2016 na tabela 2, observa-se que a região Sudeste lidera com 35.505, ficando a região Nordeste em segundo lugar com 30.286 casos. Se compararmos com os dados da febre Chikungunya veremos que as regiões onde os vírus predominam são diferentes. A febre Chikungunya

tem uma predominância de casos na região Nordeste, já o Zika está predominantemente na região Sudeste. Contudo, em relação ao menor número de casos, a região Sul predomina nas duas doenças (Tabela 2 e 3 respectivamente).

A incidência de casos de Zika no Centro-Oeste foi de 113,4 permanecendo em primeiro lugar, com 53,5 foi encontrada a região Nordeste, e a menor incidência foi na região Sul. Ao analisar a Tabela 2 e comparar o número de casos prováveis com a incidência de casos, verifica-se que a região Sudeste domina o maior número de casos prováveis, porém a maior incidência é no Centro-Oeste, demonstrando assim que o número de casos novos nesta região está maior em comparação com o restante do país (Tabela 2).

Ao se comparar o número de óbitos entre Chikungunya e Zika, percebe-se que há uma diminuição do número de óbitos e a média de idade dos óbitos entre as duas se diferem. No caso de Chikungunya, foram totalizados 18 óbitos (2015/2016), já na Zika foram 3 óbitos (2015/2016). A idade média das pessoas que foram à óbito na febre Chikungunya foi de 75 anos (2015) e 62 anos (2016), já na Zika a média foi de 20 anos. Ressalta-se que o número de óbitos descritos não inclui os recém-nascidos, natimortos, abortamento ou feto que foram afetados pela microcefalia (BRASIL, 2016).

TABELA 2: Número de casos prováveis e Taxa de Incidência de febre pelo vírus Zika por região até a semana epidemiológica 13 do ano de 2015/2016

REGIÃO	CASOS (n) 2015/2016	INCIDÊNCIA/100 MIL HABITANTES
NORTE	6295	36
NORDESTE	30286	53,5
SUL	1797	6,1
SUDESTE	35505	41,4
CENTRO-OESTE	17504	113,4
TOTAL	91386	44,7

Fonte: Brasil (2016).

3.3.1. Principais técnicas de diagnóstico de Zika

O diagnóstico do vírus ZIKV tem sido um desafio por não haver um diagnóstico padrão-ouro. O diagnóstico que tem sido feito é por teste molecular como o RT-PCR em amostra de sangue antes de uma semana após o início dos sintomas (TIZZOT, 2016).

A reatividade dos anticorpos entre os Flavivírus limita o uso da sorologia, já a cultura do vírus não é realizada rotineiramente e não existem testes disponíveis que detectam os antígenos da Zika, o teste confiável durante o diagnóstico da fase aguda é a técnica molecular (MUSSO *et al.*, 2015). Já Bingham e colaboradores (2016) acreditam que o teste de urina é o melhor para diagnosticar o tipo de espécime na fase aguda da doença Zika. Na urina o vírus persiste por até 3 semanas tendo assim uma maior duração em relação à amostra de sangue (TIZZOT, 2016). De acordo com Gourinat *et al.* (2015) o melhor diagnóstico para Zika no momento é a detecção do RNA na urina possuindo maior duração do que a detecção no soro. O teste molecular tem sido o único método para diagnóstico já que o diagnóstico através da verificação do IgM e IgG específico são ausentes até o momento (GOURINAT *et al.*, 2015).

De acordo com Musso e colaboradores (2015) o uso da saliva melhora na detecção do RNA da Zika dentro da primeira semana dos sintomas, porém não deve ser uma técnica usada individualmente por haver casos em que a detecção é negativa para saliva e positiva na sorologia, por esta razão a melhor detecção do RNA da Zika se faz com o uso saliva e sangue do indivíduo infectado.

Segundo Honório e colaboradores (2015) a confirmação rápida do teste laboratorial é crucial para uma terapia adequada e início de respostas no controle do vírus ZIKV. É necessário o diagnóstico rápido da Zika pois em casos de pacientes grávidas é preciso o monitoramento durante a gravidez destas pacientes caso o teste seja confirmatório para Zika por haver a possibilidade de ocorrer microcefalia nos bebês provocadas pela dinâmica do vírus ZIKV (BINGHAM *et al.*, 2016).

O maior problema que vem sendo encontrado nos dias atuais é a reação cruzada entre febre amarela, dengue e zika por pertencerem ao mesmo gênero e família (JACOBSEN *et al.*, 2016). Em lugares como o Brasil no qual há transmissão da febre amarela, dengue e zika faz-se necessário ter um diagnóstico diferencial de forma que não ocorra reação cruzada (MATHEUS *et al.*, 2016).

