



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS**



**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DO *Zika vírus* e
IMPACTO DE IMUNOGLOBULINAS HUMANAS ANTI-ZIKV E
ANTI-DENV NA COMPETÊNCIA VETORIAL DO *Aedes*
*aegypti***

EVELYN BEATRIZ DA COSTA VAZ

MANAUS

2019

EVELYN BEATRIZ DA COSTA VAZ

**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DO *Zika vírus* e
IMPACTO DE IMUNOGLOBULINAS HUMANAS ANTI-ZIKV E
ANTI-DENV NA COMPETÊNCIA VETORIAL DO *Aedes
aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, para obtenção do grau de *Mestre em Doenças Tropicais e Infeciosas*.

Orientador: **Prof^a Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta**

Co-orientadora: **Prof^a Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra**

Prof^a Dra. Bárbara Aparecida Chaves

MANAUS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Vaz, Evelyn Beatriz Costa

Avaliação da transmissibilidade do Zika vírus e impacto de imunoglobulinas de arboviroses na competência vetorial do *Aedes aegypti*/

Evelyn Beatriz da Costa Vaz. Manaus : [s.n], 2019.

f.: color.; cm.

Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Medicina Tropical – Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas

Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Pimenta, Paulo Filemon Paolucci

Coorientador(a): Barbosa, Maria das Graças Vale e Chaves, Barbara Aparecida

1. Zika virus. 2. Transmissibilidade. 3. Imunoglobulinas. 4. Competência vetorial.

I. Pimenta, Paulo Filemon Paolucci (Orient.). II. Barbosa, Maria das Graças Vale (Coorient.). III. Chaves, Barbara Aparecida

III. Universidade do Estado do Amazonas.

IV. Avaliação da transmissibilidade do Zika vírus e impacto de imunoglobulinas de arboviroses na competência vetorial do *Aedes aegypti*

FOLHA DE JULGAMENTO**AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DO *Zika vírus* e IMPACTO DE
IMUNOGLOBULINAS HUMANAS ANTI-ZIKV E ANTI-DENV NA
COMPETÊNCIA VETORIAL DO *Aedes aegypti*****EVELYN BEATRIZ DA COSTA VAZ**

“Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado”.

Banca Julgadora:

Presidente

Membro

Membro

DEDICATÓRIA

À todos aqueles que, em um momento no qual o corpo necessitava de cuidados, aceitaram participar do estudo afim de contribuir com a Ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infecciosas em parceria com a Universidade do Estado do Amazonas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pela bolsa concedida.

À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus orientadores, Dr. Paulo Filemon Paolucci Pimenta, Dra. Maria das Graças Vale Barbosa Guerra e Dra. Barbara Aparecida Chaves gratidão por terem me aceito como aluna e pela oportunidade de desenvolver o estudo com todo o apoio e incentivo que me foram dados durante esses dois anos.

Às doutoras Nágila Francinete Secundino e Ana Paula Marques Duarte que, entre troca de experiências e ensinamentos, sempre se fizeram presentes para que o estudo transcorresse da melhor forma possível.

Aos amigos de laboratório Ademir Bentes, Andreia Paz, Eloane Andrade e Rodrigo Maciel que foram parceiros excepcionais para que os experimentos fossem realizados. À vocês também sou grata pela amizade e por todos os dias de aprendizado que dividimos juntos.

Aos queridos enfermeiros do ambulatório da FMT-HVD: Luiz Maciel, Pâmela Teixeira, Francielen Furtado, Ryana Aparicio e Débora que me auxiliaram na abordagem dos participantes para o estudo.

Às médicas Aline Cristine Alencar e Camila Bôtto Menezes por ajudarem na inclusão dos participantes na pesquisa.

Aos amigos que fiz na Gerência de Entomologia: Débora, Rubens, Arinéia, Susan, Jéssica, Sabrina, Kenny, Gabriela, Lucas, Suzan dentre outros que não permaneceram, mas estão em meu coração.

As amigas que o PPGMT e o Grupo de Pesquisa em Doença de Chagas, me trouxeram.

Aos meus pais e minha irmã, que sempre foram meu porto seguro.

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que através dos números de concessão 400704/2014-5 (Ciências sem Fronteiras), 464839/2014-9 (CNPq|INCT), 440615/2016-0 (MS-Decit/Nº14/2016), 425993/2016- 7 (CNPq-Universal 01/2016), 421799/2017-0 – CNPq (PAPES VI 2017), 421798/2017-3 (PAPES VI 2017) financiaram a pesquisa.

Ao Ministério da Saúde pela Rede Nacional de Especialistas em Zika e Doenças-RENEZIKA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo.

“A persistência é o
caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: *Dengue vírus* (DENV) e *Zika vírus* (ZIKV) causam arboviroses com ampla distribuição no mundo. Ambos os arbovírus são transmitidos ao homem pelo principal vetor *Aedes aegypti*. Alguns dos fatores envolvidos na dinâmica da transmissão incluem a competência vetorial do *Ae. aegypti* e a imunologia do hospedeiro que precisam ser entendidas para melhorar o combate as doenças.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar a transmissibilidade do ZIKV ao *Ae. aegypti* e o impacto das imunoglobulinas anti-ZIKV e anti-DENV (Igs) na competência vetorial.

Metodologia: Participantes elegíveis foram submetidos ao xenodiagnóstico e coleta de sangue venoso para análise da transmissão viral. Para avaliar a influência de Igs humanas na competência vetorial de *Ae. aegypti*, diferentes perfis de Igs nos soros foram testados. Para isso fêmeas de *Ae. aegypti* foram infectadas com ZIKV, e soros de participantes com diferentes perfis de Igs. No 14^o dia após a infecção, tanto as fêmeas do xenodiagnóstico quanto as das infecções experimentais foram testadas por biologia molecular.

Resultados: As amostras de soro e os mosquitos do xenodiagnóstico foram negativos para a presença do vírus. Os resultados das infecções experimentais mostram modulação da infecção de *Ae. aegypti* com ZIKV de acordo com o perfil de Igs no soro. O grupo infectado com imunoglobulina anti-DENV apresentou altas taxas de infecção e competência vetorial em comparação aos demais grupos, diferente do grupo infectado com imunoglobulina anti-ZIKV que apresentou taxas de infecção mais baixas.

Conclusão: O período virêmico parece ser curto e/ou os participantes selecionados tinham baixa carga viral, o que levou a resultados negativos. A competência vetorial de *Ae. aegypti* frente as diferentes Igs mostrou uma possível modulação da infecção quando Igs anti-ZIKV e anti-DENV estavam presentes.

Palavras-chave: Arbovirose, imunoglobulinas, suscetibilidade, competência.

ABSTRACT

Introduction: *Dengue virus* (DENV) and *Zika virus* (ZIKV) cause arboviruses with widespread distribution in the world. Both arboviruses are transmitted to man by the main vector *Aedes aegypti*. Some of the factors involved in the dynamics of transmission include the vectorial competence of *Ae. aegypti* and host immunology that need to be understood to improve disease control. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the transmissibility of ZIKV to *Ae. aegypti* and the impact of anti-ZIKV and anti-DENV (Igs) immunoglobulins on vector competence. **Methodology:** Eligible participants were submitted to xenodiagnosis and venous blood collection for analysis of viral transmission. To evaluate the influence of human Igs on the vector competence of *Ae. aegypti*, different profiles of Igs in the sera were tested. For this female of *Ae. aegypti* were infected with ZIKV, and sera from participants with different Igs profiles. On the 14th day after infection, both xenodiagnostic females and experimental females were tested by molecular biology. **Results:** Serum samples and xenodiagnostic mosquitoes were negative for the presence of the virus. The results of the experimental infections show modulation of *Ae. aegypti* with ZIKV according to the Igs profile in the serum. The group infected with anti-DENV immunoglobulin showed high infection rates and vector competence in comparison to the other groups, different from the group infected with anti-ZIKV immunoglobulin that had lower infection rates. **Conclusion:** The viremic period appears to be short and / or the selected participants had low viral load, which led to negative results. The vectorial competence of *Ae. aegypti* versus the different Igs showed a possible modulation of the infection when anti-ZIKV and anti-DENV Igs were present.

Keywords: Arbovirose, immunoglobulins, susceptibility, competence.

RESUMO LEIGO

Entre as principais doenças causadas por mosquitos estão a Dengue e a Zika. O mosquito *Aedes aegypti* fica contaminado com vírus ao picar alguém que já esteja doente e assim pode transmitir para outras pessoas, mas pode acontecer de ao sugar o sangue de alguém doente o mosquito não ficar contaminado. O que pode explicar isso é a baixa quantidade de vírus e os anticorpos de defesa que agem sobre o vírus que está no sangue da pessoa. Ou seja, ao sugar o sangue, o mosquito acaba ingerindo anticorpos que podem fazer com que o vírus não entre no mosquito ou que possam fazer com que o vírus cresça no mosquito e assim passar para outra pessoa, além do lugar que o mosquito vive também influenciar na infecção. Esse estudo teve a finalidade de mostrar se os mosquitos conseguem ficar contaminados ao picarem pessoas com sintomas e quais os anticorpos ajudam e quais impedem a replicação do vírus no mosquito. Para mostrar os resultados os mosquitos do laboratório, sem vírus, foram colocadas no braço de pacientes que chegavam ao hospital com suspeita de zika, depois coletamos amostra de sangue para alimentar os mosquitos em laboratório para ver se os anticorpos que tinha no sangue conseguia ajudar ou inibir a infecção por zika. Os mosquitos que foram alimentados, passaram por testes pra ver se tinha algum vírus e se os anticorpos agiram. Ao final do estudo, foi possível ver que os mosquitos que picaram o braço do paciente não conseguiram se infectar por que provavelmente tinha pouco vírus no sangue dele, além disso observamos que o anticorpo da Dengue parece fazer com que o vírus cresça bastante dentro do mosquito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Países e territórios com transmissão do Zika vírus, 2017.	4
Figura 2: Estrutura da partícula viral, proteínas estruturais e não-estruturais do ZIKV.6	
Figura 3: <i>Aedes aegypti</i>	7
Figura 4: As etapas da replicação e transmissão do patógeno pelo vetor.....	8
Figura 5: Esquema das barreiras naturais à infecção pelo Dengue vírus (Adaptado de Jobling, 1987)	9
Figura 6 Estrutura das imunoglobulinas de classe M e G (adaptado de Schroeder and Cavacini, 2013).....	10

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

DENV – Dengue vírus

ZIKV – *Zika vírus*

OMS – Organização Mundial da Saúde

MS – Ministério da Saúde

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde

FVS – AM – Fundação de Vigilância em Saúde do estado do Amazonas

FMT HVD – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado

SEMSA – Secretaria Municipal de Saúde

SEMSA – Secretaria Municipal de Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

Igs - Imunoglobulinas

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

ORF – Open Reading Frame

NCR – Non Coding Region

PIE – Período de Incubação Extrínseco

CV – Competência Vetorial

MIB – Barreira de Infecção do Intestino Médio

MEB – Barreira de Escape do intestino Médio

IR – Infection Rate

DIR – Disseminated Infection Rate

VC – Vector Competence

RT-qPCR – Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia polimerase

cDNA – DNA complementar

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Arboviroses.....	1
1.2 Dengue.....	1
1.2.1 Epidemiologia	2
1.3 Febre por <i>Zika vírus</i>	3
1.3.1 Epidemiologia	4
1.4 Sinais e Sintomas clínicos	5
1.5 Diagnóstico e Tratamento	5
1.6 Zika vírus.....	6
1.7 Vetor	6
1.8 Ciclo do vírus no vetor	8
1.9 Competência Vetorial.....	8
1.10 Imunoglobulinas humanas	9
1.11 Interação entre mosquitos e imunoglobulinas de hospedeiros humanos	10
1.12 Justificativa	11
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Produtos da dissertação.....	14
4. Limitações da pesquisa e perspectivas futuras.....	36
5. Conclusão.....	37
6. Referências.....	38
7. Anexo.....	42
8. Apêndices	49

1. Introdução

1.1 Arboviroses

O termo arbovirose é um acrônimo para o termo inglês Arthropod-Borne Viruses^{1,2}. São doenças causadas por vírus e que são motivos de grande preocupação para a saúde pública. A transmissão do vírus ocorre pela picada de artrópodes hematófagos, como moscas, carrapatos e mosquitos. Mas, para que ocorra a transmissão, é necessário que o vírus se replique nos tecidos dos vetores, gerando títulos virais elevados, até sua chegada na glândula salivar, para assim, através da picada, serem transmitidos aos hospedeiros vertebrados e manterem a tríade: vírus-vetor-hospedeiro³.

Nos últimos anos, houve um aumento da incidência da arbovirose Zika em lugares onde dengue já era endêmico. Esse aumento pode ser explicado por fatores como crescimento populacional desordenado, fluxo de viagens entre pessoas de áreas endêmicas para não endêmicas, aquecimento global, além da expansão dos vetores⁴. As principais arboviroses que atingem parte da população mundial, sendo as responsáveis por grandes epidemias, e que circulam no Brasil, são as causadas pelo *Dengue vírus* (DENV) e *Zika vírus* (ZIKV).

1.2 Dengue

DENV pertence à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, o DENV possui 4 sorotipos distintos que vai de 1-4, sendo o tipo 2 o sorotipo mais virulento. A transmissão do vírus pode ocorrer através de transfusão sanguínea e vertical durante a gestação, mas a principal forma continua sendo por meio da picada do inseto fêmea *Ae. aegypti*. Os principais sintomas da dengue incluem artralgia, exantemas, febre, cefaleia e calafrios⁵.

Os primeiros relatos de sintomas da doença são datados em uma enciclopédia chinesa por volta de 992 a.C. Originalmente, a doença recebeu a definição de “veneno da água” e foi associada a insetos voadores. Anos mais tarde, a partir do século XVIII inúmeros casos com sintomatologia da Dengue foram descritos em vários lugares do

mundo, houve registros de prováveis casos em Jacarta na Indonésia no ano de 1778 e na cidade de Cairo, no Egito em 1780⁶.

Foi somente no século XX que a relação entre o vírus e mosquito vetor *Ae. aegypti* ficou conhecida, neste período a disseminação do mosquito já atingia grandes proporções. O *Ae. aegypti* já se encontrava, principalmente, em cidades costeiras devido as inúmeras embarcações que aportavam nelas. A situação da expansão da doença aumentou drasticamente durante a Segunda Guerra Mundial, quando as tropas se deslocavam de cidades em cidades. Ao final das guerras, já existia a circulação dos sorotipos do DENV levando ao surgimento de formas graves da doença⁷.

Nas Américas o trajeto dos surtos iniciou-se em 1600, sendo que os últimos grandes surtos por DENV foram marcados entre os anos de 2011 e 2017, concomitante com eventos esportivos como os Jogos Pan – Americanos, no México em 2011, Copa das Confederações em 2013 e a Copa do Mundo, no ano de 2014, estes dois últimos eventos ocorridos no Brasil, possivelmente contribuíram para o aumento do número de casos onde a doença já existia⁸.

1.2.1 Epidemiologia da dengue

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 3 milhões de pessoas vivem em área de risco de contrair Dengue. Nas Américas, no ano de 2017, mais de 500 mil casos foram relatados, e mais de 900 óbitos pela doença foram registrados. O Brasil foi responsável por contribuir com cerca de 90% do número de casos neste ano⁸.

