



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

**GISLENE GARCIA DE CASTRO LICHES**

**ESTUDO MOLECULAR DE PATÓGENOS EMERGENTES E  
REEMERGENTES NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM  
ARBOVIROSES NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL.**

**CAMPO GRANDE - MS**

**2023**

**GISLENE GARCIA DE CASTRO LICHES**

**ESTUDO MOLECULAR DE PATÓGENOS EMERGENTES E  
REEMERGENTES NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM  
ARBOVIROSES NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada como exigência parcial à obtenção do grau de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Profa. Dra. Alexandra Rodrigues Mendonça Favacho e coorientação Profa. Dra. Zoraida del Carmen Fernandez

**CAMPO GRANDE - MS**

**2023**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, e ter me acompanhado nos momentos mais difíceis na execução deste trabalho.

Aos meus pais que sempre acreditaram e me apoiaram em minhas decisões.

A meu esposo que inúmeras vezes cobriu minha ausência para que eu pudesse me dedicar ao Mestrado, sempre me incentivando.

Aos meus filhos que sempre demonstraram compreensão com a importância do tempo gasto com meus estudos e trabalho.

A minha orientadora Dra. Alexandra Favacho, pelo aceite da orientação, pela sua confiança, paciência, carinho, conselhos, compreensão com minhas atividades de trabalho, além do mestrado e ensinamentos repassados que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

A minha coorientadora Dra. Zoraida Fernandez, por não medir esforços na orientação e suporte necessários que foram fundamentais na execução do estudo, sem falar nas risadas, conversas e incentivo, sem os quais este trabalho seria muito difícil de ser realizado.

Ao Dr. Felipe Naveca pelo apoio nesta pesquisa e por compartilhar seu conhecimento de forma tão generosa e por ser prova viva de que a grandeza está na simplicidade.

A querida Valdinete Alves por seu suporte analítico sempre com extrema simpatia e simplicidade.

Ao Dr. Daniel Maximo por sua valiosa contribuição na análise estatística e por sua paciência em repassar seu conhecimento.

Ao Dr. Everton Lemos por todo apoio, cooperação e importância dada ao estudo.

A Dr<sup>a</sup> Ana Cecília, do Instituto Evandro Chagas, por nos fornecer os controles positivos de arbovirus para as análises e incentivo.

A Dra Luciane Amado, do Instituto Oswaldo Cruz, por ceder gentilmente o controle positivo de parvovirus B19 para as análises desse estudo.

Ao diretor do LACEN/MS, Luiz Henrique Demarchi pelo constante incentivo e apoio, e também da Secretaria de Estado de Saúde em nome da Larissa Castilho e Dr<sup>a</sup> Crhistine Maymonne pela oportunidade que me deram na realização desta pós-graduação.

Aos amigos e colegas do LACEN-MS pelo suporte emocional e porque sempre estiveram presentes direta ou indiretamente em todos os momentos de minha formação, e afirmo com muita alegria que foram muitos. Desde o processo inicial da seleção do Mestrado me apoiaram, sempre acreditando que eu conseguiria e que no decorrer deste me ajudaram muito. Dos colegas antigos tive o suporte e apoio e dos mais recentes, suas experiências inovadoras e soluções

práticas foram excelentes para a renovação do ânimo. Guardo na memória e no coração cada gesto, cada olhar de aprovação, cada ensinamento oferecido, cada palavra de incentivo, e entre elas uma que muito me emocionou após a qualificação: “ Eu orei por você ontem”.

A todas as pessoas que colaboraram na realização desta pós-graduação.

## RESUMO

A emergência de arboviroses em locais vulneráveis (regiões com condições favoráveis a manutenção do vetor, com vulnerabilidade social e econômica e com populações susceptíveis aos arbovírus) representa um potencial desafio para a Saúde Pública no Brasil. Além das arboviroses, outras doenças com similaridade de sintomas, circulando simultaneamente são subdiagnosticadas por falta, entre outros fatores, da implantação de testes diagnósticos específicos na rotina laboratorial. Esse trabalho buscou analisar a ocorrência de patógenos até então, pouco estudados no estado, em amostras encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul (LACEN-MS). Trata-se de um estudo epidemiológico, ambidirecional, baseado em análise molecular de Mayaro, Oropouche, Eritrovírus B19 e Nilo Ocidental em amostras biológicas com suspeita de dengue, zika e chikungunya, porém negativas na PCR e sorologicamente, no período de 2017 a 2022. Um total de 773 amostras foram submetidas à amplificação por PCR com protocolos já validados pela Fiocruz Amazônia. O DNA de Eritrovírus B19 (B19V) foi detectado em 10,6% das amostras examinadas, e entre elas 10 eram de gestantes. As amostras positivas para B19V foram sequenciadas e a reconstrução filogenética mostrou que todas as amostras pertencem ao genótipo 1a (G1a). Os resultados comprovam a importância da inclusão de B19V no diagnóstico laboratorial diferencial, não apenas para fins epidemiológicos, mas também para a conduta do tratamento adequada ao paciente. Apesar da ausência de evidências moleculares de MAYV, OROV e WNV nas amostras examinadas, reiteramos a importância da vigilância integrada para detectar a circulação de arbovírus negligenciados e emergentes no Brasil e na construção de diferentes ações para os desafios na interface animal-humano-ecossistema (Saúde Única). São muitos os casos que, apesar dos sintomas clínicos levarem a suspeita clínica de arboviroses, os resultados laboratoriais são negativos, o que dificulta o diagnóstico no serviço de saúde. Desta forma, nossos resultados reforçam a necessidade de fortalecimento e integração das vigilâncias epidemiológica, vetorial e laboratorial, a fim de ampliar as investigações de patógenos circulantes e direcionarmos métodos de controle e prevenção contra essas doenças no estado de Mato Grosso do Sul e em todo o país, uma vez que a população está suscetível a esses patógenos.

Palavras-chave: Arboviroses, Eritrovirus B19, Vigilância, diagnóstico diferencial.

## ABSTRACT

The emergence of arboviruses in vulnerable locations (regions with favorable conditions for the maintenance of the vector, with social and economic vulnerability and with populations susceptible to arboviruses) represents a potential challenge for Public Health in Brazil. In addition to arboviruses, other diseases with similar symptoms that circulate simultaneously are underdiagnosed due to, among other factors, the lack of implementation of specific diagnostic tests in routine laboratory procedures. This work sought to analyze the occurrence of pathogens, until then, little studied in the state, in samples sent to the Central Public Health Laboratory of Mato Grosso do Sul (LACEN-MS). This is a two-way epidemiological study based on molecular analysis of Mayaro, Oropouche, Erythrovirus B19 and West Nile viruses in biological samples suspected of dengue, zika, and chikungunya but that tested negative by PCR and serology from 2017 to 2022. A total of 773 samples were subjected to PCR amplification using protocols previously validated by Fiocruz Amazonia. Erythrovirus B19 (B19V) DNA was detected in 10.6% of the samples examined, including 10 from pregnant women. The B19V-positive samples were sequenced, and phylogenetic reconstruction showed that all samples belonged to genotype 1a (G1a). These results demonstrate the importance of including B19V in differential laboratory diagnosis, not only for epidemiological purposes but also for appropriate patient management. Despite the absence of molecular evidence of MAYV, OROV, and WNV in the examined samples, we reiterate the importance of integrated surveillance to detect the circulation of neglected and emerging arboviruses in Brazil and to develop different actions to address the challenges at the animal- human-ecosystem interface (One Health). Many cases have symptoms that lead to clinical suspicion of arboviruses, but laboratory results are negative, making diagnosis in health services difficult. Therefore, our results reinforce the need to strengthen and integrate epidemiological, vector, and laboratory surveillance to expand investigations of circulating pathogens and to direct methods of control and prevention against these diseases in the state of Mato Grosso do Sul and throughout the country, as the population is susceptible to these pathogens.

Keywords: Arboviruses, Erythrovirus B19, Surveillance, Differential diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Propriedades pandêmicas dos vírus zoonóticos que se propagam dos animais para os seres humanos e por transmissão secundária entre humanos.....	17
<b>Figura 2</b> – Mapa global de rotas de transporte aéreo. ....	18
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática da estrutura de um <i>Flavivírus</i> . A partícula viral consiste da proteína do envelope (E), a proteína de Membrana (M), a proteína da Cápside (C) e o genoma tipo RNA.....	20
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática do genoma de um <i>Flavivírus</i> . A poliproteína está representada na cor cinza, as proteínas estruturais (C, prM/M e E) estão representadas nas cores verde, rosa vermelha e amarela respectivamente. As não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) nas cores azul, azul claro, azul escuro e cinza .....	22
<b>Figura 5</b> - Distribuição do vírus do Nilo Ocidental nas Américas. ....	23
<b>Figura 6</b> - Ciclo de Transmissão do vírus do Nilo Ocidental.....	24
<b>Figura 7</b> - Viremia e resposta humoral ao Vírus do Nilo Ocidental: cronologia de marcadores clínicos e de diagnóstico durante a infecção por WNV.....	27
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da Estrutura de um <i>Togavírus</i> .....	28
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do Genoma de um <i>Togavírus</i> .....	29
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática da estrutura de um Peribunyavirus. ....	31
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática da estrutura e genoma dos <i>Erythroparvovirus</i> - Eritrovírus B19.....	35
<b>Figura 12</b> - Fluxograma do desenho experimental do presente estudo .....	44
<b>Figura 13</b> - Etapas para sequenciamento no sistema MiSeq (Illumina) .....	50
<b>Figura 14</b> - Número de amostras com resultado "detectável" (Positivo) e "não detectável" (Negativo) para o B19V, no período de 2017 a 2022. ....	56
<b>Figura 15</b> - Amostras de arboviroses pesquisadas no LACEN/MS e seus resultados em comparação com B19V, no período de 2017 a 2022.....	57
<b>Figura 16</b> - Faixa etária e sexo dos pacientes amostrados. N:número de pacientes amostrados por faixa etária .....	58

<b>Figura 17</b> - Casos positivos de B19V, segundo os municípios do estado de Mato Grosso do Sul, durante o período de 2017 a 2022 .....	59
<b>Figura 18</b> - Frequência dos sintomas e faixa etária dos casos de B19V, no estado de Mato Grosso do Sul (2017 a 2022). .....	60
<b>Figura 19</b> - Amplificação e detecção de B19V em amostras com Cq variando de 4 a 37. ....	61
<b>Figura 20</b> - Amplificação e detecção de B19V em amostras com Cq variando de 20 a 37. ....	61
<b>Figura 21</b> - Análise filogenética dos Eritrovírus: Sequências do MS (iniciadas por MS seguida por número comparadas com sequências padrões no GenBank. ....	64
<b>Figura 22</b> - Estimativas do modelo linear generalizado misto das características dos pacientes e período. Pontos preenchidos indicam as variáveis significativas ( $p < 0.05$ ), enquanto as barras representam o intervalo de confiança 95% .....	65
<b>Figura 23</b> - Estimativas do modelo linear generalizado dos sintomas. Pontos preenchidos indicam as variáveis significativas ( $p < 0.05$ ), enquanto as barras representam o intervalo de confiança 95% .....	66
<b>Figura 24</b> - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2017. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (setas tracejadas). ....	70
<b>Figura 25</b> - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2018. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (setas tracejadas). ....	71
<b>Figura 26</b> - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2019. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (seta tracejada). ....	72
<b>Figura 27</b> - Amplificação dos CP de MAYV e OROV (reação duplex) .....	76
<b>Figura 28</b> - Amplificação dos CP de WNV.....	77

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil .....	19
<b>Quadro 2</b> - Doenças causadas pelo B19V. ....	38
<b>Quadro 3</b> - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de OROV/MAYV .....	46
<b>Quadro 4</b> - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de WNV .....	47
<b>Quadro 5</b> - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de B19V .....	48
<b>Quadro 6</b> – Sequencias de oligonucleotídeos utilizadas para detecção do B19V .....	49
<b>Quadro 7</b> - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de DENV por ano ....	53
<b>Quadro 8</b> - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de CHIKV por ano	54
<b>Quadro 9</b> - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de ZIKV por ano ....	54
<b>Quadro 10</b> - População do estudo por ano e os casos positivos de B19V. ....	55
<b>Quadro 11</b> - Casos positivos de B19V em amostras de gestantes. ....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Número de amostras usadas no estudo em cada ano. ....	43
<b>Tabela 2</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de MAYV e OROV ....	46
<b>Tabela 3</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de WNV .....	43
<b>Tabela 4</b> - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de B19V. ....	48
<b>Tabela 5</b> - Informações como sexo, idade, carga viral, principais características clínicas e genótipo dos pacientes B19V positivos sequenciados. ....	63
<b>Tabela 6</b> - Estimativas do modelo linear generalizado misto das características dos pacientes e período, com o intervalo de confiança 95% entre colchetes. ....	67
<b>Tabela 7</b> - Estimativas do modelo linear generalizado misto dos sintomas, com o intervalo de confiança 95% entre colchetes. ....	68
<b>Tabela 8</b> - Resultado para os dados do ano de 2017, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc. ER = razão entre AICc $w_i$ do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s) .....	73
<b>Tabela 9</b> - Resultado para os dados do ano de 2018, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc. ER = razão entre AICc $w_i$ do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s) .....	74
<b>Tabela 10</b> - Resultado para os dados do ano de 2019, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc. ER = razão entre AICc $w_i$ do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s) .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>B19V</b>	Vírus Eritrovírus B19
<b>CDC</b>	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
<b>CHIKV</b>	Virus Chikungunya
<b>Cq</b>	Quantification cycle
<b>CP</b>	Controle Positivo
<b>DE</b>	Doença exantemática
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DENV</b>	Vírus Dengue
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático)
<b>GAL</b>	Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>ILMD</b>	Instituto Leônidas e Maria Deane
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>LACEN-MS</b>	Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>MAYV</b>	Vírus Mayaro
<b>OROV</b>	Vírus Oropouche
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PNH</b>	Primatas não-humanos
<b>PRNT</b>	Teste de Neutralização por redução de Placas
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>ROCV</b>	Vírus Rocio
<b>RT</b>	Transcrição Reversa
<b>RT-qPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, conjugada à transcrição reversa.
<b>SES</b>	Secretaria Estadual de Saúde
<b>VEEV</b>	Vírus da Encefalite Equina do Leste
<b>ZIKV</b>	Vírus Zika
<b>WNV</b>	Vírus do Nilo Ocidental
<b>YFV</b>	Vírus da Febre Amarela