3.3.2. Detecção molecular dos Flavivírus

A transmissão da doença se dá por meio é da picada de um mosquito infectado do gênero *Aedes*. O mosquito infectado injeta o vírus no hospedeiro de forma subcutânea atingindo muitas células do sistema imune (MARAMOROSCH; MURPHY, 2014).

Todos os vírus pertencentes à família dos flavivírus, como da febre amarela, dengue e zika possuem RNA fita simples em seu genoma com polaridade positiva, obtendo um total de 11.000 nucleotídeos. É composto por regiões 5' e 3' não traduzidas levando à codificação de uma única poliproteína (MONTEIRO, 2016).

O ciclo infeccioso do vírus da dengue (DEN) depende da interação entre o receptor de membrana da célula alvo e a glicoproteína de envelope (E), ocorrendo essa ligação o virion acaba sendo endocitado havendo uma indução de mudanças conformacionais da proteína E dentro do endossomo tardio gerando redução do pH, levando assim a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e a liberação do capsídeo (C) para o citoplasma celular (RODENHUIS-ZYNERT *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2015). Vários processos ocorrem após a liberação do capsídeo (C), como a liberação do RNA no citoplasma celular, tradução da poliproteína viral, deferindo um conjunto de proteases virais e celulares, que leva às proteínas maduras (ALVES, 2015).

As proteínas não estruturais que são clivadas nos flavivírus são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (BARONTI *et al.*, 2014). A região 5' é composta por cerca de 100 nucleotídeos sendo assim relativamente uma região curta, possuindo um cap terminal sendo considerada como uma estrutura muito conservada; já a região 3' é composta por cerca de 450 nucleotídeos sendo mais longa e também possui estruturas conservadas (MONTEIRO, 2016).

As proteínas estruturais que são codificadas pelo RNA fita simples além das proteínas não estruturais são: o capsídeo (C), membrana (M) e o envelope da glicoproteína (E), constituindo assim 10 proteínas que são codificadas, sendo 3 estruturais e 7 não estruturais (Figura 3). Cada DEN compartilha cerca de 65% do genoma com os outros tipos de DEN (GUZMAN *et al.*, 2010).

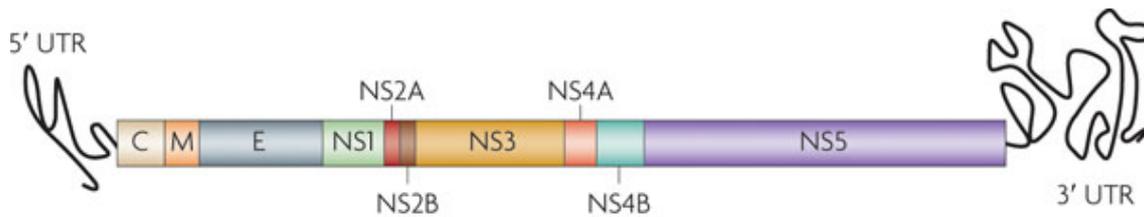


Figura 3: Representação dos genomas dos flavivírus, mostrando as três proteínas estruturais, as sete proteínas não estruturais e a fita simples de RNA com orientação positiva. As regiões UTR em ambas as extremidades são regiões não traduzíveis (modificado de GUZMAN *et al.*, 2010).

A proteína (C) é assim chamada por compor o capsídeo viral, tendo uma carga elevada que assegura a montagem dos vírions através do empacotamento do RNA genômico (MA *et al.*, 2004; MONTEIRO, 2016). A proteína (M) possui sua forma imatura sendo chamada de pré-membrana (prM), essa forma imatura se torna M após passar por clivagem dentro da via secretora durante a maturação das partículas virais (RODENHIUS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010). Já o envelope da glicoproteína (E) se destaca por ser a maior dentre as principais proteínas estruturais do vírus se projetando para fora do envelope viral, sendo responsável por induzir anticorpos neutralizantes, absorver as partículas virais aos receptores nas células do hospedeiro e fusão entre a membrana do endossomo e o envelope viral (LUPI; CARNEIRO; COELHO, 2007). Através dessa glicoproteína que há a interação com os receptores celulares de forma que ocorra a entrada do vírion na célula hospedeira (LINDENBACH; THIEL; RICE, 2007).

As proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 possuem suas próprias funções. NS1 é essencial para a infecção dos vírus, NS2A coordena a mudança entre a replicação do RNA e o empacotamento, já a NS2B quando se liga à M forma um complexo estável com a NS3 servindo assim como cofator na atividade proteolítica de clivagem das proteínas não estruturais. NS3 é a proteína que possui mais funções atuando no processamento de replicação de RNA, na atividade do nucleotídeo trifosfatase e na RNA helicase. As proteínas NS4A e NS4B trabalham de forma conjunta estando envolvidas no processo de replicação viral e inibindo a sinalização do interferon. Por último, encontra-se a NS5 que é a maior proteína viral, atuando na RNA polimerase dependente, na metiltransferase, sendo considerada a enzima chave para que ocorra a replicação viral (MONTEIRO, 2016).

3.4. Epidemiologia da Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) apareceu recentemente no Brasil com dados alarmantes, em 2014 até a Semana Epidemiológica 53, foram confirmados 2196 casos, segundo a Semana Epidemiológica 13 (2016) em 2015 foram notificados no país 38.322 casos prováveis de febre de Chikungunya, dos quais 13.236 tiveram confirmação e no ano de 2016, notificados 39.017 casos prováveis, porém destes só 6.159 foram confirmados até dia 04/04/16, ocorrendo um crescimento em 2015 bem elevado e diminuindo o número de casos em 2016 comparado a 2015 porém prevalecendo maior do que relatado em 2014. Em relação aos casos prováveis por região, foram encontrados em 2014 na região Norte 1264 casos, destes 1146 confirmados, no Nordeste 1882 casos notificados dentre estes 1046 confirmados, na região Sul não houve relato neste ano, na região Sudeste foram 2 casos notificados, porém nenhum confirmado e na região Centro-Oeste 47 notificações com 4 confirmações. Em 2015 na região Norte relatou-se 833 casos prováveis, já em 2016 o aumento foi de 1.802 casos em relação a 2015, estando esta região em segundo lugar no número de casos (2635). Em relação ao Nordeste foram 6.457 casos prováveis em 2015 e 31.659 em 2016, tendo um aumento de 25.202 casos ao comparar 2015 com 2016 ficando em primeiro lugar nos dois anos (2015/2016) no número total de casos, concluindo-se que houve uma progressão no número de casos ao avaliar de 2014 a 2016 a região Nordeste, Sul e Sudeste (Tabelas 3 e 4). Na região Sul os casos prováveis eram poucos, somente 13 (2015), porém em 2016 esse número foi alarmante com 1.179 casos se for comparado aos dados de 2014 e 2015. A região Sudeste apresentou o segundo maior número de casos ao se comparar a diferença no número de casos entre 2015 (59 casos) e 2016 (2.603 casos), tendo um aumento de 2.544 casos. O valor mais baixo de todos os casos foi encontrado na região Centro-Oeste, com 50 casos em 2015 e 941 casos em 2016, com pouca diferença no aumento de casos ao se comparar o aumento que ocorreu nas outras regiões do país (Tabela 4), contudo em 2014 os valores mais baixos de todos os casos ocorreram nas regiões Sul e Sudeste (Tabela 3).

TABELA 3: Número de casos notificados/casos confirmados de febre de Chikungunya no ano de 2014 por região.

REGIÃO	CASOS NOTIFICADOS	CASOS CONFIRMADOS
	2014	2014
NORTE	1264	1146
NORDESTE	1882	1046
SUL	0	0
SUDESTE	2	0
CENTRO-OESTE	47	4
TOTAL	3195	2196

Fonte: Brasil (2015).

A incidência do número de casos de febre de Chikungunya foi calculada por 100 mil habitantes, ocorrendo também um aumento na região Nordeste nos anos 2015 (11,4) e 2016 (56,6), permanecendo assim a essa região na liderança de maior número de casos/incidência nos dois anos, não sendo encontrados dados de incidência do ano de 2014 para comparação. Em relação ao menor valor de incidência no ano de 2015 a região Sul ficou em primeiro lugar com 0 incidência de casos, já em 2016 foi a região Sudeste com 3 incidência de casos. A região Norte também ficou em segundo lugar na incidência de casos em 2015 (4,8) e 2016 (15,1). Houve uma diferença em relação ao menor número de casos prováveis que foi na região Centro-Oeste, com o menor número de incidência de casos que ocorreu na região Sudeste (Tabela 3).

TABELA 4: Comparativo dos casos prováveis de febre de Chikungunya e Incidência/100 mil habitantes entre 2015/2016 por região.