Em 2018 foram registrados 247.393 casos de pessoas com a doença no Brasil. Destes, mais de 159 mil casos foram confirmados. A região Norte apresentou uma redução de 24% se comparado ao número de casos do ano anterior, porém ainda se mantém com um número elevado de registros da doença. O Estado do Amazonas apresentou uma incidência de 58,8 casos/100.000 habitantes, com sua capital Manaus detendo 340 casos prováveis no ano em questão⁹.

A cidade de Manaus teve sua primeira epidemia por DENV em 1998, onde mais de 13mil casos foram registrados¹⁰. Atualmente, co-circulam na região os 4 sorotipos além do ZIKV que foi o responsável pela epidemia ocorrida em 2015 no Brasil.

1.3 Febre por *Zika vírus*

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta Zika em Uganda, África, em um macaco Rhesus. No ano seguinte, novamente o vírus foi isolado na mesma floresta, dessa vez em *Ae. africanus*^{12,13}.

Em 2007, ocorreu a primeira epidemia causada pelo ZIKV na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia. Não se tem relatos de quantas pessoas estiveram infectadas, mas há uma estimativa de que mais de 900 pessoas manifestaram exantemas, conjuntivite não purulenta e febre baixa¹⁴. Em 2013, outra grande epidemia ocorreu nas ilhas da Polinésia Francesa juntamente com uma epidemia de Dengue. As taxas de incidência de ambas as arboviroses são desconhecidas devido às manifestações clínicas serem bastante semelhantes. Foi durante essa epidemia que houve o primeiro relatado de um caso grave de ZIKV em associação com a síndrome Guillain–Barré¹⁵.

No Brasil, o primeiro relato de casos autóctones foi feito em abril de 2015 na região nordeste¹⁶. Mas somente em outubro do mesmo ano, a população entrou em estado de alerta após o Ministério da Saúde (MS) relatar número de casos elevados de crianças nascidas na rede pública e privada com má formação congênita. Uma possível relação entre a má formação e a infecção por ZIKV foi confirmada em amostras de líquido amniótico de mulheres grávidas, cujo os fetos apresentavam microcefalia¹⁷. A partir de tais relatos, o MS e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), na época, assumiram que poderia existir uma relação entre microcefalia e ZIKV¹⁸.

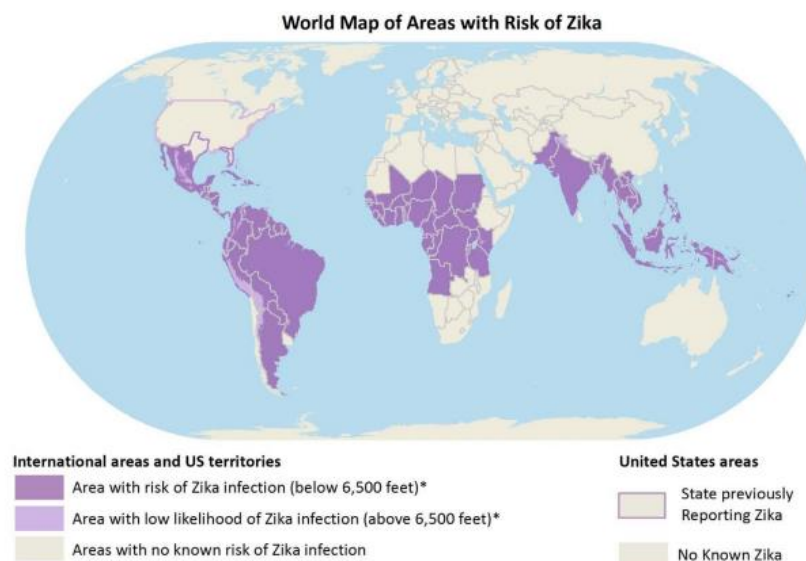


Figura 1: Países e territórios com transmissão do Zika vírus, 2017 ¹⁹.

Essa possível relação entre ZIKV e má formação congênita aumentou a preocupação sobre a expansão do vírus e a manutenção de grandes epidemias. Segundo a OMS, desde 2007 a infecção por ZIKV tem sido documentada em 46 países sendo que 34 deles com transmissão autóctone. A grande expansão ocorreu entre 2015 e 2016, com estimativa, pelas autoridades brasileiras, de que ocorreram 1,5 milhões de casos, desde o início do surto¹⁹.

1.3.1 Epidemiologia da febre do zika

A OMS estima que mais de 4 milhões de pessoas vivem sob o risco de contrair Zika no mundo²⁰. No Brasil em 2017, mais de 17 mil casos prováveis de febre pelo ZIKV foram registrados. No ano seguinte, observou-se uma diminuição no número de casos da doença, onde 8.680 casos prováveis foram registrados. Os primeiros casos registrados da doença na região Norte foram em 2015, e assim como as demais regiões brasileiras, também apresentou uma queda significativa no número de notificações da doença. Em 2017 foram mais de 21 mil casos registrados na região, sendo que destes 3.889 ocorreram no estado do Amazonas. Em 2018, mais de 18 mil casos prováveis foram registrados, ocorrendo 2.457 no Amazonas²¹.

A cidade de Manaus confirmou o primeiro caso de Zika em novembro de 2015, e desde então, de acordo com a Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS-AM), concentra o maior número de casos do estado do Amazonas. Em 2018, segundo a Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA) 415 casos foram registrados e se comparado com o ano anterior, houve uma redução de 18%. A região Norte, apesar da redução no número de casos, ainda detém um considerável número onde o estado do Amazonas corresponde ao terceiro maior número de casos da doença na região²¹.

1.4 Sinais e Sintomas clínicos

A infecção por ZIKV pode se apresentar de forma assintomática em alguns casos ou sintomática. Os principais sintomas apresentados pelas pessoas infectadas pelo vírus incluem febre baixa, artralgia, conjuntivite não purulenta, erupção maculopapular, mialgia e dor de cabeça. São características clínicas semelhantes à de outras infecções causadas por arbovírus, como a Dengue, e podem durar até uma semana²². Em crianças, o quadro cutâneo pode se apresentar com características singulares, como lesões maculares com confluência, lesões vesiculares e em alguns casos a recorrência, sob fator de estresse pode vir a acontecer. As complicações viscerais, podem acometer os indivíduos imunossuprimidos, como acontece em outras infecções virais²³.

1.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico laboratorial das arboviroses é comumente realizado na fase aguda, através da detecção do RNA em amostras de soro colhidas dos pacientes²⁴. O diagnóstico sorológico também pode ser realizado através da pesquisa de anticorpos- imunoglobulinas IgM/IgG específicos de ZIKV, sendo detectados por ELISA e ensaios de imunofluorescência em amostras de soro a partir do dia 5-6 da doença, a desvantagem desses testes é a alta possibilidade de reação cruzada com os outros flavivírus²⁵. O diagnóstico laboratorial, considerado padrão ouro, é o isolamento de ZIKV em cultura viral em células Vero, porém depende do tempo de coleta e da carga viral presente nas amostras para que se tenha um resultado preciso^{26,27}. Não existe um tratamento

específico para a doença, apenas o uso de medicamentos antitérmicos e analgésicos para aliviar os sintomas, e o aconselhamento para uma maior ingestão de líquidos.

1.6 Zika vírus

Pertencente ao mesmo gênero e família do DENV, o ZIKV é esférico, formado por um nucleocapsídeo poliédrico coberto por um envelope lipídico derivado da célula do hospedeiro. O genoma é constituído por fita simples de RNA senso positivo que funciona como RNA mensageiro. Esse RNA viral é formado por aproximadamente 11.000 nucleotídeos, possui duas regiões não codificantes, uma pequena na região 5' capeada (NCR) e uma na região terminal 3' desprovida de cadeia poli-A, o que o diferencia dos RNAs mensageiros celulares. O genoma é constituído também por uma janela aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína que é clivada em 3 proteínas estruturais (Capsídeo, Pr Membrana e Envelope) e 7 não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B e NS5)²⁸.

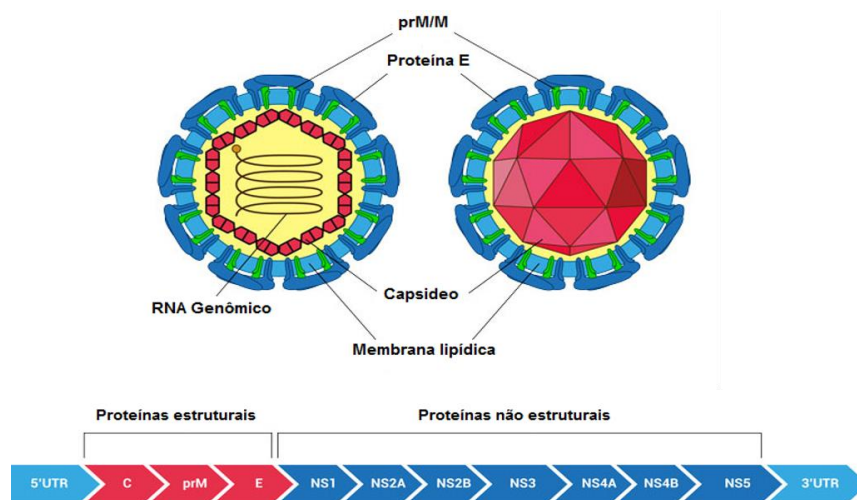


Figura 2: Estrutura da partícula viral, proteínas estruturais e não-estruturais do ZIKV.

1.7 Vetor

ZIKV é principalmente transmitido por artrópodes, predominantemente mosquitos do gênero *Aedes* sp., no qual já foram feitos isolamentos virais de várias espécies^{13,29}. O vetor incriminado na transmissão do ZIKV durante a epidemia em Yap foi o *Ae. hensili*

devido a sua predominância em criadouros pesquisados¹⁴. Já na epidemia de 2013, nas ilhas da Polinésia Francesa, os vetores suspeitos, baseado em evidências epidemiológicas, foram o *Ae. polynesiensis* e *Ae. aegypti*¹⁵.

Em áreas urbanas o *Ae. aegypti* é apontado como vetor principal do ZIKV. Essa espécie é originária da África subsaariana, mas se espalhou por todo o mundo, se adaptando ao ambiente urbano e tornando-se altamente antropofílico. A espécie apresenta características que permitiram uma perfeita adaptação ao ambiente urbano além de uma ampla distribuição global³⁰.

No Brasil, o seu surgimento foi constatado pela primeira vez no período colonial e desde então estratégias de combate ao *Ae. aegypti* foram criadas até que sua erradicação ocorresse em 1955. Porém, a proximidade com países vizinhos que não tinham erradicado o mosquito bem como a interrupção dos programas de combate, facilitou o seu reaparecimento. O *Ae. aegypti* possui características fenotípicas bem peculiares; é rajado com escamas brancas pelo corpo e tem uma coloração escura. É fácil de ser identificado pela presença de um desenho em forma de lira no dorso³¹.



Figura 3: *Aedes aegypti*.

E, ao contrário do que se pensava anteriormente, o *Ae. aegypti* tem a capacidade de fazer várias ingestões de sangue durante um único ciclo gonadotrófico, o que aumenta a probabilidade de infectar-se e de transmitir o vírus para mais de um hospedeiro vertebrado³². Além disso, as fêmeas colocam os ovos de um mesmo ciclo de oviposição em vários recipientes, processo conhecido como “oviposição em saltos”, o que garante maior probabilidade de sobrevivência e a dispersão de sua prole³³.

A alta adaptação dos vetores aos ambientes urbanos, aliado ao comportamento antropofílico e de ovoposição, permitem a dispersão e grande sucesso na manutenção do ciclo de vida desses vetores no ambiente.

1.8 Ciclo do vírus no vetor

Após a fêmea do vetor adquirir o ZIKV do hospedeiro vertebrado, o vírus deve-se replicar nas células epiteliais do intestino, logo após passar pela barreira de escape do intestino médio e alcançar a hemocele, se replicando nos demais tecidos e órgãos. O intervalo de tempo que compreende essas passagens até a infecção da glândula salivar define-se como Período de Incubação Extrínseco (PIE). Após o PIE, o vírus poderá ser transmitido juntamente com a saliva para um novo hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo^{34,35}.

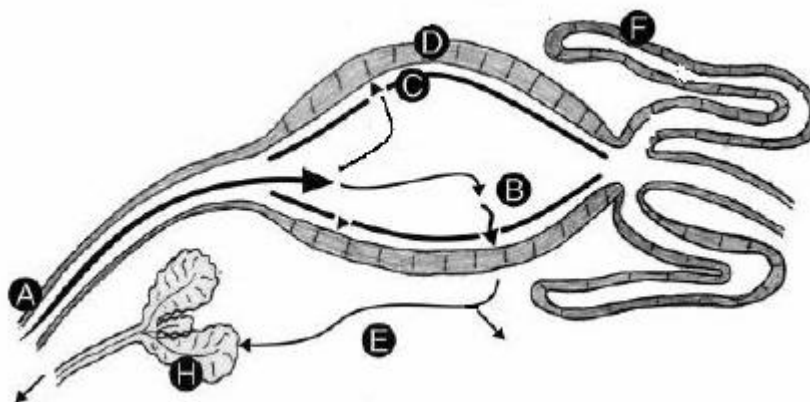


Figura 4: As etapas da replicação e transmissão do patógeno pelo vetor

1.9 Competência Vetorial

A Competência vetorial (CV) é caracterizada pela permissividade intrínseca de um vetor para infecção, replicação, e a transmissão de um patógeno³⁶. As barreiras anatômicas presentes no vetor podem determinar a eficiência da infecção. Tais barreiras incluem: a barreira de infecção do intestino médio (MIB), a barreira de escape do intestino médio (MEB) e a barreira da glândula salivar³⁷. Existem muitos estudos de CV voltados ao DENV, e já é bem estabelecido que ela é controlada geneticamente e varia

conforme regiões demográficas distintas^{37,38}.

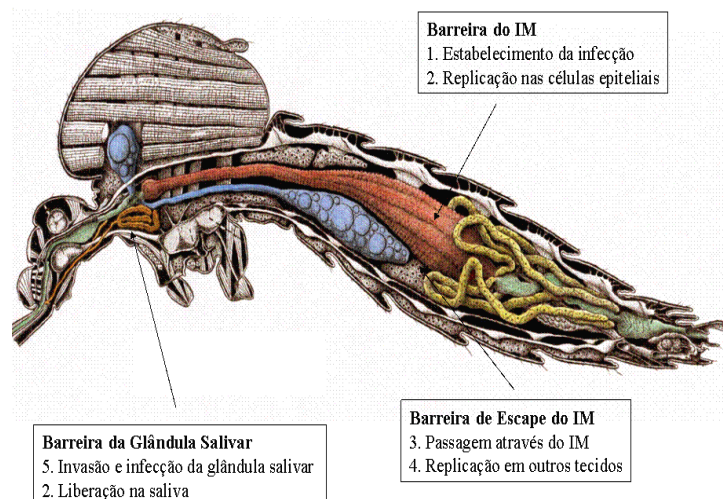


Figura 5: Esquema das barreiras naturais à infecção pelo Dengue vírus (Adaptado de Jobling, 1987)

Um estudo realizado na cidade de Belo Horizonte/MG, mostrou que populações de *Ae. aegypti* de diferentes localidades, dentro da mesma cidade, podem apresentar competência vetorial diferente, inclusive quando comparada populações de anos distintos³⁹.

Os estudos sobre competência vetorial para flavivírus são vastos. Para ZIKV, os estudos sobre competência vetorial vêm sendo realizados quase que exclusivamente sobre o gênero *Aedes*, e apresentam resultados conflitantes: de mosquitos altamente suscetíveis ao ZIKV⁴⁰ a taxas muito baixas de infecção⁴¹, indicando a possibilidade da influência de fatores externos, como as Igs dos hospedeiros humanos na infecção do mosquito.