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>16</b>
2.1	ARBOVIROSES .....	16
2.1	FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE .....	20
2.1.1	<i>O vírus do Nilo Ocidental</i> .....	22
2.1.1.1	Hospedeiros e reservatórios naturais .....	24
2.1.1.2	Sintomas e patogenia .....	25
2.1.1.3	Diagnóstico .....	25
2.1.1.4	Tratamento e prevenção .....	27
2.2	FAMÍLIA TOGAVIRIDAE .....	28
2.2.1	<i>O vírus Mayaro</i> .....	29
2.2.1.1	Hospedeiros e reservatórios naturais .....	30
2.2.1.2	Sintomas e patogenia .....	30
2.2.1.3	Diagnóstico .....	31
2.3	FAMÍLIA PERIBUNYAVIRIDAE .....	31
2.3.1	<i>Vírus Oropouche</i> .....	32
2.3.1.1	Sintomas e patogenia .....	32
2.3.1.2	Diagnóstico .....	33
2.3.1.3	Hospedeiros e reservatórios naturais (ecologia) .....	33
2.4	FAMÍLIA PARVOVIRIDAE .....	34
2.4.1	<i>Eritrovírus B19</i> .....	35
2.4.1.1	Genótipos variantes do eritrovírus B19 .....	37
2.4.1.2	Sintomas e patogenia .....	37
2.4.1.3	Diagnóstico .....	38
2.4.1.4	Tratamento e prevenção .....	39
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	42
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
5.1	LOCAL DO ESTUDO .....	42
5.2	TIPO DE ESTUDO .....	42
5.3	APROVAÇÃO ÉTICA .....	42
5.4	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO .....	42
5.5	DADOS SECUNDÁRIOS DOS PACIENTES .....	43
5.6	ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS .....	43
5.6.1	<i>Extração de ácido nucléico viral</i> .....	44

5.6.2	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i> .....	45
5.6.3	<i>Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-qPCR)</i> ...	45
5.6.4	<i>Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR)</i> .....	47
5.6.5	<i>Interpretação dos resultados da RT-qPCR e qPCR</i> .....	48
5.6.6	<i>Sequenciamento</i> .....	48
5.7	ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	50
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O surgimento ou a identificação de um novo problema de saúde gerado por agente infeccioso é definido como doença emergente. Doenças reemergentes, são aquelas já conhecidas que estavam sob controle e que sofreram alteração na incidência da doença, voltando a ameaçar a saúde do homem. Um instrumento fundamental para o bom desempenho sistema de saúde no controle das doenças emergentes e reemergentes é a vigilância com forte apoio laboratorial (WALDMAN, 2015) com o reforço da capacidade de detecção (LUNA;PAULO, 2002).

A incidência de doenças causadas por arbovírus tem apresentado um aumento global relevante nos últimos anos (GOULD *et al.*, 2017). A emergência de arboviroses em locais vulneráveis representa um potencial desafio para a saúde pública devido à possibilidade de dispersão mais rápida dos vírus em razão do crescimento intensivo e diversificação dos meios de transporte, a adaptação dos vetores à urbanização crescente, a incapacidade de conter a população de mosquitos e alterações no meio ambiente (GOULD *et al.*, 2017).

O Brasil apresenta condições ambientais favoráveis para a permanência e disseminação de mosquitos vetores como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GREGIANINI, 2017). O homem é considerado um hospedeiro acidental no ciclo de transmissão silvestre de muitas arboviroses devido ao contato de trabalhadores rurais com áreas de risco de infecção. Adicionalmente, as mutações genéticas nos arbovírus favoreceram a adaptação a vetores antropofílicos que se disseminaram principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, em ambientes urbanos e próximos a regiões de florestas, afetando a saúde humana (MOURÃO; DOURADO; BASTOS; DOURADO *et al.*, 2015).

A recente entrada dos vírus Chikungunya, Nilo Ocidental e Zika, nos países das Américas, incluindo o Brasil, expõe a população ao risco de infecção, uma vez que há indivíduos suscetíveis, não existem vacinas disponíveis como método profilático e não existem antivirais efetivos para o tratamento (CHANCEY, 2015).

Em algumas regiões do país, co-circulam arbovírus como o vírus Mayaro (MAYV), o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), o vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), o vírus Rocio (ROCV), vírus Oropouche (OROV) e o vírus Nilo Ocidental (WNV), que desenvolvem no paciente sintomas similares aos observados nos casos das doenças produzidas pelos vírus Chikungunya, Dengue e Zika (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Na região Centro-Oeste foi evidenciado na detecção do MAYV em pacientes durante epidemias de dengue no estado de Mato Grosso (VIEIRA *et al.*, 2015). Assim como, é preocupante o fato do vírus Oropouche (OROV) ser detectado pela primeira vez fora da área de transmissão conhecida na América do Sul (NUNES *et al.*, 2005).

Com o primeiro isolamento do OROV na região de Arinos, em Minas Gerais (Brasil), se faz necessário mais estudos sobre ecologia e epidemiologia molecular do vírus, não apenas para melhorar o conhecimento sobre os fatores genéticos e ambientais que determinam a circulação dessa arbovirose, mas também para descobrir se sua área epidêmica está se espalhando fora da região Amazônica e em direção ao sudeste e outras regiões povoadas do Brasil (VASCONCELOS *et al.*, 2009).

O diagnóstico laboratorial utilizando técnicas de biologia molecular trouxe grandes avanços. Entretanto, nos serviços públicos de saúde, a disponibilidade desses testes é apenas para algumas dessas arboviroses circulantes entre a população em área de risco (KOURI, 2004; CABRAL-CASTRO, 2016).

Além das arboviroses, outras doenças com similaridade de sintomas também estão ocorrendo, como é o caso do sarampo, rubéola, eritema infeccioso (doença causada pelo eritrovírus B19), entre outros e da mesma forma são subdiagnosticados por falta, entre outros fatores, da implantação de testes diagnósticos específicos na rotina laboratorial. Como o exantema causado pelo Eritrovírus B19 pode ser clinicamente diagnosticado como rubéola, é importante realizar o diagnóstico desta virose no Brasil, já que um aumento no número de casos de exantema por B19 tem sido relatado nos países onde a rubéola é controlada por vacinação (CUBEL; CRUZ; SIQUEIRA; SANTOS *et al.*, 1997).

Desde setembro de 2003, o Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) realiza pesquisa de Dengue por meio da técnica de RT-qPCR. Antes dessa data, era utilizada a técnica de cultura celular em células de mosquitos (C6:36). A confirmação laboratorial rápida é fundamental para a condução clínico-terapêutica adequada e para o início de respostas de ações de controle.

Em novembro de 2014, o laboratório passou a receber amostras de pacientes com suspeita de infecção pelo vírus Chikungunya. O primeiro caso foi confirmado em julho de 2015 por meio da técnica RT-qPCR, em um paciente residente no município de Corumbá. Em novembro do mesmo ano, foi confirmado o primeiro caso no município de Campo Grande. Em julho de 2015, encaminharam para o LACEN MS as primeiras amostras com suspeita de infecção pelo vírus Zika, para realização dos testes moleculares. Porém, apenas em dezembro desse mesmo ano foi possível detectar o primeiro caso, no município de Campo Grande. Esses diagnósticos foram feitos no Laboratório de Referência Nacional em arboviroses para a área de abrangência do estado de Mato Grosso do Sul, o Instituto Evandro Chagas (Belém – PA).

A partir de fevereiro de 2016 foi implantado e padronizado o diagnóstico laboratorial dos vírus Zika e Chikungunya por RT-qPCR no LACEN/MS. No ano de 2019, houve um grande número de amostras que, mesmo após a pesquisa dos vírus Dengue, Zika e Chikungunya

ficaram sem o diagnóstico laboratorial conclusivo. Então, surge naturalmente um questionamento sobre o que mais poderia estar circulando na população com sinais e sintomas semelhantes que confundem e dificultam o diagnóstico clínico no serviço de saúde?

O presente trabalho propõe a implantação de testes moleculares para o vírus Mayaro (MAYV), vírus Oropouche (OROV), o vírus Nilo Ocidental (WNV) e eritrovírus B19 e de um fluxograma no LACEN MS que permita realizar o diagnóstico diferencial de outros vírus, sendo possível dar resposta aos pacientes e ao serviço de saúde com relação aos agentes infecciosos que estão em circulação, e que geram sintomatologia similar, com quadro febril exantemático e que podem estar sendo subdiagnosticados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

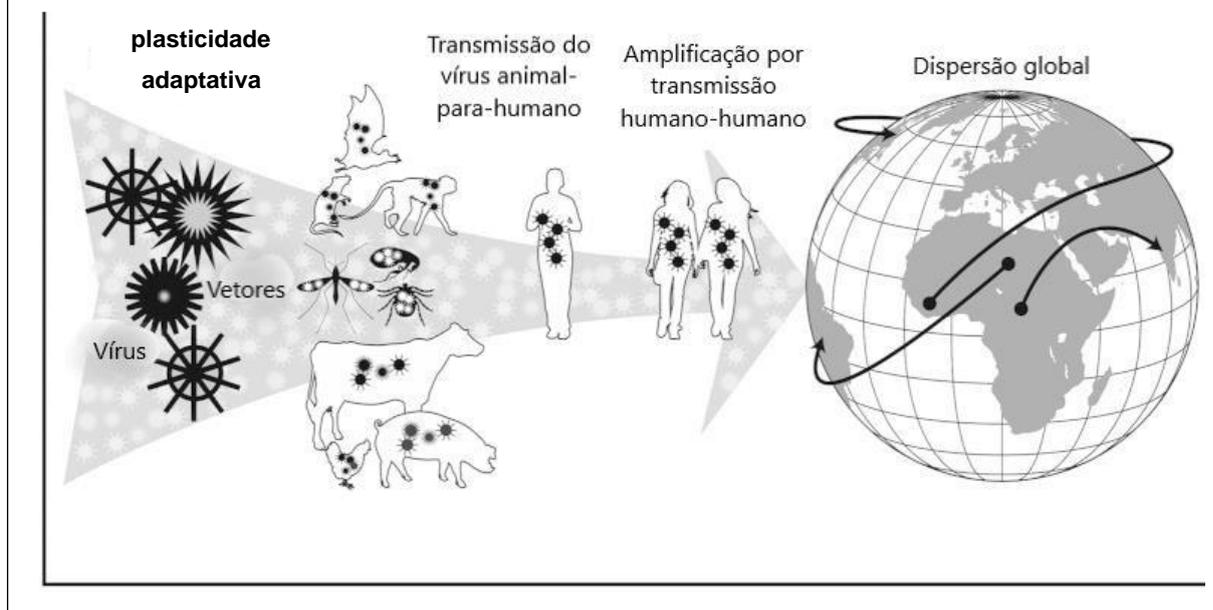
### 2.1 ARBOVIROSES

A maioria dos arbovírus pertence aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (família *Flaviviridae*); outros membros de importância para a saúde humana são das famílias *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Os arbovírus (*Arthropod-borne virus*, em inglês) são vírus designados assim não somente pela sua transmissão aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos e outros artrópodes de importância médica (LOPES *et al*, 2014).

O mosquito do gênero *Aedes*, principal vetor dos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya, é o principal responsável pela propagação desses agentes etiológicos nas mais longínquas regiões de clima tropical e subtropical, onde há as condições ambientais que favorecem a proliferação desse inseto (GUBLER, 2011). O Brasil é constituído por uma grande extensão terrestre, situado em uma área predominantemente tropical e subtropical, com extensas florestas na região Amazônica, o Pantanal no Centro-Oeste, o Cerrado na área do planalto central, e uma região seca (Caatinga) no interior nordestino. A maior parte do país apresenta condições climáticas que possibilitam a existência de diversidade de insetos e outros artrópodes, portanto, a ocorrência de arboviroses (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Os arbovírus se encontram na natureza circulando entre animais silvestres e artrópodes hematófagos, o que é conhecido como ciclo silvestre, sendo que a transmissão para os humanos e animais domésticos ocorre de forma acidental (Figura 1) (KREUDER JOHNSON; HITCHENS; SMILEY EVANS; GOLDSTEIN *et al.*, 2015). Este processo de urbanização de um arbovírus tem sido algo bastante discutido na comunidade científica, principalmente após as epidemias dos vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) ocorridos no Brasil nos últimos anos.

Figura 1- Propriedades pandêmicas dos vírus zoonóticos que se propagam dos animais para os seres humanos e por transmissão secundária entre humanos.



Fonte: Adaptação KREUDER, 2015.

A adaptação de um arbovírus ao ambiente urbano depende de vários fatores, entre eles mudanças climáticas, desmatamento e o aumento na frequência do tráfego de pessoas, principalmente relacionado ao ecoturismo, que leva o homem a visitar as áreas silvestres (GOULD, 2009; KILPATRICK; RANDOLPH, 2012). Notavelmente, observa-se que o tráfego aéreo para a maioria dos países entre África, regiões da América do Sul, e partes da Ásia Central é baixo. Com a globalização, essas viagens tendem a aumentarem nestas regiões, contribuindo para emergência e são prováveis introduções adicionais de agentes patogênicos transmitidos por vetores.