REGIÃO	CASOS (n)	CASOS (n)	INCIDÊNCIA/100	INCIDÊNCIA/100
	2015	2016	HABITANTES	HABITANTES
			2015	2016
NORTE	833	2635	4,8	15,1
NORDESTE	6457	31659	11,4	56,6
SUL	13	1179	0,0	4
SUDESTE	59	2603	0,1	3
CENTRO-OESTE	50	941	0,3	6,1
TOTAL	7412	39017	3,6	19,1

Fonte: Brasil (2016).

Os óbitos da febre de Chikungunya tiveram um valor insignificante ao comparar com os óbitos de dengue. Em 2015 foram confirmados 6 óbitos da febre de Chikungunya, sendo 5 na região Nordeste e 1 na região Sudeste, já no ano de 2016 o número de óbitos foi o dobro de 2015, sendo 12 casos e todos no Nordeste, configurando assim uma região com potencial risco de contrair a febre, pois além de ter o maior número de óbitos em

2015 e ser a única a apresentar óbitos em 2016, também foi a região que liderou no maior número de casos prováveis nos dois anos e também no maior número de incidência de casos, sendo assim uma região alvo na prevenção, tratamento e erradicação da febre de Chikungunya para a melhoria da Saúde Pública nesta região.

3.4.1. Principais técnicas de diagnóstico da Chikungunya

O CHIKV é um arbovírus com partículas virais com envelope lipoprotéico além de serem encontradas espículas de glicoproteínas virais medindo de 60 a 70 nm de diâmetro. Esse vírus é sensível ao aquecimento superior a 58 °C, assim como, à ação de detergentes e solventes orgânicos. Seu genoma é de aproximadamente 11,8 kb de RNA fita simples com sua polaridade positiva (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). Seu RNA fita simples consiste de uma região 5' não codificante e 3' poliadenilado. As proteínas não estruturais que participam do processo são: nsP1 (envolvido na síntese do RNA), nsP2, nsP3 e nsP4 sendo proteínas importantes para a replicação do vírus. Já as proteínas estruturais que contêm capsídeo e envelope são: E1, E2, E3 e 6k, essas proteínas estruturais são sintetizadas como poliproteínas e são clivadas pelo capsídeo da autoproteínases e da signalases. A glicoproteína media a fusão e a E2 interage com a célula receptora do hospedeiro. A junção da proteína não estrutural nsP1 com a proteína estrutural E2 estão diretamente relacionadas à entrada e multiplicação do vírus na célula hospedeira (PARASHAR *et al.*, 2013). O nsP1 participa da síntese de RNA estando associado à membrana celular, o nsP2 está associado com várias proteínas hospedeiras e tem o poder efetivo de desligar a proteína sintetizadora da célula hospedeira. Já o nsP3 inibe a formação de grânulos das células de stress. O responsável pela RNA polimerase viral e RNA dependente é o nsP4 (FROS *et al.*, 2013).

A organização do genoma do Chikungunya possui a seguinte conformação: 5'-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(região de junção)-C-E3-E2-6k-E1-poly(A)-3'. É composta por duas regiões de leitura que codifica as proteínas estruturais e não estruturais descritas acima e o capsídeo (C). As proteínas não estruturais nsP1 a nsP4 são traduzidos através do RNA viral genômico (Figura 4). Depois de 2 a 4 dias do período de incubação o vírus entra na via de endocitose, o vírus CHIKV replica na pele do infectado e então espalha para os demais órgãos (JONES *et al.*, 2013).