1.10 Imunoglobulinas humanas

O hospedeiro humano ao se infectar com o vírus, ativa seu sistema imune produzindo Igs que tem como principal objetivo auxiliar no combate à infecção⁴².

As Igs são proteínas séricas que possuem a principal função de ligar-se ao patógeno e, no caso dos vírus, por meio do mecanismo de neutralização, impedir que eles penetrem em uma célula não infectada. Cada imunoglobulina é constituída por quatro cadeias polipeptídicas possuindo dois sítios de ligação para o antígeno. As cadeias

possuem isótipos que caracterizam as cinco classes de Igs existentes, sendo as IgM's e IgG's responsáveis por determinar se a infecção é recente ou passada, respectivamente (Figura 6)⁴³. Uma vez produzida as Igs, elas poderão adquirir resposta protetora a curto/longo prazo ao mesmo patógeno, mas poderão reagir de forma cruzada com outros flavivírus devido a similaridades nas estruturas do arcabouço viral⁴⁴.

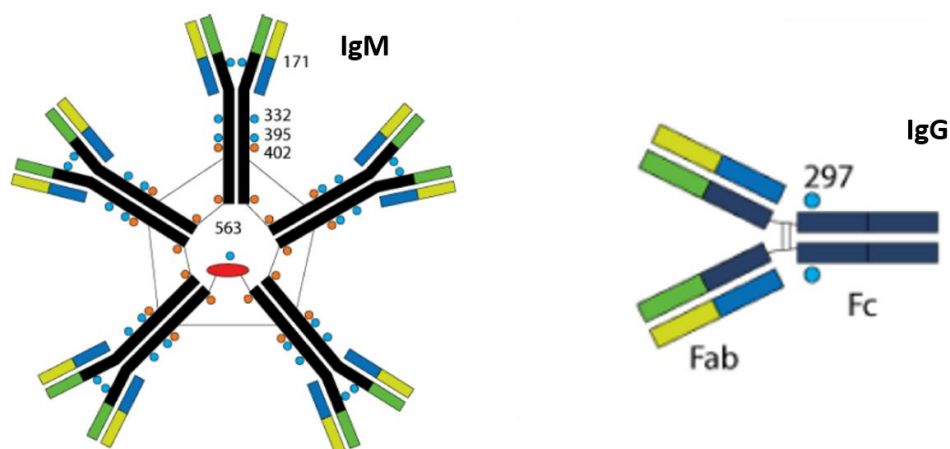


Figura 6 Estrutura das imunoglobulinas de classe M e G

1.11 Interação entre mosquitos e imunoglobulinas de hospedeiros humanos

A partir do repasto sanguíneo os mosquitos adquirem nutrientes importantes para seu ciclo de vida, e neste processo podem se infectar com agentes patogênicos presentes no sangue⁴⁵. Existem fatores intrínsecos ao hospedeiro vertebrado, capazes de modular a fisiologia do vetor, como por exemplo leucócitos e Igs⁴⁶.

Quando os insetos realizam repasto sanguíneo em hospedeiros imunizados contra determinado patógeno, as Igs ingeridas podem estar atreladas a respostas fisiológicas no inseto, podendo modificar seu comportamento alimentar e até mesmo suas taxas de reprodução. Após a ingestão, as Igs são infiltrados na hemocele, podendo atingir vários tecidos, mas para isso precisam lidar com os efeitos causados pelas enzimas digestivas⁴⁷.

A passagem de partículas do sangue para a hemolinfa ocorre de forma rápida em algumas espécies, como em *Anopheles albimanus*, *An. gambiae* e *An. stephensis* e pode

perdurar por longos intervalos de tempo no intestino desses insetos, levando à mudanças no tempo de alimentação e na prediurese⁴⁸. As Igs também podem interferir no desenvolvimento de parasitas, entre eles bactérias e vírus dentro da hemocele de artrópodes. A modulação imunoglobulina-patógeno pode afetar o resultado de uma nova infecção pelo vetor⁴⁹.

1.12 Justificativa

A febre do *Zika vírus* tem se apresentado como uma doença com grande poder de expansão, mais rápido do que os outros arbovírus conhecidos até então. Os primeiros casos autóctones de ZIKV na região norte ocorreram em 2016, mas a doença persiste até os dias atuais uma vez que a infestação pelo principal vetor da doença é notável em toda extensão territorial.

A importância dos culicídeos na saúde pública mundial é reconhecidamente um tema relevante que tem demandado estudos sobre as interações parasito-vetor que ocorrem na transmissão de doenças infecto-parasitárias causadas por diferentes tipos de patógenos. Essas relações são bastante complexas e envolvem interações coevolutivas de parasitos e vetores que determinaram a forma espécie-específica de transmissão para doenças de importância para a saúde pública, tais como malária e dengue. Por mais que os estudos tenham avançado em relação a arbovirose Zika, ainda há uma grande escassez de trabalhos que envolvam a relação vetor-vírus-hospedeiro, o que dificulta o combate à doença. Estudos que abordem a passagem de Igs humanas para insetos, especificamente o *Ae. aegypti*, são inexistentes, e poderiam auxiliar nas estratégias de controle visto suas inúmeras implicações. O combate ao vetor é realizado há anos, no entanto as epidemias persistem, necessitando de buscas por novas ferramentas que auxiliem nesse combate e, para isso, o entendimento da interação vírus-vetor é de suma importância.

Somente dessa forma métodos adicionais poderão ser desenvolvidos com vistas a ampliar o combate à doença. Além disso, faz-se necessário monitorar a expansão do vírus, que normalmente é feito com número de casos em humanos, o que leva ao número subestimado já que as estimativas são baseadas em pacientes sintomáticos, sem conseguir verificar o número real de infecções em assintomáticos.

Manaus possui atualmente 1.802.014 habitantes, de acordo com estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. A cidade vive um rápido e desordenado crescimento populacional que se reflete em problemas como: produção e destinação de resíduos e infraestrutura de saneamento deficitária, cenário ideal para o desenvolvimento do *Ae. aegypti*. Após sucessivas epidemias por dengue em Manaus, desde a primeira, ocorrida em 1998, quando foram registrados 13.873 casos, causados pelo DENV1 e DENV2, a cidade sofre com essa endemia, com alternância em relação aos sorotipos prevalentes e com a expansão da população de vetores. Por se constituir um importante cenário onde há a circulação de DENV e ZIKV, estudos que abordem a biologia do inseto e a interação vírus-hospedeiro vertebrado se fazem necessários.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o período de transmissibilidade do *Zika vírus* e o impacto de imunoglobulinas humanas na competência vetorial de *Ae. aegypti*

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o período de transmissibilidade do *Zika vírus* do hospedeiro vertebrado para o vetor.
- Avaliar a susceptibilidade de mosquitos ao ZIKV frente a diferentes Igs.
- Estimar a taxa de infecção (TI), competência vetorial (CV) e a taxa de infecção disseminada (TID) de *Ae. aegypti* ao ZIKV;

3. Produtos da dissertação

AVALIAÇÃO DE INFECÇÕES INAPARENTES NA TRANSMISSIBILIDADE DO *Zika* vírus AO *Aedes aegypti*

Evelyn Beatriz da Costa Vaz², Bárbara Aparecida Chaves¹, Eloane Silva de Andrade¹, Aline Cristiane Corte Alencar¹, Ana Paula Marques Duarte¹, Andreia da Costa Paz², Ademir Bentes Vieira², Nágila Francinete Secundino³, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra² e Paulo Filemon Paolucci Pimenta^{2,3}

(1) Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, AM, Brasil. (2) Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil. [3] Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Resumo

Introdução: O vírus Zika é um arbovírus transmitido pelo vetor *Aedes aegypti* que apresenta grande distribuição no território brasileiro. Em Manaus a incidência da infecção ainda é alta. **Métodos:** Afim de avaliar a transmissibilidade do vírus ao *Aedes aegypti*, foram utilizadas duas metodologias, o xenodiagnóstico e a infecção experimental dos mosquitos em laboratório. **Resultados:** Dos participantes inclusos no estudo, todos os soros testados foram negativos para a presença de RNA viral bem como os mosquitos alimentados através do xenodiagnóstico. **Conclusão:** O período de viremia é curto e/ou os participantes tinham baixa carga viral o que levou a resultados negativos.

Keywords: Zika vírus, transmissibilidade, viremia.

A infecção por *Zika* vírus se inicia quando o mosquito *Aedes aegypti* realiza repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. A replicação viral se inicia nas células epiteliais

do intestino médio, em seguida pode ocorrer a passagem do vírus para hemolinfa e disseminação para outros órgãos e tecidos até a chegada na glândula salivar. Após infectar a glândula salivar, a transmissão do vírus poderá acontecer nos próximos repastos sanguíneos do mosquito vetor⁽¹⁾. As várias ingestões de sangue facilitam a transmissão do vírus e pode ajudar a delinear a epidemiologia da infecção, porém existem alguns fatores que podem influenciar essa dinâmica como o estado imunológico do hospedeiro, cepa do mosquito e fatores ambientais⁽²⁾. Existem muitos estudos que abordam a interação vírus-vetor, com o intuito de trazer conhecimentos a cerca dessa relação⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾. A febre por *Zika vírus* é uma arbovirose que se tornou de alta incidência na região tropical. O vírus foi isolado, pela primeira vez, em 1947, de um macaco Rhesus na floresta de Uganda, no continente africano. Um ano mais tarde, foi isolado de mosquitos *Aedes africanus* presentes na mesma localidade⁽⁶⁾. Desde então alguns surtos foram relatados até a grande epidemia ocorrida em 2015, no Brasil, onde a infecção foi associada a síndromes neurológicas e congênitas⁽⁷⁾⁽⁸⁾. Estudos foram realizados afim de responder perguntas existentes em relação ao vírus, e o papel desenvolvido pelo vetor potencial *Ae. aegypti*. O primeiro estudo realizado avaliando a transmissão de uma arbovirose para hospedeiro humano data do ano de 1906, onde mosquitos *Ae. aegypti* foram colocados para fazer repasto sanguíneo em pessoas infectadas com *Dengue vírus*⁽⁹⁾. O método de alimentação direta (xenodiagnóstico) foi realizado posteriormente por outros pesquisadores e foram importantes para entender a infecção do vírus no vetor e a infectividade dos pacientes⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾. Os estudos que tem como base a alimentação direta refletem a realidade epidemiológica, porém apresentam grandes limitações que vão desde a aprovação ética ao recrutamento de participantes que aceitem a participar do estudo utilizando essa metodologia. Em virtude desses obstáculos, a maioria dos estudos recorrem a metodologia de alimentação artificial por membrana⁽²⁾.

A maioria das infecções por ZIKV são leves podendo apresentar cefaleia, conjuntivite não-purulenta, exantemas e pruridos, ou se apresentar na forma de infecção inaparente, ou seja, com poucos sintomas ou sem sintomas⁽¹²⁾⁽¹³⁾. O objetivo do presente estudo foi avaliar o período de transmissibilidade do *Zika vírus* do hospedeiro humano ao vetor *Ae. aegypti*.

Participantes do estudo

Participantes que procuraram a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com exantema, clínica compatível de Zika, com baixa ou nenhuma leucopenia/trombocitopenia foi convidado a participar do estudo e apresentado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Os participantes convidados a participar foram aqueles maiores de 18 anos, homens e mulheres não grávidas.

Populações de Mosquitos

Para o teste de transmissibilidade pelo xenodiagnóstico foi usado uma população de *Ae. aegypti* de laboratório (PPcampos), colonizada a mais de 20 anos sem infecção por arbovírus. Em paralelo, utilizamos uma população recém colonizada de *Ae. aegypti* de Manaus para ensaios de infecção com sangue de participantes através de alimentador artificial.

Alimentação sanguínea infectante

Alimentação direta - O paciente foi exposto a picadas de *Ae. aegypti* divididos em duas gaiolas lacradas cobertas por uma rede, cada uma com 25 fêmeas (5-9 dias de idade), que foram colocadas no braço do paciente por 5 minutos.

Alimentação indireta – Foram coletados 10mL de sangue venoso em tubo de heparina. 5mL se destinaram a separação do soro para posterior análise de positividade viral e 5mL para alimentação por membrana. Esse tipo de alimentação é realizado com “aparelhos de alimentação artificial”, que são pequenos recipientes de vidro com capacidade de 300-500 μ l, conectados através de mangueiras finas. Cada recipiente foi revestido, na parte inferior, com membrana artificial de parafilm®, e preenchido com sangue heparinizado. A temperatura dos alimentadores foi mantida em 37°C e as mangueiras acopladas ao banho maria. Duas populações, contendo 50 mosquitos cada, foram utilizadas nessa etapa: P.P Campos e Manaus.

Avaliação da transmissibilidade

Os soros dos participantes da pesquisa foram testados por biologia molecular para avaliar a presença do ZIKV. Independentemente do resultado do soro, os mosquitos alimentados por via direta e indireta também foram testados para a presença do vírus

utilizando os mesmos métodos depois de 14 dias pós infecção (dpi). As amostras foram submetidas a extração pelo mini kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a presença e quantificação do cDNA viral foi feita em equipamento 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster CA, EUA). O conjunto de Primers e Sonda utilizados seguiu Lanciotti et al., 2008⁽¹⁴⁾.

Perfil de pacientes recrutados

No período de Março de 2017 à Abril de 2018 foram incluídos 36 participantes que tinham como principal sintoma o exantema. A prevalência foi de indivíduos do sexo feminino, com data de início dos sintomas até a inclusão (D0) de 4 dias. (Tabela 1).

Tabela 1 Variáveis sociodemográficas dos participantes

Variáveis	Participantes (n= 36)
Idade	33 [25-44]
Gênero	
Feminino	26 (72%)
Masculino	10 (28%)
D0	4 [3-7]

De cada participante foram testadas, por biologia molecular, a amostra de soro, pool de 5 mosquitos provenientes do xenodiagnóstico e pool de 5 mosquitos das populações P.P Campos e Manaus alimentação indireta. Para todos os tipos de amostras os resultados foram negativos para a presença do RNA de *Zika vírus*.

O diagnóstico clínico e epidemiológico das arboviroses são realizados, quase que exclusivamente, para a identificação dos casos. Isso ocorre devido ao alto custo dos métodos de diagnóstico molecular e os testes sorológicos apresentarem reação cruzada com outros vírus da mesma família que o Zika.