Na figura 2 as linhas mostram ligações diretas entre aeroportos, e a cor indica a capacidade de passageiros em pessoas por dia (milhares [vermelho]; centenas [amarelo]; dezenas [azul]). As rotas que ligam regiões em latitudes semelhantes (no hemisfério norte ou sul) representam caminhos que os agentes patogênicos podem percorrer para alcançar novas regiões (Figura 2). Alguns arbovírus possuem a capacidade de manter-se em ciclos urbanos, além do silvestre, envolvendo apenas humanos como hospedeiros amplificadores e artrópodes como vetores, tais como os sorotipos do vírus da Dengue (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV), Chikungunya e Oropouche (OROV), ocasionando epidemias de grandes proporções na população (CARDOSO; GROSSO; SERRA; GROSSO *et al.*, 2015).

Figura 2 – Mapa Global das rotas de transporte aéreo.



**Fonte: KILPATRICH; RANDOLPH, 2012.**

O diagnóstico laboratorial das arboviroses pode ser realizado por técnicas para identificação direta da presença do vírus, como o isolamento viral e/ou detecção do ácido nucleico ou antígenos virais, e de técnicas sorológicas para detecção de anticorpos. No Brasil, o diagnóstico laboratorial das arboviroses é predominantemente por método indireto, para pesquisa de anticorpos, utilizando a técnica de ensaios imunoenzimáticos como ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), com estratégias de captura de imunoglobulina M (IgM). É importante ressaltar que diante do cenário endêmico de múltiplas arboviroses, com circulação concomitante em quase todo o país, a possibilidade de ter reações cruzadas com o teste de ELISA, gera uma maior dificuldade na interpretação dos resultados, tornando-os, por vezes, inconclusivos ou insuficientes para a confirmação e/ou descarte de um caso, na ausência de outras evidências epidemiológicas. Cabe destacar que em 2020, segundo dados do Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial de Mato Grosso do Sul (Sistema GAL), mais do 92,2% dos exames laboratoriais para diagnóstico de dengue, 84,7% dos estudos para chikungunya e 73,6% para zika foram realizados utilizando métodos sorológicos que, por sua natureza, limitam a especificidade para a confirmação do agente etiológico por critério laboratorial (BRASIL – Ministério da Saúde - NOTA TÉCNICA Nº 427/2021-CGLAB/DAEVS/SVS/MS).

Um estudo sorológico realizado no estado de Mato Grosso do Sul mostrou níveis de anticorpos para os vírus MAYV e OROV em primatas não humanos sentinelas, nas cidades de Bonito e Jardim, sugerindo a possível circulação destes vírus nesta região. A diversidade das espécies de insetos capturados na cidade de Jardim torna a população desta área suscetível à

infecção por arbovírus. O estado de Mato Grosso do Sul apresenta condições propícias para a emergência ou reemergência de arbovírus patogênicos para os seres humanos, por possuir uma variedade de hospedeiros vertebrados e vetores transmissores (BATISTA; SUL; ANDREOTTI; SUL *et al.*, 2012).

O isolamento viral em cultura de células de vertebrados e invertebrados tem uma aplicabilidade limitada, ficando a sua realização restrita a laboratórios mais estruturadas como os laboratórios de referência. Os métodos diretos como RT-qPCR são empregados para o diagnóstico na fase aguda e para estudos filogenéticos do vírus. Outro fator importante a ser destacado é que os exames moleculares também permitem realizar estudos genômicos e metagenômicos que apoiam os modelos de previsão e dispersão dos agentes patógenos, oferecendo importante subsídio para as ações de intensificação da vigilância, prevenção e controle vetorial. Assim, faz-se necessário que os serviços de saúde, a saber, atenção primária, rede especializada e os de vigilância epidemiológica, estejam sensibilizados no que respeita a importância da coleta precoce de amostras para o diagnóstico etiológico, sobretudo, durante o período inter-sazonal dessas enfermidades (NOTA TÉCNICA N° 427/2021-CGLAB/DAEVS/SVS/MS). A detecção de atividade elevada ou emergente de vírus serve como um sistema de alerta para implementar ações apropriadas para reduzir vetores (RAMIREZ *et al.*, 2018).

Contudo, os estudos envolvendo a pesquisa de arbovírus no estado são escassos. Assim, justifica-se a realização deste estudo, visto que os vírus pesquisados estão entre os arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil como mostra o Quadro 1, a fim de conhecer melhor o comportamento da circulação viral, que é fundamental para a promoção e execução de medidas que visem a prevenção e o controle e suporte das ações prescritas pelos programas de controle de vetores e epidemias.

Quadro 1 - Arbovírus emergentes e reemergentes no Brasil.

Família	Vírus	Sigla	Doença
<i>Flaviviridae</i>	Dengue	DENV	Doença febril aguda
	Encefalite Saint Louis	SLEV	Meningite e encefalite
	Rocio	ROCV	Encefalite
	Oeste do Nilo	WNV	Meningite e encefalite
	Cacipacore	CACV	Doença febril

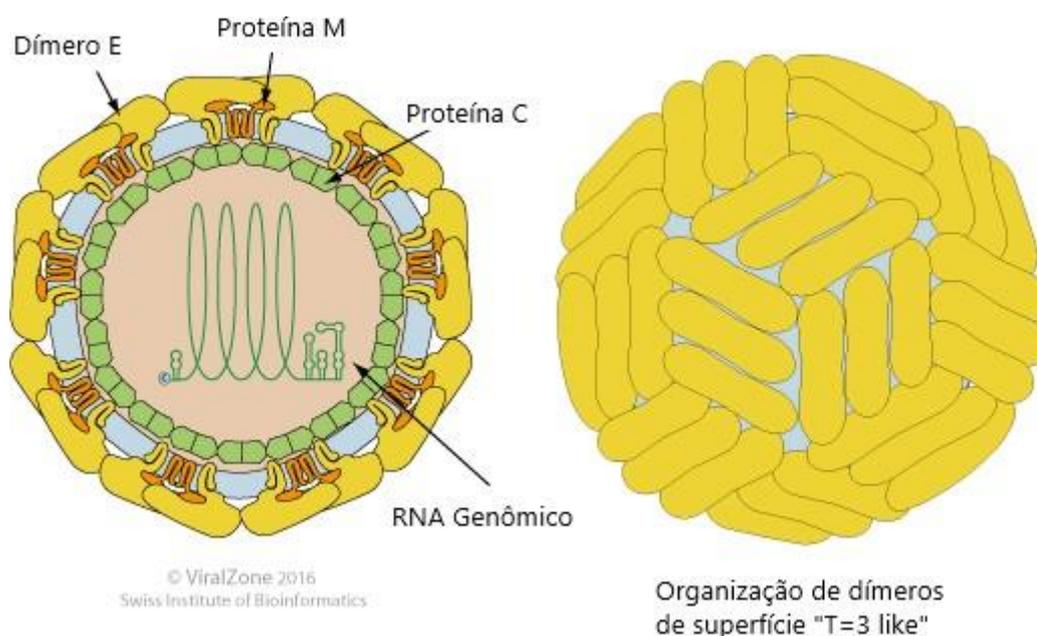
	Ilhéus	ILHV	Doença febril, encefalite
	Bussuquara	BUSV	Doença febril
	Iguape	IGUV	-
<i>Togaviridae</i>	Mayaro	MAYV	Doença febril e artralgias
	Encefalite Equina do Leste	EEEV	Doença neurológica
<i>Peribunyaviridae</i>	Oropouche	OROV	Doença neurológica, Dengue like

Fonte: (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014)

## 2.2 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE

Os arbovírus da família *Flaviviridae* são de forma esférica, envelopados, com tamanho de aproximadamente 50nm de diâmetro, com capsídeo icosaédrico (Figura 3). A origem do nome da família vem do latim *flavus*, ou “amarelo” fazendo referência ao vírus da febre amarela que é o protótipo do gênero (ZHANG *et al.*, 2014).

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura de um *Flavivírus*. A partícula viral consiste da proteína do envelope (E), a proteína de Membrana (M), a proteína da Cápside (C) e o genoma tipo RNA.



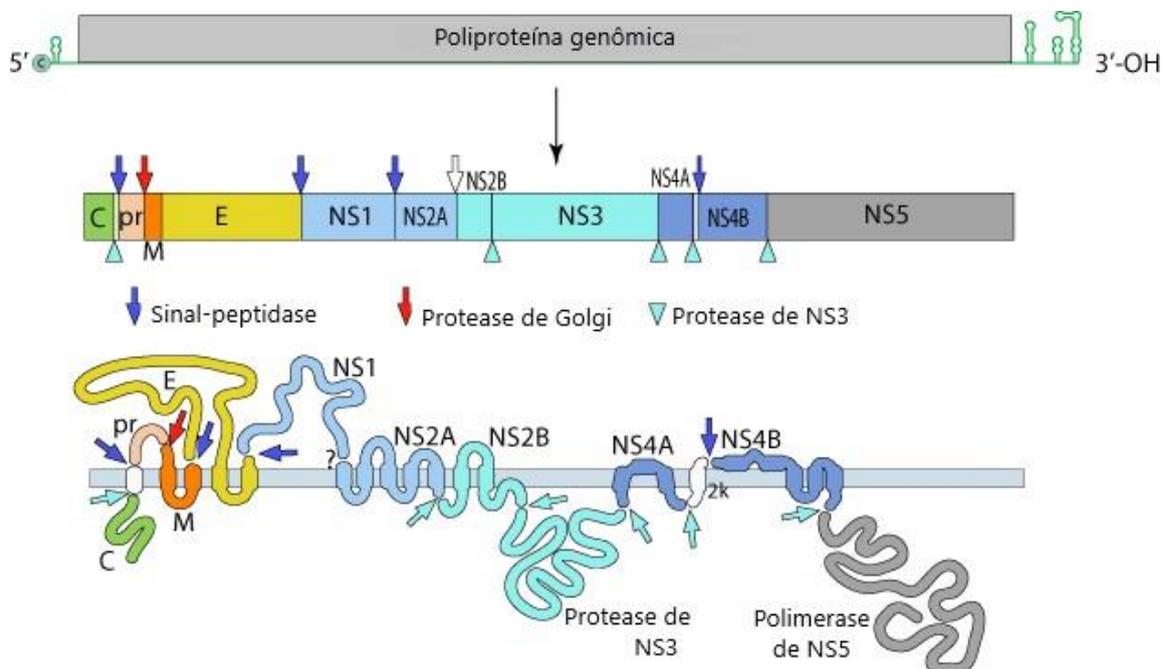
Fonte: Adaptação <http://viralzone.expasy.org/>

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. Os vírus do gênero *Flavivirus* são transmitidos principalmente por artrópodes hematófagos (arbovírus), contando com 53 espécies, dentre as quais estão patógenos muito importantes para a saúde humana como o vírus da dengue, vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa, vírus da febre do nilo ocidental e vírus da febre zika. O gênero *Hepacivirus* é composto por 14 espécies, dentre as quais o mais antigo e importante é o Vírus da hepatite C, que infecta humanos. As 11 espécies descritas no gênero *Pegivirus* estão relacionadas a diversos hospedeiros, sendo que eles não foram claramente associados à doença. Por fim, o gênero *Pestivirus* abriga 11 espécies, a maioria tem importante relevância e impacto na saúde animal (LEFKOWITZ; DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY; DEMPSEY; DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY *et al.*, 2017).

Os flavivirus apresentam um genoma de RNA de fita simples, com polaridade positiva, com aproximadamente 11 Kb, que já serve como RNA mensageiro (mRNA). Possui uma única ORF (do inglês, *open reading frame*, sequência aberta de leitura) e por isso, codifica numa poliproteína que pela ação de proteases celulares e virais, é clivada e dá origem a três proteínas estruturais: Capsídeo, Membrana (expressa como prM, o precursor para M) e Envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais constituem, em conjunto com o genoma, a partícula viral e as não estruturais estão relacionadas à atividade reguladora da replicação viral, virulência e patogenicidade (Figura 4) (CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 2003; RODENHUIS-ZYBERT, 2011).

As proteínas NS2A, NS2B, NS3 e NS5 estão envolvidas na replicação do RNA genômico. A NS1 é uma proteína que apresenta funções distintas entre os flavivírus e é bem conhecida. Alguns estudos demonstram seu importante papel na patogênese de doenças como a dengue (MURRAY, 2008; MULLER, 2013). As proteínas NS1 e NS5 do vírus Zika estão sendo fonte de estudos para diagnóstico laboratorial da doença juntamente com proteínas estruturais, ou seja, um teste multiplex capaz de diagnosticar o vírus Zika evitando a possibilidade de reações cruzada (WONG *et al.*, 2017). A proteína NS1 do vírus dengue já é usada para diagnóstico precoce da doença, facilitando a diferenciação com outros membros da família, bem como, outras arbovirose (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR *et al.*, 2002).

Figura 4 – Representação esquemática do Genoma de um *Flavivírus* - A poliproteína está representada na cor cinza, as proteínas estruturais (C, prM/M e E) estão representadas nas cores verde, rosa vermelha e amarela respectivamente. As não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) nas cores azul, azul claro, azul escuro e cinza.