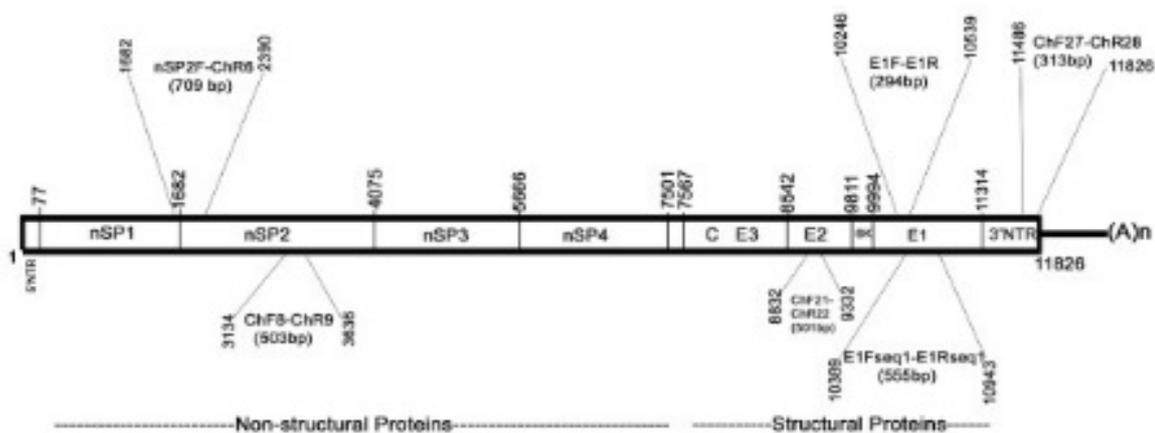


Figura 4: Representação esquemática das proteínas não estruturais e estruturais do vírus CHIKV (modificado de NIYAS *et al.*, 2010).

Segundo Moulin e colaboradores (2016) o diagnóstico da Chikungunya pode ser realizado por meio da técnica de PCR ou sorologia por imunofluorescência indireta através da análise dos anticorpos IgM, que será positivo após 5 dias da presença dos sintomas (Figura 5). O diagnóstico da Chikungunya é realizado por um sistema de teste de qualidade com alta sensibilidade e especificidade com o uso de técnicas moleculares como o qPCR (Figura 5). No caso de pacientes com infecções agudas o método a ser utilizado é o de biologia molecular pela detecção do genoma do vírus ou por sorologia IgM, sendo as técnicas de PCR e sorologia por ELISA as mais utilizadas na rotina laboratorial para diagnóstico de Chikungunya (JACOBSEN *et al.*, 2016).

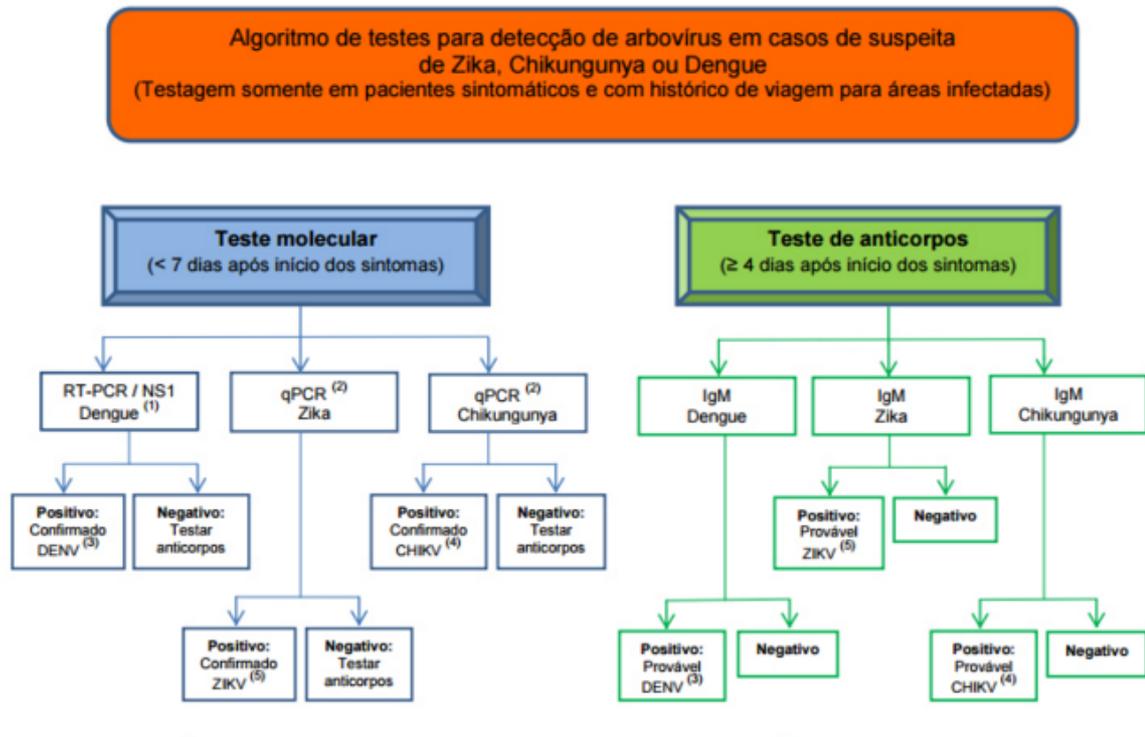


Figura 5: Esquema das técnicas utilizadas para diagnóstico de dengue, chikungunya e zika de acordo com o CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (CANGUSSU, 2016).