Outro fato relevante é a persistência do vírus na urina após a fase virêmica no sangue. Estudo realizado em 2016, por Pessoa e colaboradores, observaram que a amostra de

urina em comparação com a de soro apresentara um maior intervalo de tempo na persistência do vírus no organismo humano. E que, a baixa viremia do soro pode afetar no diagnóstico da infecção. Além da baixa viremia no sangue, amostras de urina coletadas a partir do 5º dia após o início dos sintomas apresentam taxas mais elevadas de carga viral ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾. Em contraste, o estudo realizado por Duong e colaboradores ressaltou que a viremia no soro apresenta níveis altos de carga viral dois dias antes do início dos sintomas, ou seja, quando a infecção é inaparente e após 6-8 dias após o aparecimento dos sintomas. Nossos achados sugerem que os participantes inclusos no estudo estariam infectados com o vírus Zika, pois apresentaram sintomas semelhantes ao da infecção no momento da inclusão, porém o método empregado não foi capaz de detectar uma possível carga viral baixa no sangue. A abordagem em relação ao D0 também deve ser levada em consideração, pois infecções inaparentes são fatores de confundimento para especificar a data de início dos sintomas, interferindo assim na conclusão do D0 e conseqüentemente na avaliação do período virêmico. Outro estudo elenca que há a detecção do vírus até o 3º dia da infecção ou até o aparecimento do exantema, o que explicaria a baixa viremia ou sua ausência ⁽¹⁸⁾. Além disso a alta produção de anticorpos durante a fase aguda da doença tendem a influenciar na infecciosidade do hospedeiro humano para o mosquito vetor ⁽¹⁹⁾, contribuindo assim com os nossos resultados, visto que os participantes procuraram a Fundação hospitalar após o aparecimento dos exantemas ou pruridos, levantando a hipótese de que o período de viremia no sangue é curto e não cause muitos sintomas e que provavelmente, quando há o aparecimento deles, o vírus já tenha alcançado outros fluídos corporais, como a urina. O pequeno número de participantes inclusos no estudo também pode influir nos resultados, visto que quanto maior o tamanho amostral maior o cenário real. A detecção de partículas virais após 3 dias do início dos sintomas se torna um desafio. O período curto de infecção inaparente, antes dos 3 dias, pode ser considerado crucial para a transmissão do vírus pelo vetor, uma vez que, a principal forma de transmissão é a vetorial. Neste contexto é necessário que mais estudos, com um maior número de participantes, sejam realizados afim de compreender a persistência do ZIKV na região.

Agradecimentos

Agradecemos à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do

Amazonas e o Laboratório de Entomologia Médica, Fiocruz, MG. pelo apoio prestado para que o estudo fosse desenvolvido.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Referências

1. Kramer LD, Ebel GD. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res.* 2003;60:187–232.
2. Lambrechts L, Failloux A. Vector biology prospects in dengue research. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(8):1080–2.
3. Li MI, Wong PSJ, Ng LC, Tan CH. Oral susceptibility of Singapore *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1792.
4. Souza-neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. Infection , Genetics and Evolution *Aedes aegypti* vector competence studies : A review. *Infect Genet Evol.* 2019;67:191–209.
5. Vega-rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux A, Lourenço-de-oliveira R. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. 2014;
6. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. Review An update on Zika virus infection. *Lancet.* 2017;390(10107):2099–109.
7. Zanluca C, Campos V, Melo A De, Luiza A, Mosimann P, Igor G, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(June):569–72.
8. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2017;1–9.
9. Bancroft TL. On the etiology of dengue fever. *The Australasian Med Gaz.* 1906;25:17.

10. Siler JE, Hall MW, Hitchens AP. Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippine J Sci.* 1926;29:1–302.
11. Simmons JS, St John JH, Reynolds FHK. Experimental studies of dengue. *Philippine J Sci.* 1931;44:1–247.
12. CDC. 2017 Case Counts in the US. 2017. Available: <https://www.cdc.gov/zika/reporting/2017-case-counts.html>
13. Haby MM, Pinart M, Reveiz L. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection : a systematic review. *Bull World Health Organ.* 2018;96:402–13
14. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;
15. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487–524.
16. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-larson L, Stanek D. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine , Serum , and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease — Florida , 2016. *Centers Dis Control Prev.* 2016;65(18):475–8
17. Pessôa R, Patriota J V, Souza M De, Wahed AA El, Sanabani SS. Detection of Zika virus in Brazilian patients during the first five days of infection – urine versus plasma. *Euro Surveill.* 2016;21(30):6–9.
18. Gourinat A, Connor OO, Calvez E, Goarant C. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84–6
19. Minh N, Thi D, Kien H, Vu T, Than N, Quyen H, et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *PNAS.* 2013;110(22):9072–7.

Impact of human anti-DENV and anti-ZIKV antibodies on vector competence of *Aedes aegypti* to *Zika virus*

Evelyn Beatriz da Costa Vaz¹, Barbara Aparecida Chaves¹, Ana Paula Marques Duarte¹, Andreia da Costa Paz¹, Ademir Bentes Junior¹, Aline Cristiane Corte Alencar¹, Wuelton Marcelo Monteiro¹, Nágila Francinete Costa Secundino^{1,2}, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra¹ and Paulo Filemon Paolucci Pimenta^{1,2}

¹ Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Amazonas, Brazil.

² Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

Abstract

The main arboviruses responsible for increasing the incidence of infected people in the world are caused by *Dengue* and *Zika virus*, the latter being responsible for the epidemic that occurred in Brazil in 2015, and which has caused worldwide concern for the association with syndromes and neurological complications. Both arboviruses are transmitted by the *Aedes aegypti* vector, as a primary vector. Some factors are involved in the transmission dynamics in the host-virus-vector triad, among them the *Aedes aegypti* vector competence and the host immunology that need to be understood in order to improve the arbovirus fighting. **Objective:** The objective of this study was to evaluate

the impact of human anti-DENV and anti-ZIKV antibodies on the vector competence of *Aedes aegypti* to the *Zika virus*. **Methodology:** Serum samples from participants included in the study were tested by serology, so that the immunoglobulin groups were chosen for the experimental infections. *Aedes aegypti* females, 4-9 days old, were infected with *Zika virus* in different immunoglobulin groups. On the 14dpi, the fed females were tested by molecular biology. With the results of the positivity test we were able to estimate the vector competence rates. **Results:** In all, 5 groups of females infected with different antibodies were evaluated, presenting different vector competence rates, showing that the mosquitoes were susceptible to the Zika virus. The group infected with anti-DENV antibody presented high infection rates and vector competence in relation to the other groups, while the groups infected with anti-ZIKV antibodies had lower infection rates. **Conclusion:** The vectorial competence of *Ae. aegypti* against the different Igs found a possible modulation of the infection when anti-ZIKV and anti-DENV Ig were present.

Key words: Zika virus, *Aedes aegypti*, vector competence, immunoglobulin

Introduction

Zika and Dengue are arboviruses transmitted mainly by hematophagous insects of the genus *Aedes* sp. and cause numerous epidemics around the world ⁽¹⁾. In Brazil, the most recent was the one caused by the Zika virus in 2015 and was a cause of great concern worldwide for its association with congenital syndromes⁽²⁾. The disease caused by Zika virus is an arbovirose whose first isolation was made in a Rhesus monkey, in the Uganda forest, in Africa. At the time, their isolation did not receive much attention because of the yellow fever epidemic that occurred in the region⁽³⁾.

The first epidemic caused by the virus occurred in 2007 on the island of Yap, in the Federated States of Micronesia⁽⁴⁾. Since then other epidemics have been emerging, reaching millions of people living in endemic areas with *Aedes aegypti* vector infestation, which is considered the potential vector⁽⁵⁾. In Brazil, in the year 2015, the first autochthonous cases of infected persons were reported. In the same period, the possible

relation of the virus with the congenital malformation of children born to mothers infected with the virus was verified⁽⁶⁾. This possible correlation, which was later proven by scientific studies, increased the concern with the virus's expansion⁽⁷⁾. Such expansion of the virus by its primary vector requires the ability of the virus to pass through physical and molecular barriers and multiply within the mosquito, which defines vector competence⁽⁸⁾. In addition to the barriers present in the vector, there are extrinsic factors capable of blocking the spread of the virus and preventing it from reaching the salivary gland, such as the nutritional status of the mosquito and the infectious dose⁽⁹⁾.

On the other hand, there are factors intrinsic to the vertebrate host that can modulate the infection in the vector. In performing the blood meal, the mosquito receives essential components for its nutrition, but also acquires specific proteins that can remain active in the intestine, as is the case of the antibodies⁽¹⁰⁾.

Species of ticks and flies are well understood that host antibodies cause them to reach the gut barrier, and some species remain for a long time in the gut⁽¹¹⁾. Although it is one of the main potential vectors of several arboviruses studies with *Ae. aegypti* are still rare and this interaction needs to be understood. In areas of the world where people are already immunized, the infected mosquito will be more likely to get Igs at the time of feeding.

These antibodies in turn may influence the development of the pathogen already present inside the mosquito⁽¹²⁾. But for this to be so, it is necessary that the antibodies can survive the performance of the digestive enzymes present in the intestinal lumen to have an effect on mosquito life⁽¹³⁾. In order to evaluate the impact that can occur with the presence of antibodies in *Aedes aegypti*, we proposed to infect the female mosquitoes with *Zika virus*, against different human antibodies of Dengue and Zika arboviruses.

Materials and Methods

Ethics Statement. This study was approved by Research Ethics Committee of the Dr. Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation (FMT-HVD) under CAAE protocol: 57781316.5.0000.0005.

Study Participants. Patients who sought the FMT-HVD with exanthema, a Zika compatible clinic with low or no leucopenia / thrombocytopenia were invited to participate

in the study and presented the Informed Consent Form. The patients invited to participate were those over 18 years of age, men and non-pregnant women.

Clinical data and blood collection. Data from the participants included in the study were collected through the epidemiological clinical questionnaire. The participant then underwent a routine medical visit to collect two samples of peripheral venous blood for evaluation of the infection and the hematological standard by means of a complete blood count.

Serum samples. Blood samples collected at the admission of participants were processed for serum separation which would later be used to be tested using the Biocan Divers Multiplex (Bionner) diagnostic kit for the detection of Zika and Dengue antibodies and the Dengue NS1 antigen according to the manufacturer's recommendations, as well as serving the mosquito's infectious blood meal. The molecular biology method qRT-PCR was also performed on serum samples ⁽¹⁴⁾.

Mosquitoes. For the study, mosquitoes from a well-established colony at the Medical Entomology Laboratory, Fiocruz-Minas Gerais, Brazil (PP-Campos strain) were used. The eggs were hatched and, after becoming adults, were kept in the Diptera colony of FMT-HVD Entomology management under ideal conditions with a temperature of 27°C, relative humidity of 80% and photoperiod of 16 h light / 8 h dark.

Virus. The ZIKV viral strain used for the mosquito infection experiments was derived from a Brazilian human isolate from the State of São Paulo (Zika SPH2015)⁽¹⁵⁾. The virus was amplified in *Aedes albopictus* C6 / 36 cell culture with Leibowitz-15 medium, supplemented with inactivated fetal bovine serum, 20 µg / ml Gentamicin, 5 µg / ml Amphotericin B and 200U / ml Penicillin⁽¹⁶⁾. Before infection the virus was quantified by titration in Vero cells (Plaque Forming Unit, PFU/mL) by standard plaque assay.

ZIKV infection of *Ae. aegypti*. Five hundred females of *Aedes aegypti* aged 4 to 9 days were divided into five groups and were infected with ZIKV through a membrane feeding assay using small inverted funnel glass containers with a capacity of 300-500 µl, bound through thin hoses for the water bath and covered in the inferior part with artificial membrane of Parafilm⁽¹⁷⁾. The virus titer of 2.05×10^5 PFU / ml of C6 / 36 cell supernatant

was mixed with washed red blood cells with PBS (2:1) and serum from patients and offered to females. They were left to feed for 30 minutes, after which time they were relocated to new cages and maintained with 10% sucrose solution for 14 days, time required for the viral infection process in the mosquito. The five groups were infected by: (i) ZIKV IgM, (ii) DENV IgG (iii) ZIKV IgM/IgG, (iv) ZIKV IgM/IgG + DENV IgG and (v) group control without any antibodies.

Viability of ZIKV. Macerated whole mosquitoes and salivary glands (SG) were inoculated in monolayers of Vero cells in 24 well plates. Cells were incubated for 5 days at 37°C then stained with a solution of crystal violet (1% in 22% ethanol and 100ml of water).

Real-time qPCR for quantification of ZIKV in mosquitoes. On the 14th day after infection, the females of the five infected groups were dissected into bodies / heads. These individual bodies and heads were macerated and processed for viral RNA extraction using the QiAmp mini-viral RNA kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The presence and quantification of viral cDNA was performed on the 7500 fast Real-Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster CA, USA) using the SYBR Green RNA-to-CT 1 - One Step Kit fluorophore (Applied Biosystems, Foster 13 CA, USA) with the following primers ZIKV-F: 5'TTGGTCATGATACTGCTGATTGC3 'and ZIKV-R: 5'CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC3'. The infection rate (IR) was calculated based on the number of blood-fed mosquitoes in which the virus was present in the body. The disseminated infection rate (DIR) was determined based on the proportion of infected heads of all infected bodies and the vector competence rate was calculated according to the infected heads of all blood-fed mosquitoes.

Statistical analyses. To evaluate the significance of viral copy medians between the groups, non-parametric tests such as the Shapiro Wilk and Wilcoxon-Mann-Whitney tests were used. The χ^2 tests or Fisher exact test were chosen to analyze the differences between vector competence rates and the intensity of infection (number of viral cDNA copies) of experimentally infected mosquitoes. All analyzes were done on GraphPad

Prism, version 7.00 (La Jolla, CA) and on STATA 13.0 software. Values were considered statistically significant when $P \leq 0.05$.

Results

Study Population

Serum samples were tested by molecular biology were negative for the presence of viral RNA. A serological test was performed on 15 serum samples and the immunological profile table was drawn for the presence of IgM and IgG class Igs in addition to DENV NS1 protein. Of these, 5 groups that best represented the distribution scenario of the Igs were chosen for the mosquito susceptibility test. Five groups were infected with *Zika virus* in the presence of different Igs: (i) ZIKV IgM, (ii) DENV IgG (iii) ZIKV IgM/IgG, (iv) ZIKV IgM/IgG + DENV IgG and (v) group control. (Table 2).

Table 2: Antibodies profile of participants.

ID	Days of onset	ZIKV		DENV		NS1
		IgM	IgG	IgM	IgG	-
27 (iv)	5	+	+	-	+	-
30 (v)	5	-	-	-	-	-
31 (ii)	4	-	-	-	+	-
34 (i)	4	+	-	-	-	-
36 (iii)	5	+	+	-	-	-

+ = Positive / - = Negative

Susceptibility of mosquitoes to ZIKV against different antibodies

All infected groups received the same infectious dose for comparative analysis. The groups were susceptible to ZIKV and presented viral copies in the bodies and heads (Figure 1).

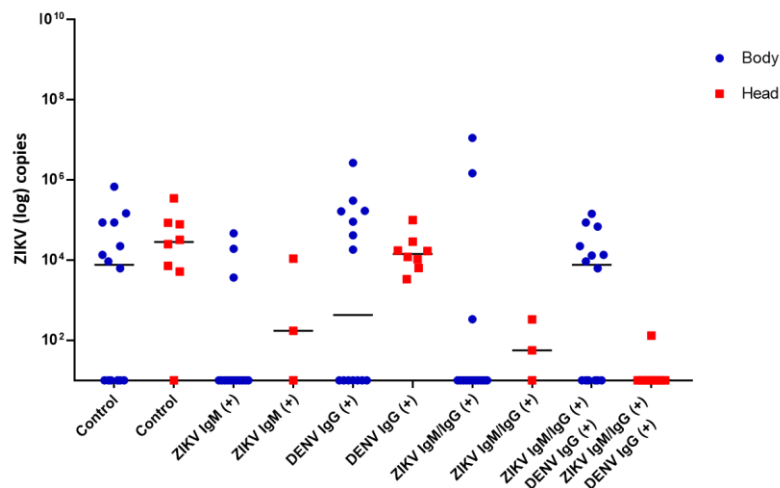


Figure 1 Demonstration of susceptibility of *Aedes aegypti* to different antibodies and development of infection in body and head

Infection rate

On the 14dpi, mosquitoes were tested to estimate infection rates (IR). The control group presented 50% IR, whereas the groups IgM ZIKV, IgG DENV, IgM / IgG ZIKV and IgM / IgG / ZIKV + IgG DENV had 15%, 60%, 10% and 40% IR respectively (Figure 2). Comparing the rates of the Control group with the ZIKV IgM and ZIKV IgM / IgG groups, the DENV IgG and ZIKV IgM and DENV IgG with ZIKV IgM / IgG showed significant differences ($p < 0.05$). Comparatively, the intensity of the infection (number of copies of the ZIKV cDNA) of the mosquito bodies was statistically different between the Control and ZIKV IgM, Control and ZIKV IgM / IgG and ZIKV IgM with ZIKV IgM / IgG + DENV IgG (* $p < 0.01$). In addition to the ZIKV IgM / IgG groups with DENV IgG (** $p < 0.003$) and ZIKV IgM with DENV IgG (***) $p < 0.0007$) (Figure 3).