Fonte: Adaptação <http://viralzone.expasy.org> acesso em 14/11/20

### 2.2.1 O vírus do Nilo Ocidental

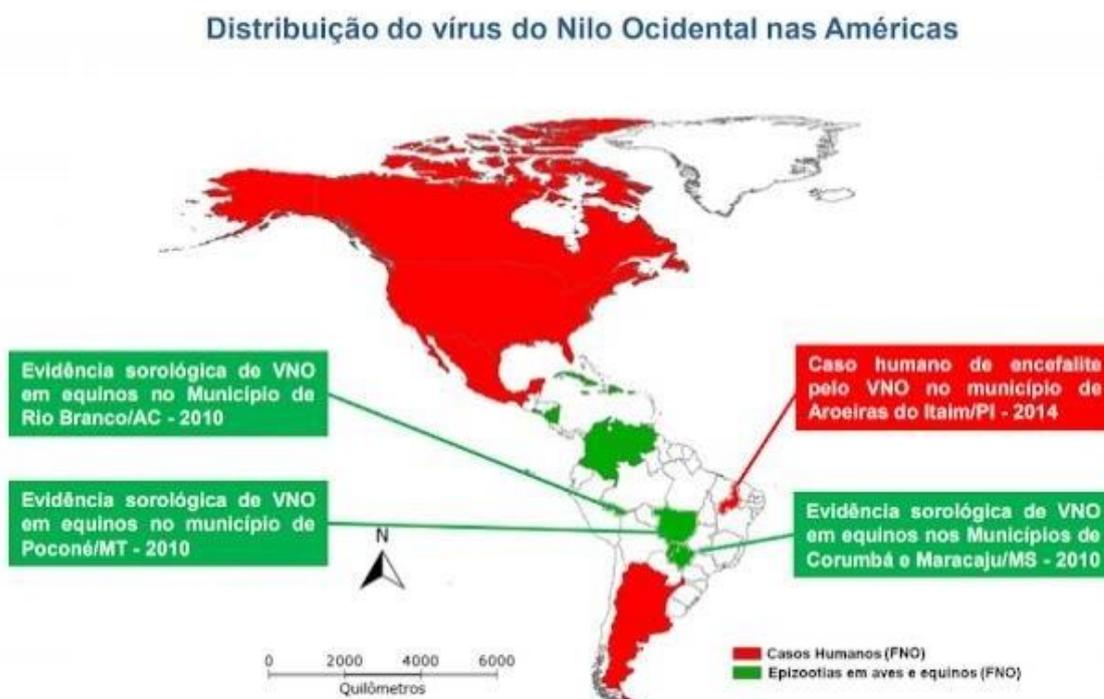
O vírus do Nilo Ocidental (WNV) foi identificado pela primeira vez no distrito de Uganda, no Nilo Ocidental, em 1937. Atualmente, é comumente encontrado na África, Europa, América do Norte, Oriente Médio e Ásia (FALL, 2017). Desde a sua introdução em 1999 nos Estados Unidos (EUA) o vírus se espalhou e agora também está amplamente estabelecido do Canadá à Venezuela na região das Américas sendo, atualmente, o arbovírus com maior distribuição geográfica no mundo. Os maiores surtos ocorreram na Grécia, Israel, Romênia, Rússia e EUA; sendo que os locais de surto estão nas principais rotas migratórias de aves (ECDC, 2022; BRASIL, 2021). Nos Estados Unidos, o WNV é a principal causa de doenças transmitidas por mosquitos sendo que as notificações normalmente aumentam durante os meses de verão e outono (CDC, 2022).

No Brasil, a primeira evidência de circulação de WNV foi relatada em 2011 quando foram detectados anticorpos neutralizantes específicos em cavalos saudáveis da região do Pantanal, localizados na região Centro-Oeste do Brasil, no estado de Mato Grosso do Sul, como os animais nunca saíram do Pantanal, a infecção autóctone foi confirmada (PAUVOLID-

CORREA *et al.*, 2011). O primeiro isolamento do WNV no Brasil foi realizado por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas (MARTINS; CHAGAS; SILVA; CHAGAS *et al.*, 2019) a partir de tecido do SNC de um cavalo do estado do Espírito Santo que apresentou sintomas neurológicos. Mais recentemente, foram também relatadas análises genéticas de WNV em amostras de cavalos do estado de Minas Gerais (COSTA; GIOVANETTI; CATENACCI; FONSECA *et al.*, 2021). Apesar de estudos relatarem evidências sorológicas sugestivas da circulação do WNV no Brasil (PAUVOLID-CORRÊA; CRUZ; VARELLA; JANEIRO, 2008) e relatos de doença humana em casos confirmados no estado do Piauí (VIEIRA *et al.*, 2015), pouco se sabe sobre a diversidade genômica do vírus, a evolução e a dinâmica de transmissão em todo o país (Figura 5).

A identificação de novos casos positivos em humanos e equinos no Brasil indicam a necessidade de ampliar o estudo epidemiológico e diagnóstico do vírus no país (COSTA; GIOVANETTI; CATENACCI; FONSECA *et al.*, 2021), pois mesmo que sejam poucos os casos identificados, a ocorrência demonstra a adaptação do arbovírus no país e sua capacidade de transmissão.

Figura 5 - Distribuição do vírus do Nilo Ocidental nas Américas.



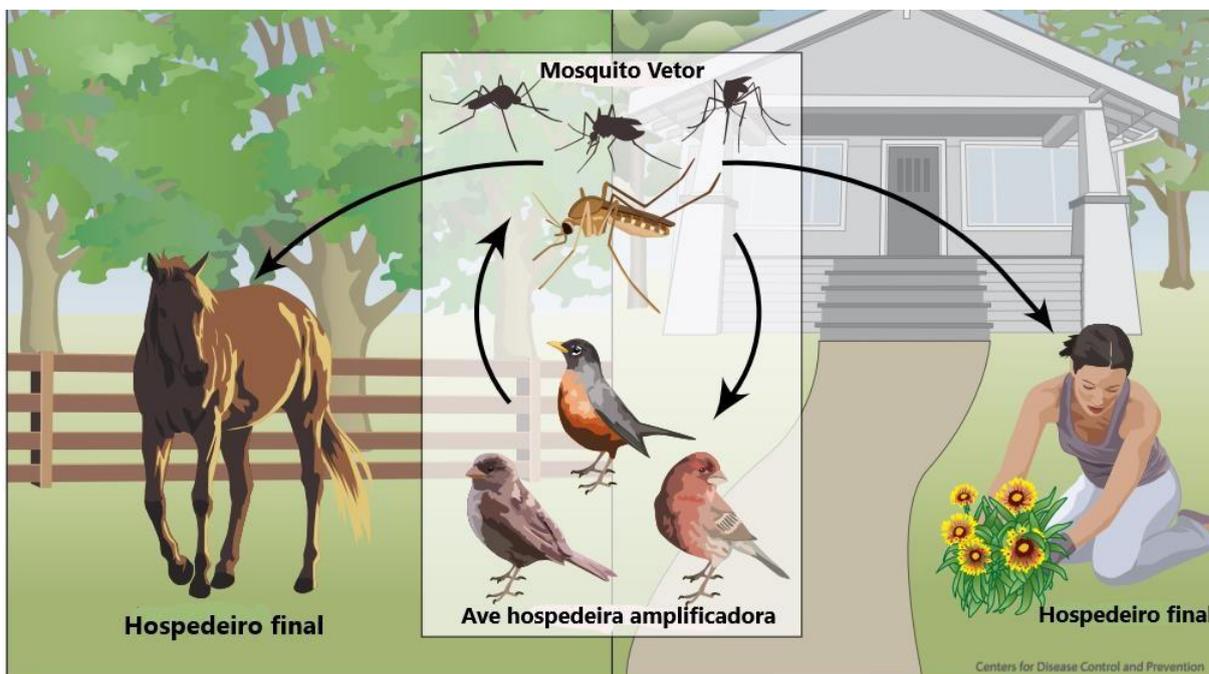
Fonte: CCZ-Niterói/RJ, 2019.

### 2.2.1.1 Hospedeiros e reservatórios naturais

A transmissão de WNV é mantida em um ciclo mosquito-aves sendo o mosquito do gênero *Culex*, em particular as espécies *Cx. pipiens* e *Cx. quinquefasciatus*, os principais vetores (CAMPBELL, 2002). Contudo, mosquitos de outros gêneros também podem atuar na transmissão viral, como *Aedes* sp., *Anopheles* sp., *Mansonia* sp. e *Coquillettidia* sp. (KOMAR et al., 2003). Na natureza, o vírus circula entre mosquitos (principalmente da espécie *Culex*) e aves silvestres. Algumas espécies de aves silvestres são hospedeiros naturais, que atuam como amplificadores do vírus e servem como fonte de infecção para os mosquitos. Quando infectadas podem desenvolver altos níveis do vírus em sua corrente sanguínea e os mosquitos podem ser infectados ao picar essas aves infectadas. Após cerca de uma semana, os mosquitos infectados podem transmitir o vírus para mais aves através da picada (KOMAR, 2003).

Os mosquitos com o vírus picam e infectam pessoas, cavalos e outros mamíferos. No entanto, humanos, cavalos e outros mamíferos são hospedeiros acidentais e finais. Isso significa que, a contaminação pelo vírus se dá por um curto período de tempo e não desenvolvem altos níveis de vírus em sua corrente sanguínea, assim não podem transmitir o vírus para outros mosquitos, encerrando o ciclo de transmissão (Figura 6)(CDC,2021).

Figura 6 - Ciclo de Transmissão do vírus do Nilo Ocidental.



Fonte: adaptação [West Nile Virus Transmission Cycle | CDC](#)

### 2.2.1.2 Sintomas e patogenia

A doença pode ser assintomática ou apresentar sintomas distintos, de acordo com cada pessoa e com o nível de gravidade da doença. Cerca de 80% das infecções por WNV em humanos são assintomáticas. A forma leve da doença caracteriza-se pelos seguintes sinais: or febre, dor de cabeça, dor nos olhos, mialgia, artralgia, cansaço, náusea e vômitos, enquanto a doença grave (neuro invasiva) é caracterizada por febre alta, coma, convulsões, encefalite e paralisia (HAYES *et al.*, 2005).

O WNV é replicado nas células de Langerhans, migra para os linfonodos regionais e a seguir tem acesso à corrente sanguínea (viremia primária). Posteriormente, o vírus ganha ampla disseminação para o sistema reticuloendotelial, onde novamente é replicado, incrementando a viremia (viremia secundária). Acredita-se que o vírus atinja o sistema nervoso central pela via hematogênica, causando as manifestações clínicas neurológicas da doença. Em humanos, o período de incubação pode variar entre 2 a 14 dias após a picada do mosquito (DEBROT, 2005).

A maioria das infecções se resolve em 2 a 6 dias, mas em casos graves, o cansaço pode durar por um mês ou mais (DEBROT, 2005). As infecções em equinos podem ocasionalmente causar doenças neurológicas e morte (HAYES *et al.*, 2005), de tal forma que esses animais podem ser considerados espécies sentinelas para surtos de WNV com potencial de transmitir para as populações humanas. O exato mecanismo e locais da replicação de WNV após a picada do mosquito infectado ainda permanecem desconhecidos. Entretanto, acredita-se que a replicação inicial ocorra na pele e em linfonodos regionais gerando uma viremia primária no sistema reticuloendotelial (DEUBEL, 2006).

### 2.2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico diferencial da WNV inclui diversas arboviroses (neuroinvasivas e não neuroinvasivas) e outras doenças virais febris agudas (leptospirose, febre maculosa, e outras) ou com acometimento do sistema nervoso central. Assim, a abordagem sindrômica é a mais indicada para a vigilância do WNV, a partir da identificação de pacientes com quadros neurológicos de etiologia viral (encefalite, meningite, meningoencefalite, paralisia flácida aguda) sem causa conhecida. As análises laboratoriais, sinais e sintomas, juntamente com a situação epidemiológica da região, devem ser tomados em conta na busca de um fechamento do diagnóstico (BRASIL, 2022).

O diagnóstico de encefalomielite por WNV em vertebrados normalmente é baseado em sinais clínicos e sorologia, principalmente por Teste de Neutralização por Redução de Placas (*Plaque Reduction Neutralization Test* ou PRNT, em inglês) ou Ensaio Imunoabsorvente de

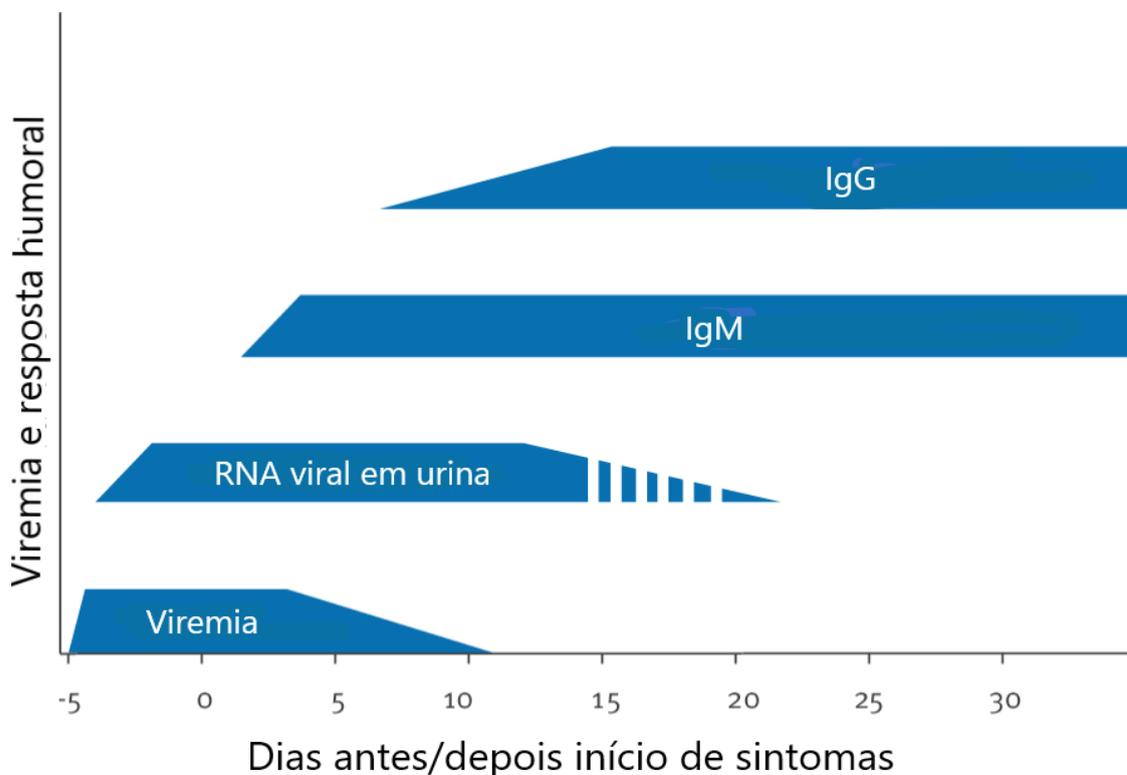
Ligação de Enzimas por Captura de IgM (IgM *Antibody Capture Enzyme Linked Immuno Sobent Assay* ou MAC ELISA, em inglês) (CAMPBELL, 2002). Anticorpos heterófilos, em raras circunstâncias, podem causar um falso positivo em testes sorológicos (BARENFANGER; DRAKE; LAWHORN; O'BRIEN *et al.*, 2005).