Segundo Azevedo e colaboradores (2015) deve-se fazer um diagnóstico diferencial com outros agravos infecciosos antes de começar o tratamento. Anticorpos de vírus específico para IgM é detectado entre o terceiro e oitavo dia do início dos sintomas, já o IgG é detectado a partir do quarto dia após os sintomas. Um diagnóstico específico para CHIKV permanece ainda um desafio para os pesquisadores (JACOBSEN *et al.*, 2016). Recentemente foi desenvolvido um kit (NAT) pela Fundação Oswaldo Cruz (IOC) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) que identifica a presença do material genético dos vírus DEN, ZIKV e CHIKV de forma simultânea, sendo realizado de forma rápida com uma combinação de reagentes, simplificando o processo (FIOCRUZ, 2016).

Testes	Doenças identificadas	Fabricante	Período de detecção	Método
IF: Mosaico Arbovírus 2 IgG	Zika / Chikungunya / Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)	Euroimmun	Período pós-infecção	Imunofluorescência Indireta - Detecta os anticorpos IgG
IF: Mosaico Arbovírus 2 IgM	Zika / Chikungunya / Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)		Fase aguda da infecção	Imunofluorescência Indireta - Detecta os anticorpos IgM
Bio Gene Zika Vírus PCR	Zika	Quibasa	Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) - Detecta o material genético do vírus
Bio Gene Dengue PCR	Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)		Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) - Detecta o material genético do vírus
Bio Gene Chikungunya PCR	Chikungunya		Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) - Detecta o material genético do vírus

Figura 6: Fluxograma referente ao diagnóstico da dengue, zika e chikungunya de acordo com o Ministério da Saúde (Fonte: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica).

A figura 6 demonstra os métodos de detecção aprovados pela ANVISA, de acordo com o Ministério da Saúde para detecção de infecção pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya. Se compararmos com o algoritmo (Figura 5) que foi elaborado pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) nos EUA perceberemos que os dados da Anvisa estão mais completos descrevendo qual é o melhor método de detecção a ser utilizado de acordo com o período da doença.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Saúde Pública do Brasil vem piorando com o passar dos anos, desde o aparecimento de mosquitos *Aedes* spp. levando a surtos de febre amarela inicialmente, depois que ocorreu seu controle apareceram surtos da doença dengue e nos últimos anos após a Copa do Mundo mais doenças chegaram ao Brasil como a chikungunya e a zika.

Diversos diagnósticos vêm sendo testados e utilizados desde o aparecimento do vírus da febre amarela, se destacando o teste rápido por ser um teste sensível e extremamente rápido, porém possui a desvantagem de não ser um teste específico. E na área molecular, o RT-PCR e o PCR em tempo real têm sido utilizados como métodos de detecção mais eficazes por sua especificidade alta, de forma que conseguem reconhecer qual é o sorotipo viral de forma rápida e evita que ocorra uma reação cruzada durante o diagnóstico. Porém tem a desvantagem de serem técnicas caras que não estão disponíveis em todas as cidades do Brasil, não permitindo assim o acesso à toda população brasileira.

Prevenção é imprescindível para uma melhora na Saúde Pública do Brasil, sendo necessário principalmente o investimento nos métodos de detecção mais eficazes e rápidos de forma a possibilitar para a população o melhor tratamento e diminuir os índices de morte.

5. REFERÊNCIAS

ADUNGO, F. *et al.* Development and characterization of Monoclonal Antibodies to Yellow Fever vírus and application in Antigen Detection and IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 23, n. 8, Aug. 2016.

AGUIAR, R. Conheça melhor a doença que está chegando ao Brasil e pode causar uma epidemia pelo país. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 6, n. 4, Oct/Dec. 2014.

ALVES, R.P.S. **Desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o sorotipo 2 do vírus dengue baseada na proteína não estrutural 5 (NS5)**. P. 1-26. Dissertação de Pós-Graduação (Mestrado) em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

AZEVEDO, R.S.S.; OLIVEIRA, C.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Risco do Chikungunya para o Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 49, n. 58, p. 1-6, Sep. 2015.

AYAAD, T. H.; AL-AKEEL, R.K; OLAYAN, E. Isolation and Characterization of Midgut Lectin from *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 58, n. 6, p. 905-912, Nov./Dec. 2015.

BALEOTTI, F.G.; MORELI, L.M., FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 3, p. 379-382, Apr. 2003.

BARONTI, C. *et al.* Complete coding sequence of zika vírus from a French polynesia outbreak in 2013. **Genome Announcements**, Washington, v.2, n.3, Jun.2014.