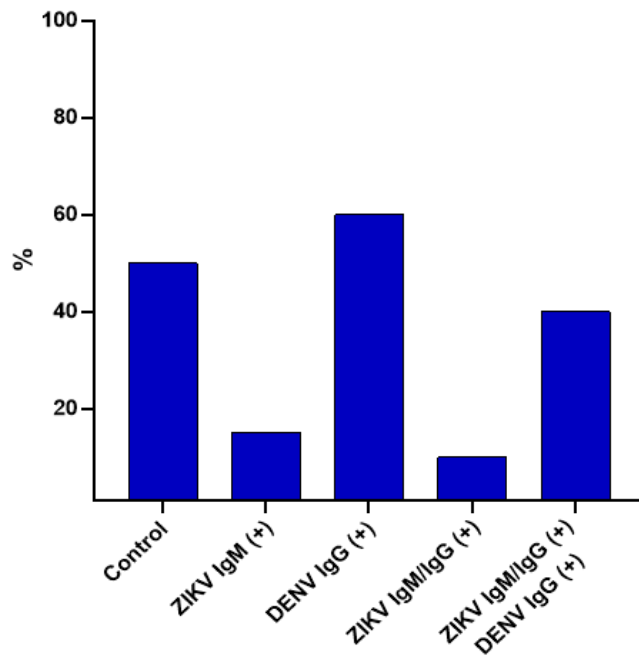


Figure 2: Infection Rate

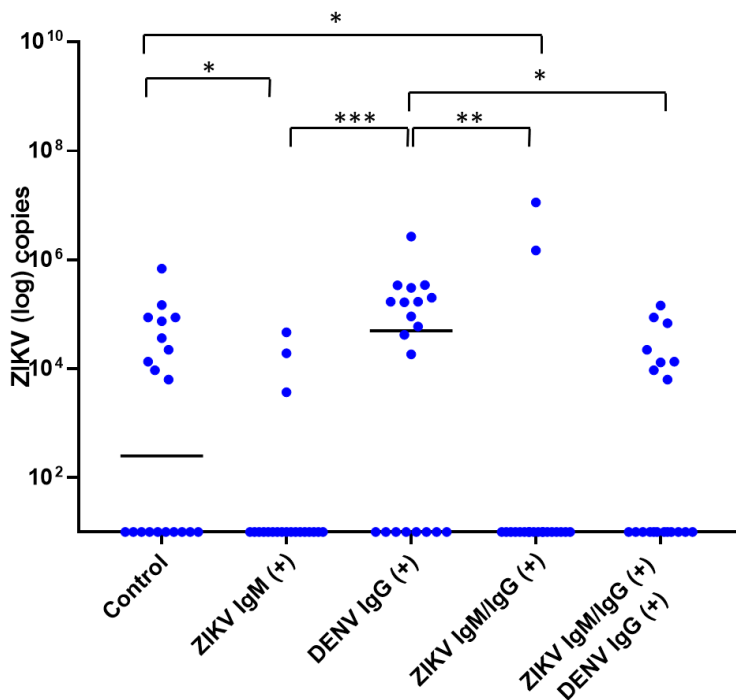


Figure 3 Quantification of cDNA number (intensity of infection) of the bodies of each group infected with ZIKV.

Analysis of Disseminated Infection Rates and Vector Competence rates

Disseminated Infection Rates

The DIR showed similarity between the groups infected with ZIKV IgM, DENV IgG and ZIKV IgM / IgG, with rates of 66%, 58% and 50%. It was also possible to observe a decrease in the rate of DIR in the ZIKV IgM / IgG + DENV IgG virus group (12%) compared to the control group ($p < 0.05$) (Figure 4). The intensity of infection in the mosquito heads was statistically different between the DENV IgG groups with ZIKV IgM / IgG + DENV IgG ($* p < 0.02$) and between the Control and ZIKV IgM / IgG + DENV IgG ($** p < 0.007$) (Figure 5). From IR and DIR data, the CV rate was calculated, according to Bennet et al., 2002 (Table 3).

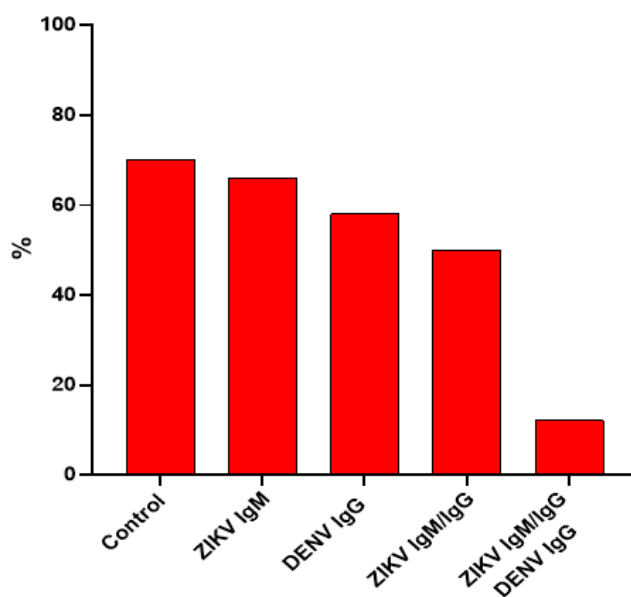


Figure 4 Disseminated Infection Rate

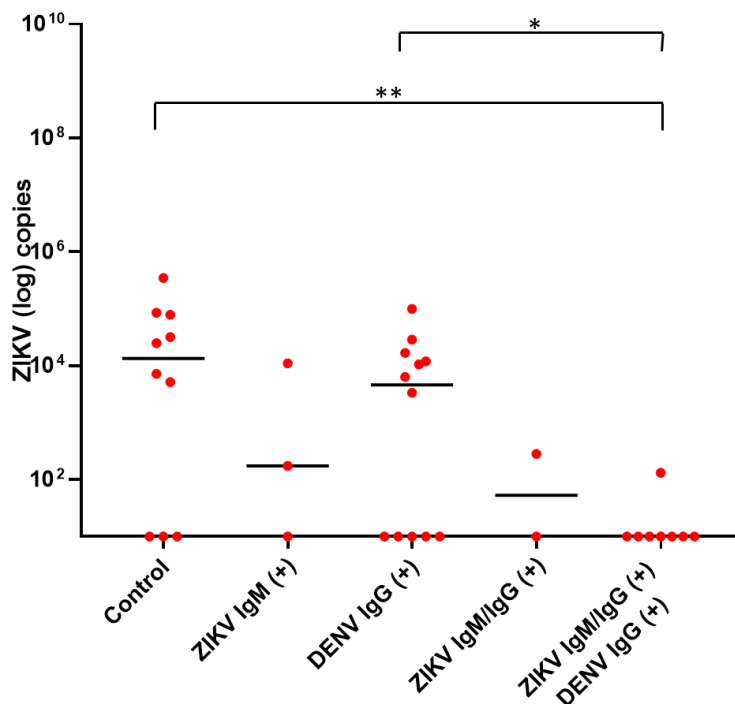


Figure 5 Quantification of cDNA number (intensity of infection) of the heads of each group infected with ZIKV.

Vector Competence rate

The analysis of VC rates was performed based on the positivity of the heads. The control group presented a 35% rate, as well as the DENV IgG group with 35%, the ZIKV IgM, ZIKV IgM / IgG and ZIKV IgM / IgG + DENV IgG groups presented rates of 10%, 5% and 5% respectively (table3). When comparing the rates, we analyzed the occurrence of significant differences between the control and ZIKV IgM / IgG, control and ZIKV IgM / IgG + DENV IgG groups, as well as differences between the DENV IgG and ZIKV IgM / IgG, DENV IgG and ZIKV groups IgM / IgG + DENV IgG ($p < 0.05$).

Table 3: Infection rates, disseminated and vector competence of *Aedes aegypti* to ZIKV.

Groups	Infection Rate*	Disseminated Infection Rate**	Vector Competence***
Control	10/20 (50%)	7/10 (70%)	7/20 (35%)
ZIKV IgM	3/30 (15%)	2/3 (66%)	2/20 (10%)

DENV IgG	12/20 (60%)	7/12 (58%)	7/20 (35%)
ZIKV IgM/IgG	2/20 (10%)	1/2 (50%)	1/20 (5%)
ZIKV IgM/IgG	8/20 (40%)	1/8 (12,5%)	1/20 (5%)
DENV IgG			

* Division of the total number of females with positive bodies by the number of females exposed to the virus.

** Division of number of females with positive head by number of females with positive body.

*** Division of the number of females with heads infected by the number of females exposed to the virus.

Evaluation of viral viability

To analyze the cytopathic effect, 5 SG of the ZIKV IgM group and 5 SG of the DENV IgG group were inoculated into Vero cells. As results, we obtained a greater cytopathic effect in the wells corresponding to the DENV IgG group than in the wells of the ZIKV IgM group, demonstrating high replication of ZIKV in the presence of anti-DENV antibodies.



Figure 6. Cytopathic effect in Vero cells. In A, control group. In B and C, ZIKV IgM and DENV IgG groups respectively.

Discussion

In our study, we demonstrated that different antibodies present in the serum of people with apparent symptoms of zika may influence ZIKV infection in *Ae. aegypti*.

Studies evaluating the impact of antibodies on the progress of mosquito infections are rare and date back to the 1980s. Some studies demonstrate the ability of antibodies to cross physical and chemical barriers, reaching hemolymph and remaining in it for varying times, depending on the species ^{(11) (12) (13)}.

Our data demonstrate that *Ae. aegypti* was susceptible to ZIKV and that the rates varied according to the types of antibodies, with DENV IgG being responsible for the increase of ZIKV infection in the vector. The high infection rates of the DENV IgG group suggest an increase in ZIKV replication by human anti-DENV antibodies. This fact has already been observed in vertebrate hosts with preexisting immunity to DENV, where after secondary infection by zika, an antibody-dependent enhancement (ADE) occurs resulting in a larger number of cells infected by Zika, causing in the human host greater viremia and severity even greater disease ^{(18) (19) (24)}. What could reflect on the infection of the vector, since when making the meal of blood, we ended up ingesting blood containing antibodies against Dengue. We obtained groups infected with anti-ZIKV antibodies that had lower infection rates than the control and the DENV IgG group. Studies have shown that acute-phase human antibodies can neutralize ZIKV depending on serum antibody concentration ⁽²⁴⁾.

Rates of disseminated viral infection remained high for the control and DENV IgG groups. Groups infected with ZIKV IgM and ZIKV IgM / IgG showed increased DIR relative to infection rate. While the ZIKV IgM / IgG + DENV IgG group decreased compared to the other groups. It is possible to observe that the antibodies of the same virus help in the dissemination of ZIKV, but when there is the presence of another type of antibody leads us to the hypothesis that there may be difficulty in passing the virus to the other tissues and organs of the vector.

The data obtained from the vectorial competence point to higher CV rates in the control and DENV IgG groups, while the other groups presented low rates. These results were confirmatory with the cytopathic effect observed in the cells where the glands of the mosquitoes were inoculated. The action of the viral particles was observed causing a greater cytopathic effect observed in the well of the DENV IgG group than in the well of the ZIKV IgM group. Suggesting that invasion of the gland can be facilitated against anti-DENV antibody.

Vector competence in the same mosquito population may differ in different geographic regions ^{(16) (20) (21)} and may also induce different amounts of ADE. Studies using different

strains of ZIKV showed distinct rates of DENV ADE, reflecting the low Zika infections in the presence of late antibodies to DENV. Possible reasons for these differences can be explained by the virus strain, the model used in the tests and the geographical location were different ⁽²²⁾ ⁽²³⁾.

The results presented in our study highlight the transmission potential of *Ae. aegypti* to ZIKV in the presence of late antibodies with DENV, suggesting that pre-existing dengue immunity may have contributed to the rapid spread of ZIKV and consequently the outbreak of epidemics. Epidemiological studies in humans and vectors are needed to better understand the impact of antibodies on infection.

Conclusion

It has been shown that the *Ae. aegypti* mosquito population is susceptible to ZIKV in the presence of different antibodies and that the anti-DENV IgG antibody has high infection rates compared to other antibodies.

The Vector Competence rate of *Ae. aegypti* was higher for the group infected with anti-DENV IgG antibodies. A potential transmission of the mosquitoes of the DENV IgG group of which the glands presented cytopathic effect in Vero cells was observed.

Acknowledgements

We thank the Postgraduate Program in Tropical Medicine of the State University of Amazonas and the Laboratory of Medical Entomology, Fiocruz, MG. for the support provided during the development of the study.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Pfeiffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors*. 2010;1–15.
2. Lessler J, Chaisson LH, Kucirka LM, Bi Q, Grantz K, Salje H, et al. Assessing the

- global threat from Zika virus. *Science* (80-). 2016;
3. Zhou H, Eaton B, Hu Z, Arif B. Accidental discovery and isolation of Zika virus in Uganda and the relentless epidemiologist behind the investigations. *Viol Sin.* 2016;31(4):357–61.
 4. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536–43.
 5. PAHO/WHO. Guideline for Zika virus disease and complications surveillance. In: Pan American Health Organization. Washington, D.C; 2016. p. 1–60.
 6. Zanluca C, Melo VCA De, Mosimann ALP, Santos GIV Dos, Santos CND Dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569–72.
 7. Lahorgue M, Regina C, Marinowic D, Kalil F, Holmer H, Comerlato M, et al. Microcephaly and Zika virus : a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak. *J Pediatr (Rio J)* . 2016;92(3):230–40.
 8. Valderrama A. Biochemical and Biophysical Research Communications Interaction of Flavivirus with their mosquito vectors and their impact on the human health in the Americas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;492:541–7.
 9. Hardy JL, Houk E, Kramer LD. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Med.* 1983;28:228–62.
 10. Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA, Drakeley C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol.* 2006;28(September 2005):143–53.
 11. Vaughan JA, Azad AF. Passage of Host Immunoglobulin G From Blood Meal into Hemolymph of Selected Mosquito Species (Diptera : Culicidae). *Entomol Soc Am.* 1988;88:472–4.
 12. Vaughan JA, Rosario V Do, Leland P, Adjepong A, Light J, Woollett GR, et al. *Plasmodium falciparum* : Ingested Anti-sporozoite Antibodies Affect Sporogony in *Anopheles stephensi* Mosquitoes. *Exp Parasitol.* 1988;182:171–82.
 13. Ramasamy M., Kay BH, Kidson C. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol.* 1988;87–93.
 14. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Alpha Sall A. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J Clin Virol.* 2008;43(1):96–101.
 15. Cunha MS, Alves L, Rocco M, Maeda Y, Silva G, Nogueira JS, et al. First

- Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae , Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Am Soc Microbiol.* 2016;4(2):2015–6.
16. Gonçalves CM, Melo FF, Bezerra JMT, Chaves BA, Silva BM, Silva LD, et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasit Vectors* . 2014;7:320.
 17. Secundino NFC, Chaves BA, Orfano AS, Silveira KRD, Rodrigues NB, Campolina TB, et al. Zika virus transmission to mouse ear by mosquito bite: a laboratory model that replicates the natural transmission process. *Parasit Vectors.* 2017;10(346):1–7.
 18. Bardina S V, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science (80-)*. 2017;356:1–6.
 19. Rodriguez-barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, Castanha PMS, Sacramento GA, Cruz J, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science (80-)*. 2019;610(February):607–10.
 20. Azar SR, Roundy CM, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, et al. Differential vector competency of *Aedes albopictus* populations from the Americas for Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(2).
 21. Ciota AT, Bialosuknia SM, Zink SD, Brecher M, Ehrbar DJ, Morrissette MN, et al. Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. 2017;23(7).
 22. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. 2016;353(6301):823–7.
 23. Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte EN, et al. Dengue virus envelope dimer epitope monoclonal antibodies isolated from dengue patients are protective against Zika virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;7(4):1–8.
 24. Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM, Nicholson CO, et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Nat. Commun.* 2016;1–9.