O diagnóstico molecular de WNV é feito usando a técnica da cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR, em inglês), mas ainda apresenta utilidade limitada devido à baixa viremia e à curta duração em hospedeiros vertebrados ao iniciar os sintomas, tornando difícil a detecção com o passar do tempo (BARZON; DEPARTMENT OF MOLECULAR MEDICINE; REGIONAL REFERENCE LABORATORY FOR INFECTIOUS DISEASES; PACENTI *et al.*, 2013; PAUVOLID-CORRÊA; CRUZ; VARELLA; JANEIRO, 2008).

Estudos demonstraram que o RNA do WNV pode ser detectado na urina por muito mais tempo (pode durar por aproximadamente 20 dias) e em concentrações mais altas do que no sangue ou no líquido cefalorraquidiano (LCR) em indivíduos com WNV ou doença neuroinvasiva (MURRAY *et al.*, 2010). A urina usada é coletada fresca e não há necessidade de ser concentrada ou pré-tratada antes do teste (MURRAY *et al.*, 2010). O RNA viral se degrada rapidamente na urina, com os resultados do RT-PCR se tornando negativos após 2 ou mais ciclos de congelamento/degelo (MURRAY *et al.*, 2010).

O aparecimento de anticorpos contra o WNV ocorre entre quatro e sete dias após a infecção e anticorpos IgM são detectados logo após o início dos sintomas (Figura 7).

Figura 7 - Viremia e resposta humoral ao Vírus do Nilo Ocidental: cronologia de marcadores clínicos e de diagnóstico durante a infecção por WNV.



**Fonte:** Adaptação (RIZZOLI *et al.*, 2015)

A febre do nilo ocidental no Brasil, é uma doença de notificação compulsória por ter relevância epidemiológica, devendo ser informada às autoridades de saúde (Portaria nº 204/GM/MS, de 17 de fevereiro de 2016) imediatamente, uma vez que um caso pode indicar o início de um surto e as medidas de controle são necessárias. A vigilância epidemiológica de casos suspeitos deve ser feita seguindo as orientações do Ministério da Saúde no que diz respeito à notificação, investigação e coleta e envio de amostra (fluidos e/ou tecidos) ao laboratório de referência da região.

#### 2.2.1.4 Tratamento e prevenção

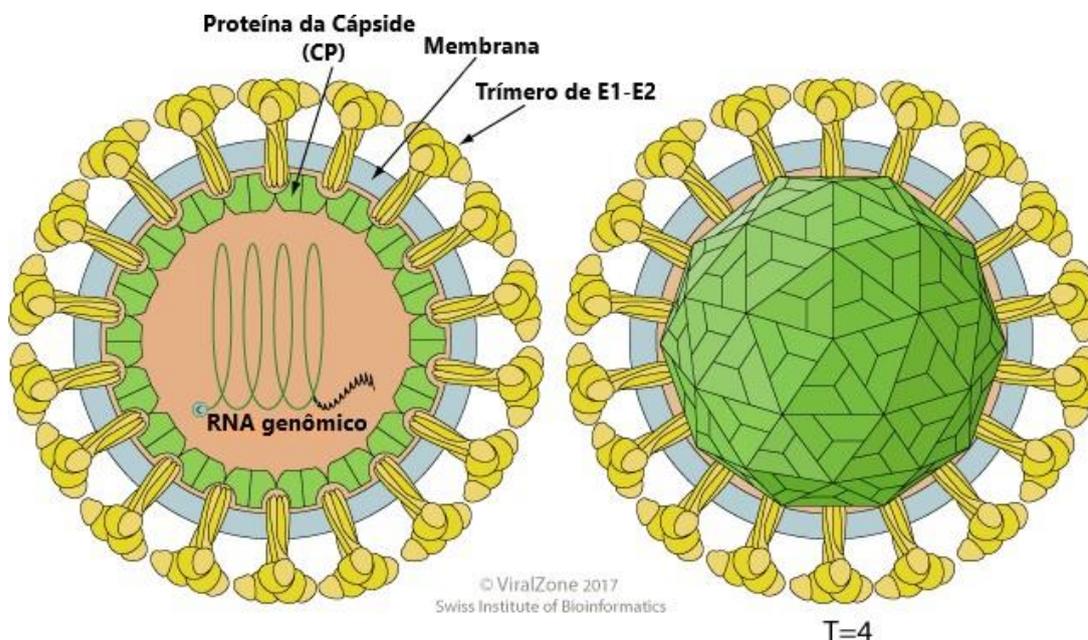
Atualmente, não existe tratamento antiviral específico ou vacina contra o WNV para a população humana. Em pacientes com sintomas mais leves o tratamento é sintomático, e em casos mais graves, é necessária hospitalização para cuidados adequados, como suporte respiratório, prevenção de infecções secundárias e tratamento para os casos de encefalites e outros casos neurológicos.

Existem vacinas para equinos, disponíveis comercialmente, e há pesquisas em desenvolvimento para a elaboração de vacina para o homem (MURAKI; FUJITA; MATSUURA; FUKU *et al.*, 2015). A vacina recombinante ChimeriVax-WN02 foi considerada segura e eficaz em dois ensaios clínicos de fase II em adultos saudáveis. É uma vacina quimérica atenuada, produzida pela inserção dos genes que codificam as proteínas pré-membrana (prM) e envelope (E) do WNV (cepa NY99) no clone da vacina 17D da febre amarela (BIEDENBENDER; THE GLENNAN CENTER FOR GERIATRICS AND GERONTOLOGY; BEVILACQUA; SANOFI PASTEUR *et al.*, 2011).

### 2.3 FAMÍLIA TOGAVIRIDAE

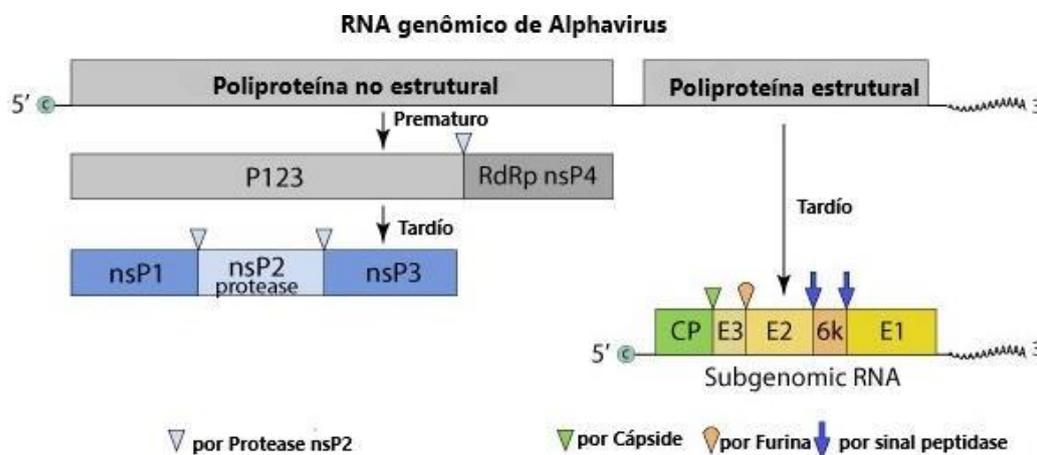
A família *Togaviridae* é composta por vírus envelopados, com capsídeo icosaédrico com cerca de 70 nm de diâmetro que envolve o genoma tipo RNA de fita simples linear de polaridade positiva (+). O genoma de aproximadamente 11kb codifica duas poliproteínas precursoras, que quando clivadas darão origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) envolvidas na replicação viral, e as proteínas estruturais: Capsídeo (C) e Envelope (E1, E2, E3 e 6k) (Figuras 8 e 9) (MACKAY, 2016; MOTA; RIBEIRO; VEDOVELLO; NOGUEIRA, 2015).

Figura 8 - Representação esquemática da estrutura de um *Togavírus*.



Fonte: Adaptado [https://viralzone.expasy.org/resources/Togaviridae\\_virion.png](https://viralzone.expasy.org/resources/Togaviridae_virion.png)

Figura 9 - Representação esquemática do Genoma de um *Togavírus*.



Fonte: Adaptado [https://viralzone.expasy.org/3?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/3?outline=all_by_species)

### 2.3.1 O vírus Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV) tem ampla dispersão em regiões florestais do trópico e subtropical e produz nos pacientes doenças com sintomas clínicos similares a outras arboviroses.

Foi isolado pela primeira vez em trabalhadores doentes de Trinidad e Tobago em 1954, sendo o principal vetor o mosquito da espécie *Haemagogus janthinomys*, que vive em áreas de florestas e de vegetação ribeirinha (MOURÃO; DOURADO; BASTOS; DOURADO *et al.*, 2015; TESH; FROM THE DEPARTMENT OF PATHOLOGY; AND THE INSTITUTO NACIONAL DE SALUD; WATTS *et al.*, 1999).

Na mesma década, fez-se o primeiro isolamento do MAYV no Brasil (CAUSEY & MAROJA, 1957). Desde então, tem sido reportadas epidemias consecutivas causadas por MAYV no país, especialmente na região Norte. O MAYV é apontado como agente emergente e com grande potencial epidêmico no Brasil (ESPOSITO & FONSECA, 2017).

Apesar de ser uma arbovirose que circula fundamentalmente em ambiente silvestre, existem relatos da doença em áreas periurbanas (ACOSTA-AMPUDIA; MONSALVE; RODRÍGUEZ; PACHECO *et al.*, 2018) e relacionados com o vetor *Aedes aegypti*, que é extremamente antropofílico, urbano, e com competência para transmitir o MAYV (LONG *et al.*, 2011). Pacientes infectados com o MAYV e o DENV foram descritos na cidade de Goiânia (estado de Goiás) nos anos de 2017 e 2018. Foram analisadas 259 amostras que resultaram positivas para DENV e 26 para MAYV. Nesse grupo, nenhum paciente tinha histórico de viagem para regiões florestais (DE CURCIO *et al.*, 2022).

### 2.3.1.1 Hospedeiros e reservatórios naturais

O MAYV circula na natureza entre animais silvestres como preguiças, primatas não-humanos (PNH), aves, marsupiais e roedores, no que é conhecido como ciclo de transmissão silvestre (ou silvático/enzoótico), causando doenças em humanos e animais domésticos de forma acidental e esporádica (eventos de spillover). Neste último caso, os humanos constituem a ponte entre o ciclo silvestre e o rural ao adentrar em áreas florestais onde circula o vírus, infectando-se e retornando para áreas periurbanas durante o período de viremia.

Adicionalmente, anticorpos também foram detectados em bovinos e bubalinos no Pará e em PNH no Mato Grosso do Sul (BATISTA *et al.*, 2012; CASSEB *et al.*, 2012). Investigação sorológica identificaram a exposição de equinos ao MAYV no Pará e no Pantanal do Mato Grosso do Sul (CASSEB *et al.*, 2016; PAUVOLID-CORRÊA, *et al.*, 2015). Apesar do *Haemagogus janthinomys* ser considerado o principal vetor no ciclo silvestre, estudos experimentais já demonstraram que os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, com um comportamento basicamente urbano e rural, são vetores competentes para transmitir o MAYV (LONG *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2018).

### 2.3.1.2 Sintomas e patogenia

A febre de mayaro é uma doença febril aguda acompanhada de manchas vermelhas na pele (rash) e artralgia. Estes sintomas são muito comuns a outras arboviroses como dengue e chikungunya o que dificulta o diagnóstico baseado apenas na análise clínica, fazendo-se necessário o uso de testes laboratoriais sorológicos e moleculares.

Nas formas mais graves, se evidencia a presença de artralgia, semelhante à chikungunya, acompanhado de edema ou inchaço nas articulações. Esses fatos dificultam o diagnóstico clínico sendo de grande importância o diagnóstico laboratorial (TESH; FROM THE DEPARTMENT OF PATHOLOGY; AND THE INSTITUTO NACIONAL DE SALUD; WATTS *et al.*, 1999).

No estado de Mato Grosso, após notificação de um surto de dengue, evidenciaram que dos 200 casos notificados, 20% foram confirmados para dengue e 3% para febre do Mayaro, e foi ressaltado a semelhança clínica entre os pacientes e a dificuldade de diagnóstico diferencial destas arboviroses baseando-se apenas na clínica (VIEIRA *et al.*, 2015). A febre de mayaro não é uma doença letal, porém apresenta uma alta taxa de morbidade uma vez que em casos mais graves o paciente pode desenvolver, como no caso de febre chikungunya, uma poliartralgia dolorosa que pode perdurar por vários meses (THEILACKER *et al.*, 2013). São doenças debilitantes.