BARRA, G.B. *et al.* Diagnóstico molecular – passado, presente e futuro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 43, n.3, p. 254-260, s.m. 2011.

BASILE, A.J. *et al.* Development and validation of an Elisa Kit (YK MAC-HD) to detect IgM to yellow fever vírus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 41-48, Dec. 2015.

BATISTA, W.C. *et al.* Notification of the first isolation of Cacipacore vírus in a human in the State of Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 4, p. 528-530, Jul./Ago. 2011.

BINGHAM, A.M. *et al.* Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Florida, v. 65, n. 18, p.475-478, May. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoriamento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 53 de 2014. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 46, n.3, p. 1-7. 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Monitoriamento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 13 de 2016. **Boletim Epidemiológico – Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 47, n. 18, 2016.

CALZAVARA-SILVA C.E. *et al.* Early molecular markers predictive of dengue hemorrhagic fever. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 671-7, Dez. 2009.

CANGUSSU, L.C. Revisão sobre o zika vírus. Disponível em: <http://www.luciacangussu.bio.br/index.php/materias/275-tudo-sobre-zika#>. Acesso em: 12 de Novembro de 2016.

CASTELLANOS, J.E.; RUIZ, C.C. Dengue disease diagnosis: A puzzle to be solved. **Revista de La Facultad de Medicina**, Bogotá, v. 62, n. 4, p. 617-629, Oct./Dez. 2014.

CASTRO, M.G. *et al.* Dengue vírus type 4 in Niterói, Rio de Janeiro: the role of molecular techniques in laboratory diagnosis and entomological surveillance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 7, p. 940-945, Nov. 2012.

CAVALCANTI, M.P.; LORENA, V.M.B.; GOMES, Y.M. Avanços Biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 37, n. 1, p. 1-14, Jan/Abr. 2008.

CORDEIRO, M.T. Laboratory Diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 18, p. 10-12, Oct. 2012.

COSTA, A.C; FAÇANHA, G.P. Sorotipos virais de dengue identificados em crianças de Manaus, Estado do Amazonas, 2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 2, Mar./Apr. 2011.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 283-285, Jan/Mar. 2015.

DOS SANTOS, H.W. A simple one-step realtime RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, n.8, p.1426-33, Aug. 2008.

FAYE, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology Journal**, London, v. 10, p. 311, Oct. 2013.

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

FIOCRUZ. Fiocruz anuncia inovação no diagnóstico simultâneo de zika, dengue e chikungunya. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/fiocruz-anuncia-inovacao-no-diagnostico-simultaneo-de-zika-dengue-e-chikungunya>. Acesso em: 30 de Novembro de 2016.

FROS, J.J. *et al.* The C terminal domain of Chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, Cytopathicity and Inhibition of Interferon Signaling. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 18, p. 10394-10400, Sep. 2013.

FRY, S.R. *et al.* The diagnostic sensitivity of dengue rapid test assays is significantly enhanced by using a combine antigen and antibody testing approach. **Public Library of Science**, São Francisco, v.5, n.6, p. 1-8, Jun.2011.

GOURINAT, A.C. *et al.* Detection of Zika Virus in Urine. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 1, p. 1-3, Jan. 2015.

GUZMAN, M.G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 12, p. 7-12, Feb. 2010.

HONORIO, N.A. *et al.* Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n.5, p. 1-3, Mai. 2015.

JACOBSEN, S. *et al.* External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 76, p.55-65, Mar.2016.

JONES, P.H. *et al.* BST-2/tetherin –mediated restriction of Chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). **Virology**, New York, v. 438, n. 1, p.37-49, Mar.2013

KWALLAH, A.O. *et al.* A real-time reverse transcription loop – mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p.23-27, Oct. 2013.

LADEIRA, P.R.S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M.C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Revista Médica de São Paulo**, São Paulo, v. 90, n. 1, p. 47-51, Jan/Mar.2011.

LAI, Y.L. *et al.* Cost-Effective Real-Time Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) to screen for dengue vírus followws by rapid single-tube multiplex RT-PCR for setotyping of the vírus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 935-941, Mar. 2007.

LANCIOTTI, R.S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, Colorado, v. 14, n.8, p. 1232-1239, Aug. 2008.

LINDENBACH, B.D.; THIEL, H.J.; RICE, C.M. **Flaviviridae: The viruses and their replication**. 5 Edição. Fields virology, 2007.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. Artigo de Revisão. **Revista Pan-Amazônica de Saude**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, Jul. 2014.

LUPI, O.; CARNEIRO, C.G.; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 291-305, Jul/Ago. 2007.