4. Limitações da pesquisa e perspectivas futuras

As limitações encontradas no estudo de avaliação da transmissibilidade estão voltadas para o difícil recrutamento dos participantes para a pesquisa, uma vez que uma das metodologias empregadas fora o xenodiagnóstico, que acabava gerando um certo receio.

Além do xenodiagnóstico, outro fator crucial para os resultados obtidos se atrela ao D0 dos participantes, que chegavam a FMT-HVD somente após o aparecimento de exantemas e sem viremia no sangue.

Quanto as perspectivas futuras, espera-se que mais estudos sejam realizados, em diferentes abordagens, a partir deste. Expandindo o entendimento acerca das implicações de Igs em vetores de doenças que causam impacto na saúde pública.

5. Conclusão

Os resultados encontrados contribuem para o entendimento da dinâmica de transmissão do *Zika vírus* por *Ae. aegypti*.

Objetivo específico 1: Analisar o período de transmissibilidade do *Zika vírus* de hospedeiros humanos para o vetor.

- O período virêmico parece ser curto e/ou os participantes selecionados tinham baixa carga viral o que levou a resultados negativos no xenodiagnóstico.

Objetivo específico 2: Avaliar a susceptibilidade de mosquitos ao ZIKV frente a diferentes imunoglobulinas.

- Os mosquitos são suscetíveis ao ZIKV na presença de diferentes Igs anti DENV e anti-ZIKV.

Objetivo específico 3: Estimar a taxa de infecção (TI), competência vetorial (CV) e a taxa de infecção disseminada (TID) de *Ae. aegypti* ao ZIKV;

- Para os grupos Controle, ZIKV IgM, DENV IgG, ZIKV IgM/IgG e ZIKV IgM/IgG + DENV IgG as taxas de infecção foram 50%,15%,60%,10% e 40% respectivamente. Taxas de infecção disseminada de 70%,66%,58%, 50% e 12%. E taxa de Competência Vetorial de 35%,10%,35%,5% e 5%.

6. Referências

1. Maria Rita D, Ricardo A, Freitas R, Paula A, Zuben B Von. Arboviroses emergentes no Brasil : desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. Rev. Saude Publica. 2017;10–15.
2. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. Antiviral Res. 2010;85:328–345.
3. McMichael AJ, Woodruff RE. Climate change and infectious diseases. In: Mayer KH, Pizer HF, editors. The social ecology of infectious diseases. Amsterdam: Elsevier; 2008. p.378-407..
4. Cleton NB, Reusken CBEM, Wagenaar JFP, Der EE Van. Syndromic Approach to Arboviral Diagnostics for Global Travelers as a Basis for Infectious Disease Surveillance. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015;1–15.
5. Patterson J. Western Journal of Emergency Medicine : Integrating Emergency Care

- with Population Health Dengue , Zika and Chikungunya : Emerging Arboviruses in the New World. *West. J. Emerg. Med.* 2016;XVII:671–679.
6. Tian Y, Zhou Y, Takagi T, Kameoka M, Kawashita N. Drug Discovery : Recent Progress and the Future Dengue Virus and Its Inhibitors : A Brief Review. *Chem. Pharm. Bull.* 2018;66:191–206.
 7. Anne NE. Epidemiology of dengue : past , present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* 2013;299–309.
 8. Salles TS, Sá-guimarães TE, Seam E, Alvarenga L De, Guimarães-ribeiro V, Damião M, et al. History , epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts : a review. *Parasit. Vectors.* 2018;1–12.
 9. *Epidemiol B. Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde.* 2018;49:1–14.
 10. Ríos-velásquez CM, Codeço CT, Honório NA, Sabroza PS, Moresco M, Cunha ICL, et al. Distribution of dengue vectors in neighborhoods with different urbanization types of Manaus , state of Amazonas , Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:617–623.
 11. Duca LM, Beckham JD, Tyler KL, Pastula DM. Zika Virus Disease and Associated Neurologic Complications. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19:1–8.
 12. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509–520.
 13. Haddow a J, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve Isolations of Zika Virus From *Aedes (Stegomyia) Africanus (Theobald)* Taken in and Above a Uganda Forest. *Bull. World Health Organ.* 1964;31:57–69.
 14. Duffy, Mark R., Chen, Tai-Ho., Hancock WT, Ann M. Powers Ph D, Kool JL, Ph D, Lanciotti RS, Ph D, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 2009;2536–2543.
 15. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19:7–9.
 16. Zanluca C, Melo VCA De, Mosimann ALP, Santos GIV Dos, Santos CND Dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015;110:569–572.
 17. *Epidemiological, Health W 47 of 2015. BM of. The public health Emergency Operations Center report on microcephaly.* 2015;48:2–4.

18. PAHO/WHO. Epidemiological Alert: Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. 2015;1–8.
19. World Health Organization. Situation report: Zika and potencial complications. 2016;1–6.
20. OMS. Doença do Zika vírus. Organ. Mund. da Saúde. 2016;1–8.
21. Brazil. Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde. 2019;50:1–14.
22. CDC. Zika virus. Centers Dis. Control Prev. 2016;1–4.
23. Zanluca C, Campos V, Melo A De, Luiza A, Mosimann P, Igor G, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:569–572.
24. Rabaan AA, Bazzi AM, Al-ahmed SH, Al-ghaith MH, Al-tawfiq JA. Overview of Zika infection , epidemiology , transmission and control measures. J. Infect. Public Health [Internet]. 2016;1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.007>
25. PAHO/WHO. Guideline for Zika virus disease and complications surveillance. In: Pan American Health Organization. Washington, D.C: 2016. p. 1–60.
26. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. Clin. Microbiol. Rev. 2016;29:487–524.
27. CHAN, J.F.W, Choy, G.K.Y, Yip, C.C.Y, Cheng, V.C.C, Yuen K. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. J. Infect. 2016;72:507–524.
28. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus Flavivirus. J. Virol. [Internet]. 1998;72:73–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9420202><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC109351>
29. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. PLoS Negl. Trop. Dis. 2012;6:e1477.
30. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. Estud. Avançados. 2008;22:53–72.
31. Consoli, Routraut AGB & Lourenço de Oliveira R, Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil [Internet]. 1994. Available from: <http://books.scielo.org/id/th>

32. Thomas W. Scott, Gary G. Clark, Leslie H. Lorenz, Priyane H. Amerasinghe, Paul Reiter JDE. Detection of Multiple Blood Feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) During a Single Gonotrophic Cycle Using a Histologic Technique. *J. Med. Entomol.* 1993;30:94–99.
33. Rey JR, O’Connell SM. Oviposition by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: influence of congeners and of oviposition site characteristics. *J. Vector Ecol.* 2014;39:190–6.
34. Woodring J, Higgs S, Beaty B. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: *Biology of Disease Vectors*. Boulder, CO: University Press of Colorado; 1996. p. 51–72.
35. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. 1998;11.
36. Hardy J. Susceptibility and resistance of vector mosquitoes. In: Monath T, editor. *Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1988. p. 87–126.
37. Bennett KE, Olson KE, Muñoz M de L, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, et al. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;67:85–92.
38. Miller B, Mitchell C. Genetic selection of a flavivirus-refractory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:399–407.
39. Gonçalves CM, Melo FF, Bezerra JMT, Chaves BA, Silva BM, Silva LD, et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasit. Vectors.* 2014;7:320.
40. Wong PJ, Li MI, Chong C, Ng L, Tan C. *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7:1–5.
41. Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Faye O, Gaye A, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect. Dis.* 2015;15:2–7.
42. Wahala WMPB, Silva AM De. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses.* 2011;3:2374–2395.
43. Schroeder H, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J. Allergy Clin Immunol.* 2013;125:41–52.

44. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. 2016;353:823–827.
45. Billingsley PE, Siqden RE. Determinants of Malaria-Mosquito Specificity. *Parasitol. today*. 1997;13:297–300.
46. Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA, Drakeley C. Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol*. 2006;28:143–153.
47. Ramasamy M., Kay BH, Kidson C. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol*. 1988;87–93.
48. Vaughan JA, Azad AF. Passage of Host Immunoglobulin G From Blood Meal into Hemolymph of Selected Mosquito Species (*Diptera : Culicidae*). *Entomol. Soc. Am*. 1988;88:472–474.
49. Vaughan JA, Rosario V Do, Leland P, Adjepong A, Light J, Woollett GR, et al. *Plasmodium falciparum* : Ingested Anti-sporozoite Antibodies Affect Sporogony in *Anopheles stephensi* Mosquitoes. *Exp. Parasitol*. 1988;182:171–182.

7. Anexo

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Xenovigilância e estudo da biologia do Zika vírus em vetores

Pesquisador: Bárbara Aparecida Chaves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57781316.5.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.742.035

Apresentação do Projeto:

Vide brochura original

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos

. Avaliar a competência vetorial e o período de transmissão do ZIKV do homem para o vetor e utilizar a xenovigilância para registro da ocorrência e da expansão da doença (inclusive detecção de possíveis reservatórios vertebrados do vírus) na áreas urbanas e peri-urbanas em Manaus.

-Comparar a infecção indireta, mais amplamente utilizada em trabalhos científicos, com a infecção direta de vetores.

- Verificar a taxa de infecção (TI), competência vetorial (CV) e a taxa de infecção disseminada (TID) das duas espécies de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* de Manaus;

-Avaliar a susceptibilidade de mosquitos da cidade de Manaus ao ZIKV.

-Usar a xenovigilância como uma nova ferramenta para detecção do ZIKV

-Identificar animais possíveis reservatórios não humanos do ZIKV

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para coletar a amostra de sangue da veia do braço, você poderá sentir um pouco de dor, mas que deve parar dentro de alguns minutos. Se a limpeza do braço não for correta, pode haver uma

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.742.035

infecção, mas isto é

muito raro e se acontecer será acompanhada por nossa equipe de trabalho. Os mosquitos que serão utilizados no projeto são de colônia de laboratório a 20 anos estabelecida e livre de qualquer outro patógeno e por isso não vão transmitir nenhuma doença ao te picar.

Benefícios:

O estudo sobre a competência vetorial e transmissibilidade irá mostrar o potencial de expansão do ZIKV por populações de mosquitos da região norte do Brasil. Esse conhecimento, assim como dados epidemiológicos gerados pela xenovigilância podem ser decisivos na mudança e direcionamento das ações de combate ao vetor.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver Conclusões

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos avaliados neste relato (título, versão e data)

Foram adicionados para apreciação neste parecer os seguintes documentos:

1. Folha de Rosto (documento em pdf) sem versão nem data
2. Anuência entomologia (documento em pdf) sem versão nem data
3. Anuência Pesclin (documento em pdf) sem versão nem data
4. Anuência virologia (documento em pdf) sem versão nem data
5. Instrumento de coleta de dados (documento em pdf) sem versão nem data
6. Projeto ZikaV (documento em pdf) sem versão nem data
7. TCLE (documento em pdf) sem versão nem data

Recomendações:

Solicita-se ao pesquisador que ao dar resposta a este parecer, redija um documento chamado de carta resposta, onde constem em baixo de cada pendência aqui apontada, a resposta a tal pendência, o nome, versão e data de última edição do documento onde consta a alteração solicitada assim como o teor da mesma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências documentais

1. Todos os documentos foram enviados em pdf; tanto o projeto de pesquisa como o TCLE devem ser enviados também em versão "word" que permite o recurso "copiar e colar" a fim de solicitar a elaboração do parecer. Solicita-se adequação.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.742.035

O projeto de pesquisa e o TCLE foram também anexados no formato .doc a Plataforma Brasil.

PENDÊNCIA ATENDIDA

2. A folha de rosto ficou com problemas na digitação sendo sua parte superior ilegível, solicita-se carregá-la novamente.

A folha de rosto foi novamente carregada.

PENDÊNCIA ATENDIDA

3. Não foi adicionado ao protocolo de pesquisa, o termo de anuência da Gerência da DAM lugar onde o potencial participante de pesquisa será identificado e recrutado, solicita-se adequação.

A anuência da DAM tinha sido carregada com o nome "Anuencia_Pesclin.pdf", foi carregada novamente como DAM.

PENDÊNCIA ATENDIDA

1- Considerações Metodológicas

a) Os critérios de elegibilidade não são específicos em relação às participantes de sexo feminino sobre presença ou ausência de gestação, solicita-se adequação. No item 5.1.1 foi acrescentado mulheres não grávidas aos critérios de elegibilidade.

2- Pendências no TCLE

a) o documento "TCLE" anexado não está identificado com versão, data nem página. Como o mesmo documento possui mais de uma página solicita-se a numeração das mesmas assim como campo para rubrica tanto do participante da pesquisa como do pesquisador naquelas em que a assinatura completa não estiver registrada. Solicita-se adequação.

RESPOSTA:

Foi identificada a versão e data. As páginas foram enumeradas e os campos de assinatura do participante da pesquisa e do pesquisador (página 3) e na página 1 e 2 consta espaço para rubrica.

PENDÊNCIA ATENDIDA

b) O documento "TCLE" está escrito em parágrafo único o que pode representar dificuldade na sua leitura e compreensão por parte do participante de pesquisa. No mencionado parágrafo na linha 12 inicia a seguinte frase: "Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto"

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.742.035

o que pode representar um juízo e não esclarece ao participante em que consiste propriamente sua participação, adicionalmente o procedimento de extração de sangue venosa está pobremente descrito, com que será feito? Qual quantidade (medida de volume que o participante consiga visualizar tal como uma colher de chá ou de café ou meia xícara) de sangue será retirada? O que o participante de pesquisa poderá sentir ao momento?

Quais riscos ele corre durante o procedimento e quais serão as medidas tomadas para minimizar tais riscos? O mesmo deve ser considerado para o procedimento de retirada de sangue através da picada do vetor. solicita-se adequação

RESPOSTA:

Foi desfeito o parágrafo único, portanto o texto foi dividido em parágrafos. A frase "Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto" foi retirada do texto, deixando claro que o paciente será convidado por ser diagnosticado com Zika. A descrição dos procedimentos que o voluntário será submetido também foi melhor descrita no texto (parágrafos 2, 3 e 4).

PENDÊNCIA ATENDIDA

c) No documento "TCLE" na linha 13 lê-se: "você será atendido e se tiver as características da doença poderá participar do estudo", faz-se necessário descrever ao participante estas características que podem deixar ele fora do seguimento mesmo tendo disposição de participar e quando a identificação destas características ocorrerá? Solicita-se adequação.