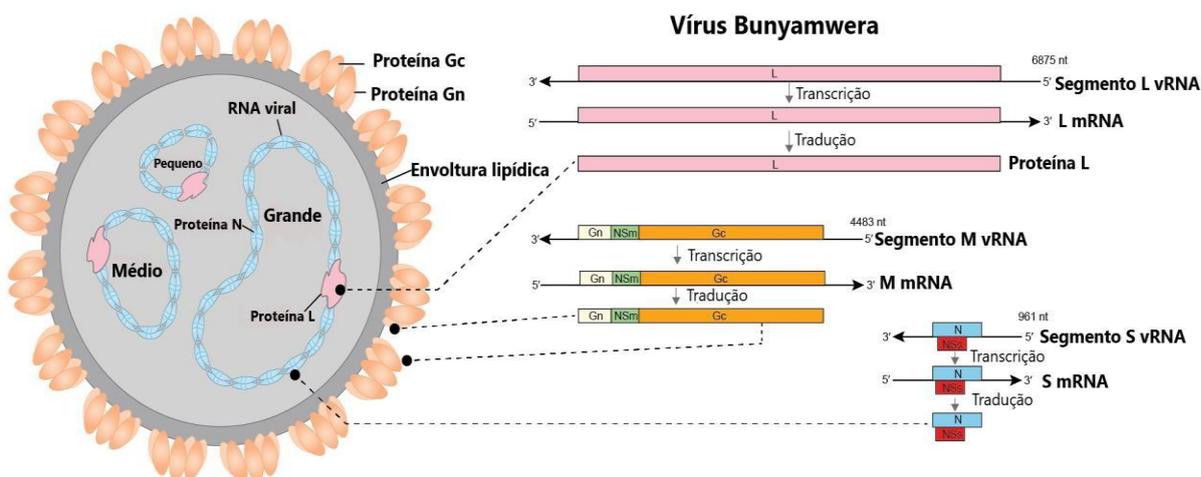
### 2.3.1.3 Diagnóstico

Os exames específicos para diagnóstico da febre de mayaro incluem o isolamento direto do vírus a partir de amostras de soro dos pacientes infectados, utilizando técnicas de cultivo viral, bem como métodos moleculares (NAVECA *et al.*, 2017). O diagnóstico clínico é limitado devido a similaridade do quadro clínico observado entre diferentes arbovírus. Por isso, o diagnóstico laboratorial das infecções pelos arbovirus tem muita importância.

## 2.4 FAMÍLIA PERIBUNYAVIRIDAE

A família *Peribunyaviridae* apresenta cerca de 100 representantes divididos em quatro gêneros: *Orthobunyavirus*, *Herbivirus*, *Pacivirus* e *Shangavirus*. O gênero *Orthobunyavirus*, onde se encontra o vírus Oropouche, é o maior e mais diversos da família e inclui 103 espécies. São vírus envelopados, esféricos ou pleomórficos, de 80-120 nm de diâmetro, com genoma RNA de polaridade negativa, dividido em três segmentos (S, M e L). O segmento S (small) codifica para a proteína da Nucleocápside, o segmento M (medium) codifica para duas proteínas do envelope glicoproteínas estruturais (Gn e Gc) e, o segmento L (large), codifica para a proteína que tem funções de RNA polimerase-RNA-dependente e de endonuclease (Figura 10) (HUGHES *et al.*, 2020).

Figura 10 - Representação esquemática da estrutura de um Peribunyavirus. Partícula infecciosa de um vírus do gênero *Orthobunyavirus* - expressão da partícula viral em corte mostrando os três segmentos genômicos.



Fonte: Adaptação <https://ictv.global/report/chapter/peribunyaviridae/peribunyaviridae>

### 2.4.1 Vírus Oropouche

O vírus Oropouche (OROV), do gênero *Orthobunyavirus*, é um dos principais arbovírus causadores de doença humana nas Américas do Sul e Central e já foi o segundo mais frequente no Brasil. (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014).

Foi isolado pela primeira vez do sangue de um paciente febril de Vega del Oropouche de Trinidad e Tobago, em 1954, e de um pool de mosquitos *Coquilletidia venezuelensis*, em 1960 (DA ROSA *et al.*, 2017).

No Brasil, foi identificado em 1960 no sangue de um bicho preguiça (*Bradypus tridactylus*) e em pool de mosquitos do *Aedes (Ochlerotatus) serratus* durante a construção da rodovia Belém-Brasília, em região florestal de Belém (PA) (DA ROSA *et al.*, 2017). As cepas do OROV circulantes na América Central e do Sul são classificadas em genótipos I, II e III, de acordo com análise filogenética do segmento S. Esses genótipos foram segregados em oito subgenótipos: Ia, Ib e Ic; IIa, IIb e IIc; IIIa e IIIb (VASCONCELOS *et al.*, 2011). No Brasil, apenas os genótipos I e II foram detectados: o genótipo I foi mais frequentemente encontrado na Amazônia Oriental, enquanto o genótipo II na região da Amazônia Ocidental (SAEED *et al.*, 2001).

A circulação do OROV no Brasil é predominante na região norte, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins e Maranhão (NUNES *et al.*, 2005), porém no município de Arinos, MG foi encontrado morto um primata do gênero *Callithrix* spp e o vírus isolado era do genótipo III, anteriormente registrado apenas no Panamá, o que demonstra o potencial de dispersão do vírus para outras regiões da América do Sul e principalmente para uma populosa região no Brasil (NUNES *et al.*, 2005). Mais recentemente, foi documentado o primeiro caso de infecção humana por OROV, detectado por RT-PCR em uma pessoa que estava passando as férias em Porto Seguro, no sul da Bahia, podendo ser considerado o primeiro caso isolado fora da região amazônica (LUNA, 2016).

#### 2.4.1.1 Sintomas e patogenia

O período de incubação de OROV varia de 4 a 8 dias. As infecções sintomáticas em humanos causadas pelo OROV são caracterizadas como uma doença febril aguda, geralmente acompanhada de dor de cabeça, mialgia, artralgia, anorexia, tontura, calafrios e fotofobia. Alguns pacientes apresentam erupção cutânea que se assemelha a rubéola e náuseas, vômitos, diarreia, congestão conjuntival, dor epigástrica e dor retro orbital, além de outras manifestações sistêmicas (DA ROSA *et al.*, 2017).

A ocorrência de recidivas é elevada (56% dos casos), caracterizadas pelo ressurgimento

dos mesmos sintomas com menor intensidade uma a duas semanas após o episódio febril inicial, porém o vírus não é detectado nesses episódios (DA ROSA *et al.*, 2017). O quadro clínico é similar aos de outras arboviroses o que dificulta o seu diagnóstico, especialmente quando se trata da região Amazônica onde o OROV circula em áreas rurais e onde circulam outras arboviroses (TERZIAN, 2010).

#### 2.4.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da febre de oropouche é basicamente feito utilizando técnicas clássicas e moleculares, dentre elas: 1) isolamento do vírus em camundongos recém-nascidos e cultura celular (células Vero); 2) ensaios sorológicos, como testes de Inibição da hemaglutinação (HI), neutralização (NT), Fixação do Complemento (CF) e ensaio imunossorvente ligado à enzima interna para detecção total de imunoglobulina, IgM e IgG, respectivamente, em soro convalescente; 3) reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real para detecção de genoma em amostras agudas (soro, sangue e vísceras de animais infectados)(DA ROSA *et al.*, 2017).

Em 2001, Saeed e colaboradores (SAEED *et al.*, 2001) projetaram o primeiro antígeno protéico recombinante nucleocapsídeo usando um sistema bacteriano Plasmidial *Escherichia coli*. Este antígeno foi testado no ensaio imunossorvente ligado à enzima IgM (ELISA) em amostras clínicas de pacientes infectados pelo OROV no Brasil e no Peru. O antígeno proposto gerou resultados com elevada sensibilidade e especificidade, constituindo, na época, uma boa alternativa para detectar o vírus na América do Sul (SAEED *et al.*, 2001).

Até o momento, não há diagnóstico comercial disponível ou testes rápidos baseados em imunoenaios (por exemplo, ELISA, imunocromatografia). Técnicas moleculares, rápidas e sensíveis, como a PCR em tempo real (qPCR) aumentam a possibilidade de detecção até mesmo no primeiro dia da doença, necessitando poucas horas para o diagnóstico (WEIDMANN; RUDAZ; NUNES; VASCONCELOS *et al.*, 2003). Técnicas de sequenciamento de nova geração tendem a facilitar a detecção, classificação e estudo de novos orthobunyavirus (HANG *et al.*, 2012).

#### 2.4.1.3 Hospedeiros e reservatórios naturais (ecologia)

As preguiças parecem participar do ciclo de manutenção de OROV (ANDERSON *et al.*, 1961). Evidência sorológica foi detectada em primatas não humanos (*Cebus apella*) no estado do Mato Grosso do Sul (BATISTA *et al.*, 2012). No Pará e no Mato Grosso do Sul, animais domésticos de criação, como ovelhas e búfalos, também foram soropositivos (CASSEB *et al.*, 2012; PAUVOLID-CORRÊA *et al.*, 2017). Esse vírus adaptou-se a um ciclo urbano,

envolvendo o homem e o mosquito da espécie *Culicoides paraensis*, comumente encontrado na região Amazônica, conhecido pelo nome popular de maruim ou mosquito-pólvora (VASCONCELOS *et al.*, 2009; LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; MESSIAS, 2011).

## 2.5 FAMÍLIA PARVOVIRIDAE

A família *Parvoviridae* está constituída por duas subfamílias: *Parvovirinae* e *Densovirinae*, diferenciadas principalmente pelas suas habilidades para infectar vertebrados (incluindo o homem) versus invertebrados. Os membros da subfamília *Parvovirinae* infectam vertebrados (mamíferos, aves e répteis), inclui oito gêneros: *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Erythroparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus* e *Copiparvovirus*, contendo mais de 55 espécies (COTMORE; AGBANDJE-MCKENNA; CANUTI; CHIORINI *et al.*, 2019).

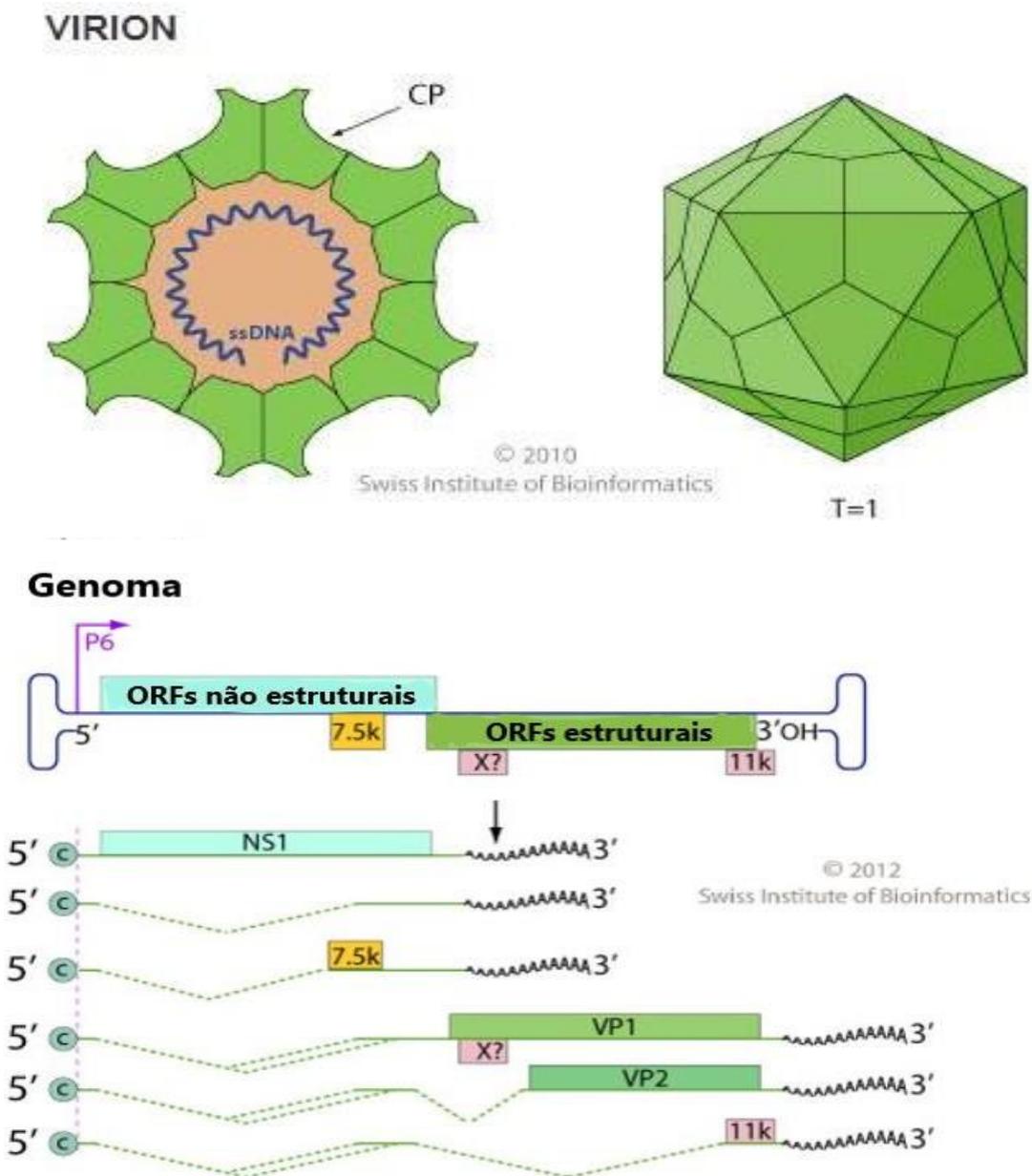
O vírion dos parvovírus é pequeno e medem entre 18 e 26 nm de diâmetro e 6,2 x 10<sup>6</sup> kDa de peso molecular e é destituído de envelope e o capsídeo possui simetria icosaédrica, formado por 20 faces triangulares (60 capsômeros) constituído de duas proteínas estruturais (VP1 e VP2) (YOTO *et al.*, 2006).

O genoma é de DNA linear de fita simples (ssDNA) que codifica para duas proteínas estruturais, VP1 e VP2, e três proteínas não estrutural, NS1, 7,5 e 11 kDa (Figura 10) (COTMORE; AGBANDJE-MCKENNA; CANUTI; CHIORINI *et al.*, 2019).

Uma característica do B19V é a capacidade do DNA persistir no sangue e em tecidos específicos de indivíduos imunocompetentes mesmo depois da infecção aguda (A; F, 2016).