MA, L. *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101, n. 10, p. 3414-3419, Mar. 2004.

MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F.A. **Advances in Virus Research**. 1 Edição. Elsevier, 2014.

MARCONDES, C.B.; XIMENES, M.F.F.M. Zika vírus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 49, n. 1, p. 4-10, Jan./Feb. 2016.

MATHEUS, S. *et al.* Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n.9, p. 1691-3, Sep. 2016.

MONATH, T.P.; VASCONCELOS, P.F.C. Yellow Fever. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v.64, p. 160-173, Mar. 2015.

MONTEIRO, A.G.F. *et al.* New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using TaqMan probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Austin, v. 11, n. 7, p.1865-1871, Jul. 2015.

MONTEIRO, J.D. **Epidemiologia molecular dos vírus dengue e zika no Estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2014 a maio de 2015**. P. 1-120. Dissertação

de Pós Graduação (Mestrado) em Biologia Parasitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

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

MORENO, E.S. *et al.* Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of São Paulo, Brazil, 2008. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 3, p. 290-96, May./Jun. 2011.

MOULIN, E. *et al.* Simultaneous outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections: diagnosis challenge in a returning traveler with nonspecific febrile illness. **New Microbe and New Infect**, Hoboken, v. 11, p. 6-7, Feb. 2016

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika vírus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 68, p. 53-55, Jul. 2015.

NASCIMENTO, S; SUAREZ, E.R; PINHAL, M.A.S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v. 7, n. especial, Nov. 2016.

NISHI, S.M. *et al.* Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 8-14, Jan./Mar. 2009.

NIYAS, K.P *et al.* Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. **Virology Journal**, London, v. 7, n. 189, Aug. 2010.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em tempo real. **Revista de Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 7, n.33, p. 10-13, Jul./Dez. 2004.

NUNES, M.R. *et al.* Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. **Journal Virology Methods**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 29-34, Jun. 2011.

NUNES, R.F.F. *et al.* Characterization of Enzymatic profiles of *Aedes aegypti* strains from the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 285-292, Jan. 2016.

OSORIO, L. *et al.* The use of rapid dengue diagnostic tests in a routine clinical setting in a dengue-endemic area of Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n.4, p. 510-516, Jun.2015.

PARASHAR, D. *et al.* Administration of E2 and NS1 siRNA inhibit Chikungunya vírus replication in vitro and protects mice infected with the vírus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n.9, p.1-15, Sep. 2013.

PRADO, P.S. **Validação e confiabilidade do teste rápido SD Bioeasy Dengue Duo para o diagnóstico da dengue na rede de saúde pública do Distrito Federal.** p. 1-99. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PIGNATTI, M.G. Saúde e Ambiente: as doenças emergentes no Brasil. **Ambiente & Sociedade**, Mato Grosso, v. VII, n. 1, p. 133-148. Jan./Jun. 2004.

POLONI, T.R. *et al.* Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virology Journal**, London, v. 7, n. 22, Jan. 2010.

ROCCO, I.M. *et al.* First isolation of dengue 4 in the State of São Paulo, 2011. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 49-51, Jan./Feb. 2012.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A; WILSCHUT, J.; SMIT, J.M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Science Translational Medicine**, Basel, v. 67, n. 16, p. 2773-2786, Aug. 2010.

ROTHER, E.T. Revisão Sistemática x Revisão Narrativa. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 20, n. 2, p.1-2, Apr/Jun.2007.

r

SANTANA, V.S. *et al.* Concurrent Dengue and malaria in the Amazon region. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 5, p. 508-11, Sep./Oct. 2010.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Virologia Humana**. 3 Edição. Guanabara. 2015.

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial referente ao diagnóstico laboratorial do Zika vírus. Disponível em: www.sbpc.org.br/upload/conteudo/sbpcml_posicionamento_zika_virus.pdf. Acesso em: 30 de Novembro de 2016.

TIZZOT, M.R.P.A. Zika Virus. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v.1, n. 15, p. 1-2, s.m.2016.

VASCONCELOS, P.F.C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 6, n. 2, p. 9-10, Jun. 2015.

WEAVER, S.C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 8, n. 6, p. 1-4, Jun. 2014.

WU, X. *et al.* Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells. **Virology Journal**, London, v. 7, n. 270, p. 1-8, Oct. 2010.

ZHANG, X. *et al.* Structure of acidic pG dengue virus showing the fusogenic glycoprotein trimers. **Journal of virology**, London, v. 89, n. 1, p. 743-750, Oct. 2015.

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