RESPOSTA:

A frase "você será atendido e se tiver as características da doença" foi retirada e em seu lugar foi colocado que o paciente será convidado por ser diagnosticado pelo médico com Zika (2º parágrafo, linha 2).

PENDÊNCIA ATENDIDA

d) No documento "TCLE" não constam na integra os itens IV.3. do a) ao h). e do item IV.5.d). Solicita-se que ao redigir o novo documento, todos estes itens estejam contidos; dar especial atenção ao item IV.3.g) considerando que o participante será avaliado na FMT-HVD em pelo menos oito oportunidades isto deve ser melhor explicitado ao participante afirmando também que ele tem direito a ser ressarcido pelos gastos que sua participação na pesquisa lhe gere. A frase "se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que eles possam lhe ajudar" não garante em forma afirmativa o direito de ressarcimento. Solicita-

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.742.035

se adequação.

RESPOSTA:

O texto foi revisado segundo os itens sugeridos. E a frase "se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que eles possam lhe ajudar" foi reformulada, deixando claro o ressarcimento em caso de prejuízo. Em relação aos retornos e ao ressarcimento com o deslocamento foi descrito no paragrafo 6.

PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_738142.pdf	11/09/2016 12:10:30		Aceito
Folha de Rosto	Folharosto.pdf	11/09/2016 12:09:39	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	11/09/2016 12:04:54	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoZIKAV.doc	11/09/2016 12:01:02	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao2_06_2016.docx	11/09/2016 11:56:08	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anuencia_DAM.pdf	11/09/2016 11:52:14	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Outros	Anuencia_Virologia.pdf	11/07/2016 10:40:58	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Outros	Anuencia_Pesclin.pdf	11/07/2016 10:40:38	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Outros	Anuencia_Ambulatorio.pdf	11/07/2016	Bárbara Aparecida	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.742.035

Outros	Anuencia_Ambulatorio.pdf	10:40:10	Chaves	Aceito
Outros	Anuencia_Entomologia.pdf	11/07/2016 10:39:33	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	11/07/2016 10:37:27	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_ZIKAV.pdf	11/07/2016 10:36:38	Bárbara Aparecida Chaves	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 23 de Setembro de 2016

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

8. Apêndices

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Xenovigilância e estudo da biologia do Zika vírus em vetores

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está estudando a transmissão do Zika. Os pesquisadores querem entender melhor como o vírus da Zika é transmitido das pessoas para os mosquitos. Quando um mosquito pica uma pessoa com Zika os vírus que estão no sangue desta pessoa passam para o mosquito, e dessa forma o mosquito se torna capaz de passar o Zika para outras pessoas, espalhando a doença. O mosquito que transmite Zika é o mesmo que transmite outras doenças como a Dengue. Porém nós não sabemos o período que a pessoa com Zika pode ficar com o vírus e passar para o mosquito. Para nos ajudar a entender melhor esse processo, precisamos do sangue de pessoas com Zika para infectar mosquitos diretamente e em laboratório. Por isso convidamos você a participar deste estudo.

Este é um estudo sobre transmissão do Zika, que deve durar em torno de 3 (três) diretamente do seu sangue com o vírus. Esses mosquitos são de laboratório e por isso não vão passar nenhuma doença ao te picar, os mosquitos ficarão em contato com a sua pele durante 5 minutos.

Para coletar a amostra de sangue da veia do braço, você poderá sentir um pouco de dor, mas que deve parar dentro de alguns minutos. Se a limpeza do braço não for correta, pode haver uma infecção, mas isto é muito raro e se acontecer será acompanhada por nossa equipe de trabalho. O volume de sangue coletado é pequeno, 10 mL o que corresponde a dois tubos de sangue, e não representa risco para a saúde. Após a agulha ser retirada, o sangramento será contido com uma pequena bandagem (do tipo band-aid). Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar num pequeno (1 cm) hematoma. Entre em contato com os responsáveis do estudo em caso de hematomas ou infecções no local

Rubrica participante da pesquisa: _____

Rubrica pesquisador: _____

Versão 3 - -6/2017

da inserção da agulha. Nestes casos, se necessário, você receberá tratamento. A coleta de sangue será feita por pessoa com treinamento e experiência, para diminuir qualquer desconforto. Um dos tubos de sangue será usado para fazer um exame de rotina, que conta células do seu sangue e o resultado desse exame será usado para caracterizar infecções por zika.

Depois da coleta de sangue serão colocadas duas gaiolinhas plásticas com mosquitos (25 mosquitos em cada) em cada braço. Essas gaiolas ficaram em contato com a sua pele durante 5 minutos, permitindo que os mosquitos que estão na gaiola suguem o seu sangue com o vírus. Durante esse período você poderá sentir um leve desconforto e coceira, nesse caso ao fim do tempo será passado um creme para aliviar a coceira.

A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde em decorrência deste projeto, você terá direito à indenização. O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão do Zika vírus, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Com o diagnóstico e melhor entendimento de como a doença é transmitida, é possível que haja uma diminuição do número de casos de Zika em nossa região. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que eles possam lhe ajudar e fazer o ressarcimento. Se em qualquer momento você quiser se retirar do estudo, você poderá fazer isso, e mesmo assim terá direito ao atendimento, ao exames e ao tratamento se for o caso. Você não terá nenhum custo e não receberá qualquer vantagem financeira.

Você está convidado a retornar a Fundação de Medicina Tropical em datas que serão marcadas para repetir todo o procedimento de coleta de sangue e exposição aos mosquitos como descrito acima. Se você achar necessário você será ressarcido a cada retorno pelos gastos com o deslocamento. Somente assim poderemos saber até quando uma pessoa com Zika pode transmitir o vírus para o mosquito e assim espalhar a doença.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores na Fundação de Medicina Tropical para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá fazer contato com a Bárbara Aparecida Chaves, pesquisadora

Rubrica participante da pesquisa: _____

Rubrica pesquisador: _____

responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 8 às 12 horas e das 14 às 18 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 98100-1089 (qualquer dia e horário), ou com Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda pelo telefone (92) 99114 7633. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá prestar esclarecimentos ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas, na Av. Pedro Teixeira, 25, Bairro Dom Pedro) ou pelo telefone (92) 2127 3572 (de segunda a sexta feira, das 9 às 14 horas). Este TCLE foi elaborado em duas vias iguais, sendo que uma via assinada ficará guardada com o pesquisador responsável e a outra com você.

Eu,, entendi tudo sobre o estudo de "**Xenovigilância e estudo da biologia do Zika vírus em vetores**" e autorizo a minha participação e o uso do meu material coletado nesse estudo ou em estudos futuros.

Assinatura do voluntário (ou responsável)

..... Data: / /

Endereço:.....

..... Telefone: (...)



Polegar direito

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

..... Data: / /



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

GERÊNCIA DE ENTOMOLOGIA

Código POP	POP_ENT_LB_002_v02_PT	Página 1/3
Título	Infecção artificial por Membrana	
Idioma da versão original	Português	
Elaborado por: Evelyn Vaz	Revisado e Aprovado por: Dr. Henrique Silveira Condinho	Data de aplicação: 15 de junho de 2018
Data & assinatura		Data da próxima revisão: 15 de junho de 2019
	Data & assinatura	

1. OBJETIVOS

Descrever a metodologia da infecção via membrana.

2. DEFINIÇÕES

A técnica de alimentação via membrana apresenta inúmeras vantagens e permite estudos relacionados a concentração de microrganismos no sangue para infectar artrópodes hematófagos, além de auxiliar na avaliação do desenvolvimento de parasitas sem a influência do sistema imune do hospedeiro. A técnica ainda oferece uma maior segurança no manuseio de patógenos se comparada com outras técnicas que empregam hospedeiros naturais.

3. APLICÁVEL A

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, biomédicos e biólogos ou qualquer outro membro da equipe.

4. RESPONSABILIDADES

As atividades ficam à cargo dos responsáveis pelos seus respectivos projetos.

5. RECURSOS NECESSÁRIOS

5.1 Materiais:

- 5.1.1 Descarte
- 5.1.2 Hipoclorito
- 5.1.3 Álcool etílico
- 5.1.4 Gaze
- 5.1.5 Alimentadores artificiais
- 5.1.6 Mangueiras
- 5.1.7 Fita crepe
- 5.1.8 Pipetas de vidro
- 5.1.9 Pêra
- 5.1.10 Rack
- 5.1.11 Raquete elétrica
- 5.1.12 Parafilme
- 5.1.13 Bomba de aquário
- 5.1.14 Luva

5.2 Equipamentos:

- 5.2.1 Banho Maria
- 5.2.2 Freezer

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Infecção indireta por Membrana:

- 6.1.1 Preparar as gaiolas com filó e elásticos, vedar com luva e fechar com algodão a entrada das mesmas;
- 6.1.2 Acrescentar água ao banho-maria, ligar e deixar a temperatura de 37°C;
- 6.1.3 Para a preparação do circuito, conectar as mangueiras aos alimentadores artificiais e certificar que os mesmos estejam bem seguros. Posteriormente, ligar o circuito à bomba e testar que a água percorra todo o circuito;
- 6.1.4 Colocar o sangue nos alimentadores com auxílio da pipeta de vidro.
- 6.1.5 Após todos os alimentadores estiverem preenchidos, passar fita crepe por cima deles para deixá-los firmes sobre as gaiolas e depois conectar a bomba de aquário na tomada.

- 6.1.6 Colocar os mosquitos para a alimentação, pelo período estabelecido em cada protocolo;
- 6.1.7 Após o período de alimentação, desligar a bomba de aquário e o banho maria. Ir retirando as mangueiras com cuidado e colocar os alimentadores no descarte contendo hipoclorito e água.
- 6.1.8 As mangueiras deverão serem limpas com álcool etílico.

6.2 Manipulação e manutenção dos mosquitos após alimentação

Este procedimento deve ser realizado dentro da sala de manipulação e a manutenção na sala dos infectados, para evitar riscos.

- 6.2.1 Após a alimentação, os mosquitos serão levados para a sala de manipulação, onde os alimentados serão separados e colocados em novas gaiolas;
- 6.2.2 Os mosquitos não alimentados, serão colocados no freezer para posterior descarte;
- 6.2.3 Para a manutenção dos mosquitos, eles estarão na sala dos infectados com a temperatura e a umidade ideais.

7. LIMITAÇÕES

8. REFERÊNCIAS

1. Gonçalves CM, Melo FF, Bezerra JMT, Chaves BA, Silva BM, Silva LD, et al. Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. *Parasit Vectors*. 2014;7:320.
2. Secundino NFC, Chaves BA, Orfano AS, Silveira KRD, Rodrigues NB, Campolina TB, et al. Zika virus transmission to mouse ear by mosquito bite: a laboratory model that replicates the natural transmission process. *Parasit Vectors*. 2017;
3. Pina IG, Fonseca AH. Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (diptera : culicidae) alimentados artificialmente com sangue de diferentes doadores. *Rev Patol Trop*. 1999;28(1):28–31.

9. ANEXOS

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LAB_26_v02_PT		
Título	<i>Titulação de Zika vírus em células</i>		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Bárbara Aparecida Chaves	Revisado por: Bárbara Aparecida Chaves	Aprovado por: Marcus V. G. Lacerda Maria Paula Gomes Mourão	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões			
Nome	Assinatura	Data (DD/MM/AA)	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

Titular *Zika vírus*, multiplicado em células de mosquito C6/36, em monocamadas de células VERO.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

A titulação do vírus dengue em células VERO pode ser feita pelo biólogo, biomédico ou qualquer outro membro da equipe apto para essa ação.

3. SIGLAS

SFB	Soro Fetal Bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
BHK	Células renais de hamster filhote (do inglês <i>Baby Hamster Kidney</i>)
L-15	Leibowitz-15
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFU	Unidades Formadas de Placas (do inglês <i>Plaque-Forming Unit</i>)
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de Carbono
mL	Mililitro
µL	Microlitro

4. DEFINIÇÕES

A titulação do *Zika vírus* consiste na inserção de uma quantidade conhecida de vírus nas placas com células previamente cultivadas.

5. RESPONSABILIDADES

As pessoas responsáveis pela implantação e pelo treinamento nos procedimentos presentes neste POP são: PI, farmacêuticos - bioquímicos e os demais profissionais por ele designado.

6. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA O PROCEDIMENTO

- Vórtex;
- Pipetador automático;
- Câmara de Neubauer para contagem de células;
- Placas de 6 poços novas e estéreis para cultivo celular;
- Vírus a ser titulado;
- Pipetas de 5 e 10 mL;
- Álcool 70%;
- SFB (Soro Fetal Bovino);
- PBS (Tampão Fosfato-Salina) 1X estéril;
- Meio DMEM;
- Tripsina;

- Células VERO;
- Estante para tubos;
- Tubos estéreis de 1,5 mL;
- Tubos estéreis de 15 mL e ou 50mL;
- Cristal Violeta 1%;
- Azul de Tripán 0,4%;
- Solução Formol 10%;
- CMC (Carboximetilcelulose a 0,8% suplementado com 3% de SFB).

7. PROCEDIMENTOS PARA TITULAÇÃO DO VÍRUS DENGUE EM CÉLULAS VERO

DIA 1

Procedimento 1 – Repique, contagem e distribuição de células VERO em placas de 6 poços ou 12 poços

- a. Retirar o meio da garrafa com pipeta sorológica;
- b. Adicionar 5-8 mL de PBS 1X pré-aquecido a 37° C para lavagem das células;
- c. Remover todo o PBS;
- d. Adicionar 2 mL de tripsina pré-aquecida a 37° C;

Deixar por 1 minuto à temperatura ambiente ou até a monocamada começar a ficar opaca.

- e. Remover toda a tripsina, deixando na garrafa apenas uma película recobrimdo as células e incubar por mais 30 segundos a 37° C ou até a monocamada soltar do frasco (dar leves batidas na garrafa);
- f. Adicionar 3 mL de meio DMEM com 5% de SFB + 1% antibiótico;
- g. Ressuspender com pipeta (aspirar e soltar células com pipetador na parede da garrafa para obter suspensão de célula única);
- h. Transferir suspensão de células para um tubo Falcon 50 mL e fazer contagem em câmara de Neubauer:
 - Pipetar em um eppendorff 180 µL de solução de azul de tripan 0,4% e adicionar 20 µL das células do repique (diluição 1:10);
 - Homogeneizar bastante e adicionar 10 µL desta suspensão celular na câmara de Neubauer. Encostar a ponta da pipeta na borda da lamínula e preencher cuidadosamente a câmara com os 10 µL da diluição;
 - Fazer a contagem no microscópio óptico e calcular a quantidade de células. Contar 4 quadrantes e dividir por 4 e multiplicar por 10⁵ para obter o número de célula presente em 1mL.

Adicionar $2,5 \times 10^5$ células Vero/poço em placas de 12 poços, ou $1,25 \times 10^5$ células Vero/poço em placa de 24 poços, sendo, respectivamente 2 mL e 1 mL o volume/poço de meio DMEM suplementado com 5% de SFB + 1% de antibióticos (PSA);

- Incubar em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até observar monocamada de 80 a 90% para infecção viral.