Na figura 11 observa-se que a proteína NS1 é a primeira em ser transcrita seguida pela transcrição tardia das proteínas VP1 e VP2. A síntese das proteínas estruturais VP1 e VP2 ocorre no citoplasma da célula e a montagem de novas partículas virais se processa dentro do núcleo com posterior liberação pela lise celular (YOUNG *et al.*, 1984).

Figura 11 - Representação esquemática da estrutura e genoma dos *Erythroparvovirus* - Eritrovírus B19.



Fonte: [https://viralzone.expasy.org/200?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/200?outline=all_by_species)

### 2.5.1 Eritrovírus B19

O Eritrovírus B19 (Parvovírus humano B19) está dentro do gênero *Erythroparvovirus* devido ao seu tropismo por células precursoras de eritrócitos na medula óssea (MENDONÇA *et al.*, 2011). Em 2013, ele foi classificado no gênero *Erythroparvovirus* e espécie *Erythroparvovirus Primata 1* (COTMORE; AGBANDJE-MCKENNA; CANUTI; CHIORINI *et al.*, 2019), mas devido à pouca utilização deste termo na literatura nacional e internacional,

continua utilizando-se a nomenclatura antiga. O eritrovírus B19 (B19V), antes denominado parvovírus, foi identificado pela primeira vez em 1974, na Inglaterra, por Cossart e colaboradores durante a realização de testes para diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite B (HVB) em doadores de sangue assintomáticos (COSSART *et al.*, 1975).

O eritrovírus B19 foi o único vírus da família *Parvoviridae* reconhecidamente capaz de causar doenças em seres humanos, até a descoberta e detecção do Bocavirus humano (HBoV) em crianças com infecções respiratórias (ALLANDER; TAMMI; ERIKSSON; BJERKNER *et al.*, 2005) e o Parvovírus 4 (PARV4) diagnosticado em um paciente usuário de droga e infectado pelo vírus da hepatite B (JONES; KAPOOR; LUKASHOV; SIMMONDS *et al.*, 2005).

O B19V possui distribuição mundial, uma vez que as manifestações clínicas relacionadas à infecção por esse vírus são relatadas em diferentes países de todos os continentes. A infecção pelo B19V é exclusivamente humana e pode ocorrer em qualquer faixa etária (QIU; SODERLUND-VENERMO; YOUNG, 2017).

No Brasil, a frequência de anticorpos é bastante alta, 72% em adultos entre a faixa etária de 31- 40 anos e 87% em recém-nascidos com menos de um mês de vida, com os níveis de anticorpos de origem materna decrescendo até os 19 meses (HUATUCO; DURIGON; LEBRUN; PASSOS *et al.*, 2012).

A importância do eritrovírus B19 em relação à patologia humana tem sido crescente e relatada nos inúmeros trabalhos publicados na literatura mundial (GARCIA; PAULO; PEREIRA; PAULO *et al.*, 2009; OLIVEIRA; AFONSO; CURTI; SILVA *et al.*, 2017). O primeiro registro do eritrovírus B19, no Brasil, foi relatado durante um surto desta doença em Belém do Pará (MIRANDA; BELÉM; LINHARES; PÚBLICA *et al.*, 1989).

A transmissão da infecção pode ocorrer pelas seguintes vias: i) através da via respiratória, ii) através de produtos derivados do sangue administrados por via parenteral e iii) verticalmente da mãe para o feto (HEEGARD & BROWN, 2002). A transmissão nosocomial tem sido descrita com pouca frequência, e também tem sido relatada transmissão entre os profissionais de laboratórios que manipulam vírus nativos (MIYAMOTO *et al.*, 2000).

O vírus atua na inibição da formação de hemácias gerando efeitos citotóxicos levando a um quadro clínico variável com a idade. A faixa etária mais afetada é em crianças/adolescentes menores de 14 anos (UEDA, 2021). No entanto, muitas infecções são assintomáticas e não são diagnosticadas corretamente. Além disso, a semelhança dos sintomas do eritema infeccioso com outras doenças de erupções cutâneas e a ampla circulação de arboviroses no Brasil, dificulta o diagnóstico diferencial (GARCIA; LEON, 2021) variando de acordo com o estado hematológico e imunológico do paciente.

### 2.5.1.1 Genótipos variantes do eritrovírus B19

O genoma viral do eritrovírus B19 é muito conservado, com 98-99 % de similaridade entre os isolados (HICKS; CUBEL; COHEN; CLEWLEY, 1996). Um amplo trabalho foi conduzido por Servant *et al.* (2002) na identificação e classificação taxonômica de variantes, e as manifestações clínicas (SERVANT-DELMAS, 2016). Mais de 1000 amostras de soros e plasmas foram analisadas e divididas em grupos de acordo com a epidemiologia e sintomas. Apesar da heterogeneidade genética entre os eritrovírus detectados, não foi possível observar diferença nas manifestações clínicas entre as infecções causadas pelos diferentes genótipos (SERVANT-DELMAS, 2016). A identificação dessas variantes e análises filogenéticas desses múltiplos isolados do B19V levaram à classificação do parvovírus humano B19 em três genótipos distintos: genótipo 1, com subtipos 1a (o vírus protótipo) e 1b; genótipo 2 (cepas A6 e LaLi); e genótipo 3, com subtipos 3a (cepa V9) e 3b (cepa D91.1)(GARCIA *et al.*, 2017). Esses 3 genótipos são distintos com mais de 9% de divergência nucleotídica em todo o genoma entre as sequências avaliadas (SERVANT; LAPERCHÉ; LALLEMAND; MARINHO *et al.*, 2002).

A distribuição de cada genótipo depende da origem geográfica, da população e do tipo de amostra avaliada. Em relação à origem geográfica, o genótipo 1 é o prevalente em todo o mundo, o genótipo 2 foi detectado em pacientes nascidos antes de 1973, depois de um período sem circulação, foi detectado em um doador de sangue na Alemanha. O genótipo 3 parecia mais restrito à África, porém já foi detectado em outros países, inclusive no Brasil (NORJA *et al.*, 2006). No Brasil os três genótipos já foram detectados e existe a predominância do genótipo 1. O primeiro genoma completo do B19V genótipo 1 A foi de uma amostra de soro suspeita de infecção por dengue, de um caso fatal de um menino de 12 anos no Rio de Janeiro, Brasil (CONTEVILLE, 2015). O genótipo 2 foi detectado apenas em São Paulo em amostras de medula óssea de um paciente com neoplasias hematológicas, no ano de 2004 (SANABANI; NETO; PEREIRA; SABINO, 2006). O genótipo 3 foi detectado em diversos estudos, em municípios como Belém (FREITAS *et al.*, 2008) e em Niterói (AZEVEDO *et al.*, 2012).

### 2.5.1.2 Sintomas e patogenia

O período de incubação, até o surgimento do exantema, é de 4 a 15 dias e a viremia ocorre de 6 a 8 dias após exposição. Eventualmente, alguns sintomas antecedem a erupção cutânea como febre baixa, cefaléia, mialgias, náuseas, diarreia e dores articulares (HEEGAARD & BROWN, 2002). A infecção pelo eritrovírus B19 pode gerar o eritema infeccioso, a artropatia, a crise aplásica transitória, a aplasia pura de células vermelhas, a

erupção papular, purpúrica em mãos e pés e hidropisia fetal (Quadro 2). Algumas manifestações estão relacionadas à elevada morbimortalidade, como a encefalopatia, epilepsia, meningite, miocardite, cardiomiopatia dilatada e hepatite autoimune. O eritrovírus tem sido sugerido por vários autores como agente causal em várias síndromes clínicas, o que por vezes é de difícil comprovação (GARCIA *et al.*, 2017). A infecção pelo B19V durante a gestação é um grave problema de saúde pública, pois no primeiro trimestre de gestação pode ocorrer o aborto e no segundo trimestre o feto pode desenvolver a hidropisia fetal não imune (YOUNG *et al.*, 1984), como o resultado de uma anemia que leva a falência cardíaca, edema generalizado e morte (WRIGHT *et al.*, 1996). O B19V também pode estar associado a casos de morte fetal intrauterina não-hidrópica (SKJOLDEBRAND-SPARRE, 2005).

Quadro 2 - Doenças causadas pelo B19V.

DOENÇA	EVOLUÇÃO CLÍNICA	GRUPO DE PACIENTES
Eritema infeccioso	Aguda	Crianças Saudáveis
Poliartropatia	Aguda	Adultos saudáveis
Crise aplástica transitória	Aguda	Pacientes com distúrbios hemolíticos
Anemia persistente	Crônica	Pacientes imunocomprometidos
Hidropsia fetal	Aguda/Crônica	Fetos (<20 semanas)

Fonte: Adaptado de (YOUNG; BROWN, 2004)

### 2.5.1.3 Diagnóstico

A introdução dos métodos de amplificação do genoma viral fez com que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) se tornasse o método diagnóstico mais sensível para detecção dos vírus, incluindo o B19V em espécimes clínicos (DURIGON *et al.*, 1993). Vários métodos utilizando essa técnica vêm sendo descritos visando o aprimoramento na identificação dos genótipos virais e a quantificação da carga viral (KOPPELMAN, 2007). É necessário que mais estudos sejam voltados para a genotipagem, pois é bastante discutido o significado das variantes dos eritrovírus e sua relação com as doenças hematológicas. Alguns estudos recomendam correlacionar testes sorológicos com testes moleculares para estabelecer um diagnóstico de infecção aguda (MAPLE; HEDMAN; DHANILALL; KANTOLA *et al.*, 2014)

devido a possibilidade de resultados falso-negativos, uma vez que anticorpos contra as proteínas virais VP1 e VP2 podem gerar complexos com as partículas virais e consequentemente se tornar indetectáveis em ensaios sorológicos (MENDELSON *et al.*, 2006), além de demonstrar a persistência do B19V. O diagnóstico laboratorial para a infecção pelo B19V é a detecção de anticorpos específicos, IgM e IgG, em amostras de soro. Anticorpos IgM são detectados após o terceiro dia e o pico é na segunda semana após a infecção. Deste modo, o protocolo para diagnóstico laboratorial mais apropriado consta de PCR-ELISA para determinar a presença do DNA viral juntamente com IgM específica para o B19V. Começa a haver declínio de IgM após 30-60 dias dos sintomas e geralmente não é mais encontrado em 60-90 dias. Anticorpos IgG aparecem após IgM e permanecem pelo resto da vida do paciente, sendo, por essa razão, úteis como marcadores de infecção passada e de imunidade (GALLINELLA, 2003).

Devido as dificuldades de se propagar o vírus em cultura de células, a PCR assumiu importante papel no diagnóstico laboratorial. Esse tipo de método de diagnóstico é importante para alguns pacientes que apresentam viremia, assim, sendo possível detectar o DNA do B19V no sangue antes mesmo da resposta de anticorpos (HEEGAARD & BROWN, 2002).

#### **2.5.1.4** Prevenção e tratamento

A maioria dos casos de eritema infeccioso não requer tratamento específico, apenas tratados os sinais e sintomas, enquanto alguns pacientes com artropatia necessitam de tratamento sintomático (uso de drogas anti-inflamatórias). A infecção em gestantes soronegativas deve ser monitorada por ultrassom semanal, e no caso de anemia fetal alguns autores recomendam realizar transfusão fetal intra uterina (YOUNG; BROWN, 2004).

A prevenção da infecção é importante para os pacientes que têm alto risco de desenvolverem sérias complicações devido a infecção pelo B19V, como os portadores de anemias constitucionais e gestantes soronegativas (CARLSEN, 2006). Na última década, vacinas recombinantes foram testadas em humanos, que se mostraram desencadear respostas rápidas e robustas de produção de anticorpos neutralizantes (BERNSTEIN *et al.*, 2011; PENKERT *et al.*, 2017). A disponibilidade de uma vacina segura e eficaz será de grande importância, principalmente para indivíduos com anemia hemolítica e para mulheres não imunes em idade reprodutiva. A triagem do B19V é essencial em bancos de sangue, devido a possibilidade de infecção durante as transfusões de sangue e/ou seus produtos para pacientes imunodeprimidos, transfundidos e doentes crônicos (CANDOTTI; ETIZ; PARSYAN; ALLAIN, 2004). Apesar deste fato, a triagem ainda não é obrigatória (SLAVOV, 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

De acordo com a rotina realizada no LACEN/MS, um grande número de pacientes ficam sem um resultado conclusivo após a pesquisa dos vírus que estão implantados na rotina laboratorial atual.

Esse foi o ponto crucial e a motivação da principal pergunta deste estudo. Quais outros patógenos estão circulando em nosso estado? Quais outros patógenos seria importante incluir em nossas análises?

Com base em estudos recentes que demonstram a circulação de Mayaro em estados vizinhos ao nosso, a preocupação eminente com casos de óbito de equinos e humanos por Nilo Ocidental no país, com o achado de anticorpos de Oropouche em equinos nativos da região e também pela subnotificação do Eritrovírus B19, salientamos que esse trabalho busca não somente uma resposta acadêmica mas principalmente uma resposta para o fortalecimento do sistema de vigilância em saúde do estado de Mato Grosso do Sul através da implantação de um fluxograma mais abrangente que servirá como importante ferramenta para a vigilância epidemiológica em reconhecer precocemente as novas áreas com transmissão para minimizar o impacto dessas doenças na população.