DIA 2

Procedimento 2 – Infecção viral

Observar confluência de 80 a 90% nas placas previamente incubadas;

- a. Descongelar alíquota do lote de vírus mantendo em banho de gelo;
- b. Preparar as diluições do vírus a ser titulado em tubos eppendorf estéreis. Para tal, adicionar 1,080 mL de meio de cultura DMEM (sem soro) em 8 tubos, usando P1000 (ponteiras estéreis);
- c. No primeiro tubo adicionar 120 µL da suspensão viral e homogeneizar com vórtex em velocidade baixa por 10 segundos;
- d. Com nova ponteira, transferir 120 µL da diluição 1:10 (tubo 1) ao tubo 2 (para obter diluição 1:100);
- e. Vortexar e transferir 120 µL para tubo 3 e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁶ ou 10⁻⁷;
- f. Reservar um tubo para o controle de células. É necessário criar o mesmo ambiente para as células que não contêm o vírus;

Tubo 8 – controle de células (não adicionar vírus)

Tubo 1 - 1:10 (diluição 10⁻¹)

Tubo 2 -1:100 (diluição 10⁻²)

Tubo 3 - 1:1000 (diluição 10⁻³)

Tubo 4 - 1: 10000 (diluição 10⁻⁴)

Tubo 5 - 100.000 (diluição 10⁻⁵)

Tubo 6 – 1.000.000 (diluição 10⁻⁶)

Tubo 7 – 10.000.000 (diluição 10⁻⁷)

Caso queira, pode optar por descartar a diluição 10⁻¹, pois nessa diluição possivelmente terá uma alta concentração de partículas virais que irão destruir toda a monocamada de células, portanto, sendo inviável a contagem de placas de lise.

- g. Após diluições prontas, remover o sobrenadante das placas de células feitas no dia anterior e adicionar 1 mL (no caso de placas de 24 poços) ou 2mL (placas de 12 poços) de cada diluição aos respectivos poços e suas duplicatas;

Observação: Adicionar as diluições seriadas do vírus e controle de células aos respectivos poços começando sempre a partir do controle de células e seguindo da maior para a menor diluição (figura 1).

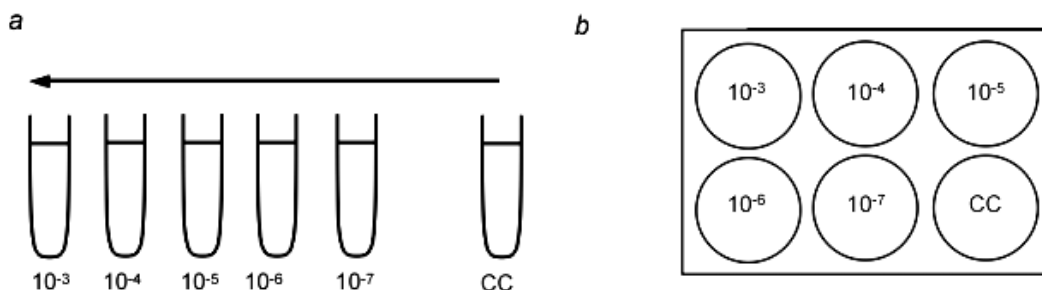


Figura 1 - Esquema da sequência de inoculação. Em (a) sequência de inoculação. Em (b) a identificação referente às aliquotas na placa. Antes de transferir a aliquota para o poço, homogeneize. Comece pelo controle de célula seguindo da maior diluição para a menor. Não há necessidade de trocar a ponteira.

- h. Incubar a placa a 37°C em atmosfera 5% de CO₂ por 1 hora e homogeneizar o meio nas placas de 15 em 15 minutos para garantir a adsorção viral e uma melhor distribuição da suspensão viral às células (figura 2);

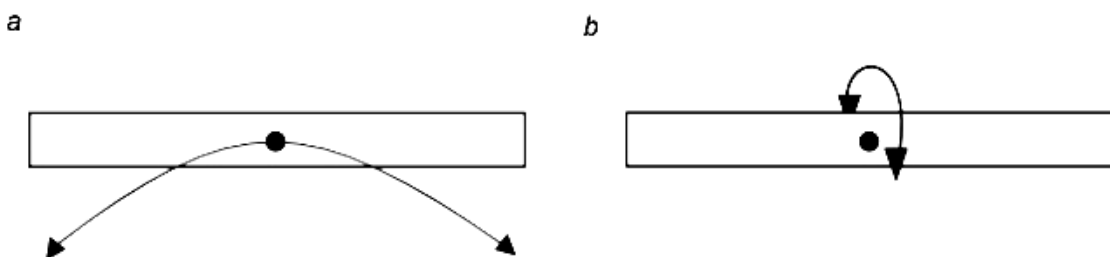


Figura 2 - Homogeneização do líquido sobre a monocamada. Em (a) o movimento "direita-esquerda" e em (b) o movimento "frente-trás".

- i. Após a adsorção viral, retirar o sobrenadante de cada poço e adicionar/poço ± 2 mL ou 1mL de meio com Metil celulose a 0,8% suplementado com 3% de SFB e 1% de antibióticos
- j. Incubar a placa à 37°C em 5% de CO₂ durante 5 dias.

DIA 7

Procedimento 3 – Fixação e colocação da monocamada para contagem de PFU/mL

- a. Descarte o meio com Metil celulose da placa, e lave os poços cuidadosamente com PBS 1X.
- b. Retire o excesso de PBS com uma ponteira.

- c. Completar cada poço com solução formol a 10% para inativar o vírus e fixar a monocamada;
- d. Aguardar 1h e 30 minutos em temperatura ambiente;
- e. Desprezar o formol vertendo as placas;
- f. Enxaguar em torneira de pia, com água em abundância, para retirar o excesso de meio, tomando cuidado para não direcionar o jato de água diretamente na camada celular;
- g. Em seguida, adicionar cristal violeta a 1% para coloração, até cobrir completamente o fundo do poço e deixar por 15 minutos;
- h. Lavar todos os poços com água corrente, tomando cuidado para não direcionar o jato de água diretamente na camada celular;
- i. Deixar a placa de repouso com os poços voltados para baixo até secar completamente;
- j. Contar as placas de lise ou unidades formadoras de placas (PFU).

Cálculo da titulação:

$$\text{PFU/mL} = n \times \text{FC} \times 10^*$$

Onde:

n = número de placas de lises contadas

FC = fator de correção

10* = inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de n

FC é o número pelo qual o valor do inóculo utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha 1 mL.

Nesse caso, como utilizou-se de 500 mL de inóculo de suspensão viral na monocamada celular, multiplica-se por 2.

Caso tivesse utilizado 1000 µL, multiplicaria por 1.

Caso tivesse utilizado 100 µL, multiplicaria por 10.

8. ANEXOS

Título	Mudanças ou traduções realizadas

9. DECLARAÇÃO

Este documento refere-se à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

10. REFERÊNCIAS

- 1- DIAMOND, M. S.; EDGIL, D.; ROBERTS, T. G.; LU, B. & HARRIS, E. Infection Human Cells by Dengue Vírus Is Modulated by Different Cell Types and Viral Strain. *Journal of Virology*, p. 7814-7823, 2000.
- 2- RIZZO, E. de; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. *Técnicas básicas de cultura celular*. São Paulo, Instituto Butantan/ Instituto Adolfo Lutz, p. 133, 1983.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP		POP_IPCCB_LAB_26__v01_PT	
Título		Extração de RNA Viral - Estudo HOSTZIKA	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Bárbara Aparecida Chaves	Revisado por: Bárbara Aparecida Chaves	Aprovado por: Marcus V. G. Lacerda Maria Paula Gomes Mourão	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões			
Nome	Assinatura	Data (DD/MMM/AA)	Alterações realizadas

OBJETIVO

Extrair o material genético (RNA) de vírus presente em amostras biológicas.

CAMPO DE APLICAÇÃO

A extração de RNA Viral pode ser feita pelo biólogo, biomédico ou qualquer outro membro da equipe apto para esse procedimento.

SIGLAS

AVL	Tampão de lise
AW1	Tampão de lavagem 1
AW2	Tampão de lavagem 2
AVE	Tampão RNase free
PBS	Tampão Fosfato-Salina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
r.p.m	Rotação por minuto
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro

DEFINIÇÕES

Consiste na extração de RNA viral presente em amostra biológica.

RESPONSABILIDADES

As pessoas responsáveis pela implantação e pelo treinamento nos procedimentos presentes neste POP são: PI, farmacêuticos - bioquímicos e os demais profissionais por ele designado.

MATERIAIS NECESSÁRIOS PARA O PROCEDIMENTO**Kit QIAamp® Viral RNA**

- Colunas QIAamp Mini Spin
- Tubos coletor de 2ml;
- Tampão AVE;
- Tampão AVL;
- Tampão AW1 e AW2;

Outros materiais e equipamentos:

- Amostra biológica (Soro, plasma, urina);
- PBS 1X (estéril);
- Microtubos 1,5mL (DNase, RNase free);
- Microcentrífuga;
- Agitador Vórtex.
- Etanol 96-100%;
- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (10-100µL, 100-1000µL)

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

- **RNA transportador (Carrier RNA)**

Adicione 310 µl de tampão AVE ao tubo contendo 310 µg de RNA transportador liofilizado para obter uma solução de 1 µg / µl. Dissolva o RNA transportador completamente, divida-o em tamanho convenientemente (alíquotas) e armazene entre -30 e -15 ° C. Não congele e descongele as alíquotas do RNA transportador por mais de 3 vezes.

- **Tampão AW1 E AW2**

Buffer AW1 e AW2 são fornecidos concentrados. Antes de usar pela primeira vez, adicione a quantidade de etanol (96–100%) conforme indicado na garrafa e na Tabela abaixo. O tampão AW1 é estável por 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente (15–25 ° C), mas somente até a data de validade do kit.

Kit para 50 reações	Volume de Etanol para adicionar	Volume final
AW1	25mL	44 mL
AW2	30mL	43 mL
Kit para 250 reações	Volume de Etanol para adicionar	Volume final
AW1	130 mL	228 mL
AW2	160 mL	226 mL

- **Tampão AVL-RNA transportador**

O tampão AVL-RNA transportador deve ser preparado fresco, conforme a tabela abaixo. A solução é estável à 2–8 ° C por até 48 horas.

No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)	No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.4	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

Esta solução desenvolve um precipitado quando armazenado a 2–8 ° C, que deve ser redissolvido pelo aquecimento a 80 ° C antes de usar. Não aqueça a solução de RNA transportador Buffer AVL mais de seis vezes. Não incubar a 80 ° C por mais de 5 minutos. O aquecimento freqüente e a incubação prolongada causar degradação do RNA transportador, levando à redução da recuperação do RNA viral e resultados falso-negativos de RT-PCR.

PROCEDIMENTO PARA A EXTRAÇÃO DE RNA VIRAL

- i. Adicionar em tubos 1,5mL: 560 µL da mistura tampão AVL + RNA carreador e 140 µL da amostra a ser testada(soro, plasma, urina, sobrenadante de mosquitos macerados);
- j. Vortexar por 15 seg cada tubo, em seguida, deixar incubar por 10 min a temperatura ambiente;
- k. Adicionar 560 µL de etanol (96-100%) em cada tubo contendo as amostras. Homogeneizar por 15 segundos em vortex. Centrifugar (spin);
- l. Retirar 630 µL da solução acima e colocar na coluna de mini-spin com filtro e tubo coletor de 2ml. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Fazer este procedimento com todo o conteúdo descartando o filtrado;
- m. Após filtrar todo o conteúdo, transferir a coluna contendo o RNA para um novo tubo coletor;
- n. Adicionar 500 µL do tampão AW1 na coluna. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Transferir a coluna para um novo tubo coletor e descartar o filtrado;
- o. Adicionar 500 µL do tampão AW2 na coluna. Centrifugar a 14000 rpm por 3 min. Certifique-se de que todo o tampão se encontra tubo coletor, não pode haver resquícios de tampão na coluna. E necessário centrifugue novamente a 14000rpm por 1min. Descarte o tubo coletor.
- p. Transferir a coluna para tubos de 1,5ml devidamente identificados.
- q. Adicionar 60 µL de tampão AVE na coluna com filtro. Incubar por 1 min à temperatura ambiente;
- r. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min, após o procedimento descartar a coluna e armazenar o material em freezer -80°C.

ANEXOS

O link abaixo dá acesso ao protocolo com todas as instruções do kit (QIAamp Viral RNA Mini Handbook):

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>

Título	Mudanças ou traduções realizadas
--------	----------------------------------

--	--

DECLARAÇÃO

Este documento refere-se à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO**INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA****FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO**

Código POP		POP_IPCCB_LAB_26__v03_PT	
Título		RT-qPCR	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Evelyn Beatriz C. Vaz	Revisado por:	Aprovado por: Bárbara A. Chaves	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões			
Nome	Assinatura	Data (DD/MMM/AA)	Alterações realizadas

OBJETIVO

Detectar *Zika vírus*, através de um método rápido, sensível e específico, em amostras clínicas humanas e mosquitos.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, biomédicos e biólogos ou qualquer outro membro da equipe treinado.

SIGLAS

PCR	Reação em Cadeia Polimerase
RT	Transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucléico
Primer F	Primer Forward
Primer R	Primer Reverse
µl	Microlitro
°C	Graus Celcius
U.V.	Ultravioleta
SYBR	Fluoróforo Syber

DEFINIÇÕES

A técnica de PCR de transcrição reversa em tempo real de tubo único (RT-PCR) permite a detecção e identificação do vírus Zika em mosquitos e também em amostras clínicas, utilizando primers específicos. O kit One Step RT-PCR inclui componentes otimizados que permitem que tanto a transcrição reversa quanto a amplificação por PCR ocorram na mesma mistura de reação em uma reação de "um passo".

RESPONSABILIDADES

As atividades ficam à cargo dos responsáveis pelos seus respectivos projetos. Fica vedado o manuseio por outros usuários não treinados.

Lista de Materiais

Pipetas: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl.

Ponteiras: 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl.

Tubos tipo eppendorf

Luvas nitrílicas

One Step RT-PCR –Power SYBR® Green RNA-to-Ct™ kit (Part No.: 4389986) Lote: 1707101 validade: 14/09/2019

Placa de 96 poços (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 mL ThermoFisher 4366932

MicroAmp™ Optical Adhesive Film Thermo Fisher 431197

Iniciadores: Primer Forward e Primer Reverse

Água Miliquê

RNA extraído

Procedimentos

One Step RT-PCR

Ligar o fluxo e limpar a capela com álcool 70%.

Deixar esterilizar por 15 minutos na U.V.

Ligar a máquina Fast Real Time PCR.

Preparar o mix de acordo com os valores já pré-estabelecidos, multiplicando sempre pelo número de amostras a serem testadas.

Lembrar de contar com o Controle positivo e negativo. E fazer o cálculo para 2 amostras a mais, devido a erros de pipetagem.

Mix	uL (1 reação)
Água	3,75
Tampão	7,5
Enzima	0,15
Primer F	0,3
Primer R	0,3
Total	12

- Homogeneíze o mix com a pipeta, com cuidado.
- Distribua 12 uL em cada poço;
- Fora do fluxo, na bancada, acrescente 3uL do RNA extraído em seus respectivos poços. Após este procedimento, vedar a placa com filme ótico e levar a centrífuga de placas.
- Levar a placa até a máquina de PCR.
- No software, mudar a opção de corrida para 7500 standard (next)
- Selecionar o alvo e o fluoróforo: ZIKV SYBR green → adicionar (next)
- Marcar os poços que possuem material (finish)
- Abrir a aba Instrument e mudar o primeiro step para 48°C 30min
- Adicionar a curva de dissociação e mudar o volume da reação para 15uL, salvar e clicar em Start.

Anexos

Título	Mudanças ou traduções realizadas

Declaração

Este documento se refere à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

Referências

Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Alpha Sall A. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. J Clin Virol. 2008;43(1):96–101.