O diagnóstico para B19V deve ser realizado, particularmente entre mulheres grávidas, pacientes imunocomprometidos e indivíduos com doenças hemolíticas, já que nestes casos a infecção é mais grave. A implementação na rotina laboratorial pode esclarecer se o eritrovírus B19 pode ser um dos agentes etiológicos das doenças exantemáticas, assim como determinar a frequência da sua infecção nos pacientes.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a presença dos vírus Mayaro, Oropouche, Oeste do Nilo e Eritrovírus B19, utilizando um novo fluxograma de diagnóstico diferencial, em amostras encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) com a suspeita clínica inicial de dengue, zika ou chikungunya, e que tiveram resultados negativos para esses vírus.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Propor a padronização de um novo fluxo de diagnóstico diferencial no LACEN/MS, para agentes patógenos que geram sintomas similares nos pacientes.
- 2- Fornecer resultados laboratoriais que contribuam para o esclarecimento diagnóstico junto ao serviço de saúde de Mato Grosso do Sul.
- 3- Produzir ferramentas para ampliar a capacidade preventiva em relação à ocorrência de patógenos emergentes e reemergentes no estado.
- 4- Caracterizar geneticamente os patógenos detectados nas amostras avaliadas, bem como sua descrição epidemiológica.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 LOCAL DO ESTUDO**

As amostras analisadas foram de indivíduos oriundos de vários municípios de Mato Grosso do Sul. O estudo foi desenvolvido no Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Mato Grosso do Sul (LACEN-MS). O laboratório foi criado no ano de 1979, subordinado à Diretoria Geral de Saúde Coletiva da Secretaria de Estado de Saúde – SES/MS. Faz parte do conjunto da Rede Nacional de Laboratórios que constitui o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – SISLAB. Classificado como porte II e nível “E” (nível mais elevado) pela Portaria nº 2606/GM de 2005, o LACEN realiza procedimentos laboratoriais de média e alta complexidade desde 1992 e atende aos programas efetivamente consolidados em nível federal nos 79 municípios de Mato Grosso do Sul.

### **5.2 TIPO DE ESTUDO**

Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional e descritivo. Optou-se pela busca de dados ambidirecional, de forma retrospectivo no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2021 e prospectivo (no período de janeiro a junho de 2022), com análises de amostras biológicas de casos suspeitos de arboviroses, que foram negativos para dengue, zika e chikungunya, no estado de Mato Grosso do Sul.

Os dados e as amostras foram cedidos pelo LACEN/MS para a pesquisa, no contexto do diagnóstico diferencial e os dados epidemiológicos secundários foram obtidos do Sistema de Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL e organizados em planilha Excel® para posterior análise.

### **5.3 APROVAÇÃO ÉTICA**

O estudo conta com a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos da Universidade Católica Dom Bosco-Mato Grosso do Sul, CAAE: 54019821.2.0000.5162 (anexo B) e com as autorizações do LACEN/MS e da Secretaria de Estado de Saúde do MS (anexo H).

### **5.4 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESTUDO**

Foram utilizadas amostras biológicas pertencentes à soroteca do LACEN-MS. O objetivo principal desse banco é possibilitar os estudos retrospectivos de agentes virais emergentes e reemergentes responsáveis por problemas relacionados à saúde pública no Mato Grosso do Sul e no Brasil. Inicialmente, as amostras biológicas foram definidas após levantamento e análise cuidadosa das fichas dos pacientes com até 5 dias do início dos sintomas, em vários municípios do estado, encaminhadas com suspeita clínica de dengue, zika e chikungunya e que tiveram resultados negativos para os três vírus, entre os anos de 2017 a 2022. Foram consideradas amostras negativas para o vírus zika aquelas que tiveram resultado

“não detectável” na técnica de RT-qPCR e, “não reagente” na técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As amostras com suspeita de dengue foram consideradas negativas ao ter resultado “não reagente” na técnica de detecção de NS1 e ELISA e, “não detectável” na RT-qPCR. Para o diagnóstico de chikungunya foram consideradas negativas as amostras que tiveram resultado “não detectável” na RT-qPCR e “não reagente” no ELISA.

Foram excluídas da pesquisa as amostras que apresentaram resultado reagente ou detectável para dengue, zika ou chikungunya. Somente amostras biológicas que atendessem a todos os critérios de elegibilidade indicados abaixo fariam parte desse estudo:

- precisavam ser soro, plasma ou líquido e com resultado não reagente/não detectável para dengue, zika e chikungunya;
- coletadas até o 5º dia do início dos sintomas;
- volume mínimo de 300uL de material.

Ao todo, foram selecionadas 773 amostras biológicas (soro) entre os anos 2017 e 2022 (Tabela 1), armazenados no setor de Virologia do LACEN/MS à temperatura de -30°C e -80°C.

**Tabela 1 - Número de amostras usadas no estudo em cada ano.**

ANO	2017	2018	2019	2020	2021	2022
<b>Total amostras</b>	82	160	285	71	86	89

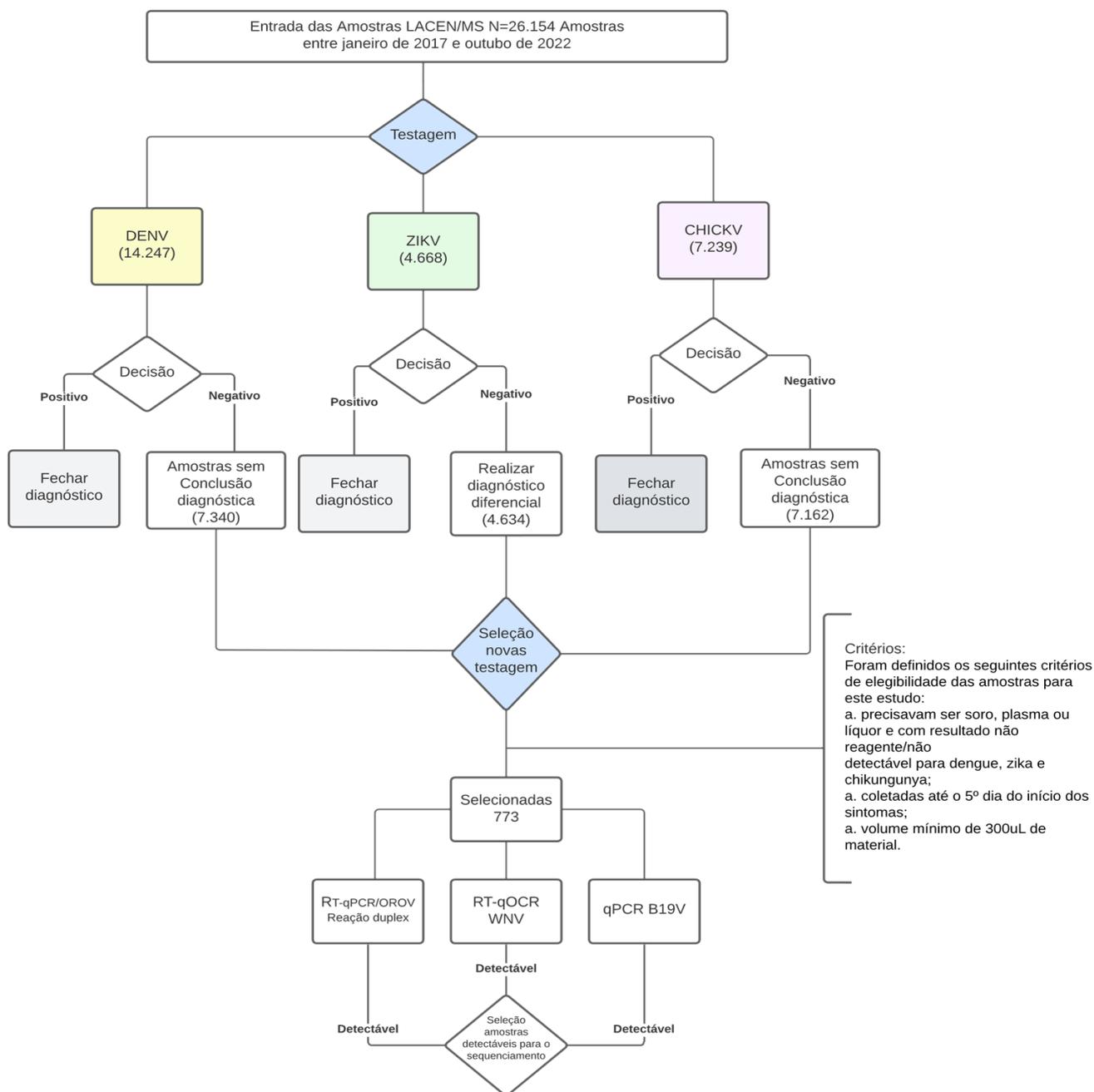
## 5.5 DADOS SECUNDÁRIOS DOS PACIENTES

Alguns dados dos pacientes foram utilizados nas análises: idade, sexo, local de residência, local de trabalho, últimas viagens, data de início dos sintomas da doença e data de coleta do material biológico. As duas últimas informações são essenciais para definir a técnica de diagnóstico. Todos esses dados foram fornecidos pelo LACEN-MS, por meio eletrônico e/ou físico e digitados em um banco de dados construído especialmente para esta pesquisa com o programa Microsoft office Excel®.

## 5.6 ANÁLISE LABORATORIAL DAS AMOSTRAS

Todo o processo de testagem das amostras foi realizado no LACEN-MS, seguindo o fluxograma mencionado na figura 12.

Figura 12 - Fluxograma do desenho experimental do presente estudo.



Fonte: Elaboração própria.

### 5.6.1 Extração de ácido nucléico viral

Para a extração do material genético de cada uma das amostras de soro, foi utilizado o kit comercial QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN®, Hiden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Brevemente, foram adicionados 140µL de cada uma das amostras em tubos de 1,5 mL contendo 5,6µL de carreador de RNA, acrescidos a 560µL de tampão de digestão. A mistura

foi homogeneizada em vortex por 15 segundos, e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 560µL de etanol 100% e foram transferidos 630µL da solução, cuidadosamente, no centro da coluna sílica gel previamente identificada. Ela foi centrifugada a 6.000xg por 1 minuto, e transferida a um novo tubo coletor. Após descarte do sobrenadante, foi realizada repetição da última etapa. O tubo coletor contendo o filtrado foi descartado, e foram adicionados 500µL do tampão de lavagem AW1. A coluna foi novamente centrifugada (6.000xg por 1 minuto) e o procedimento descrito acima repetido, adicionando-se 500µL do tampão de lavagem AW2. A coluna foi então centrifugada a 10.000xg por 3 minutos, o filtrado foi descartado, e novamente foi realizada uma centrifugação a 10.000xg por 1 minuto para secagem da mesma. Em seguida, a coluna foi transferida a um tubo de 1,5 mL identificado e foram adicionados 60µL de tampão de eluição AVE incluso no kit incubando por 1 minuto em temperatura ambiente. Foi realizada uma centrifugação a 6.000 x g por 1 minuto. A coluna foi descartada e o RNA extraído foi armazenado a temperatura de -70°C até o uso. Para cada agente patógeno pesquisado foi extraído um controle negativo da reação. Com o advento da pandemia o LACEN-MS recebeu incentivos do Ministério da Saúde e do governo do estado para a aquisição de equipamentos de última geração para compor seu parque tecnológico e com isso garantir uma maior capacidade de produção e de prestação de serviços com maior qualidade e agilidade em suas análises. Após o ano de 2020, as amostras foram também analisadas no robô, Qiasymphony SP, da marca Qiagen, com capacidade para extração de material genético de 96 amostras em 4h, utilizando o QIASymphony DSPVirus/Pathogen Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante.

### **5.6.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para a realização das reações RT-qPCR e qPCR, foram utilizados os equipamentos [7500 Fast Real-Time PCR System](#), o [QuantStudio™ 5](#) e o [QuantStudio™ 7 Pro](#) disponíveis no Laboratório Central de Saúde Pública de Mato Grosso do Sul.

### **5.6.3 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-qPCR).**

Para a detecção de MAYV e OROV foram utilizados os oligonucleotídeos (tabela 2) e o protocolo multiplex desenvolvido pela equipe de Virologia do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) (NAVECA *et al.*, 2017). Na pesquisa do WNV foram usados os oligonucleotídeos (tabela 3) e protocolo de (LANCIOTTI *et al.*, 2000).

Em todas as reações foi utilizado o gene humano de controle interno de amplificação (RNase P) para descartar falsos-negativos na avaliação dos vírus mencionados, certificando a acurácia dos resultados.

**Tabela 2: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de MAYV e OROV.**

Oligo	Sequência	Referência
MAYV_FNF	5' CACGGACMTTTTGCCTTCA 3'	
MAYV_FNR	5' AGACTGCCACCTCTGCTKGAG 3'	
MAYV_FNP	5'(VIC) ACAGATCAGACATGCAGG 3'	Naveca <i>et al.</i> , 2017
OROV_FNF	5' TCCGGAGGCAGCATATGTG 3'	
OROV_FNR	5' ACAACACCAGCATTGAGCACTT 3'	
OROV_FNP	5'(FAM)CATTTGAAGCTAGATACGG 3'	

**Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de WNV**

Oligo	Sequência (5'-3')	Referência
WNENV-forward	TCAGCGATCTCTCCACCAAAG	
WNENV-reverse	GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG	LANCIOTTI <i>et al.</i> , 2000
WNENV-probe	TGCCCGACCATGGGAGAAGCTC	

Foi utilizado o Kapa Probe Fast qPCR Master Mix (2x) - Sigma-aldrich na preparação dos reagentes para a RT-qPCR, seguindo os cálculos mostrados nos quadros 3 e 4.

**Quadro 3 - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de OROV/MAYV.**

Reação	1 X	( x N )
H <sub>2</sub> O free	0.5	
2X PCR Master Mix Kapa Probe Roche CAT.Nº 07959818001	5.0	
Primer Mix MAYV 5µM	0.6	
Probe MAYV 10µM YAK	0.1	
Primer Mix OROV 5µM	0.6	
Probe OROV 10µM FAM	0.1	
Rox Dye	0.4	
RT	0.2	
RNAv	2,5 µl	
Volume final	10 µl	

Condições para  
amplificação:  
1 ciclo  
42°C 5' (RT)  
95°C 5' (Taq)  
45 ciclos  
95°C 3" (Denaturação)  
60°C 30" (Extensão)  
40X

**Quadro 4** - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de WNV.

Reação	1 X	( x N )
H <sub>2</sub> O free	1,2	
2X PCR Master Mix Kapa Probe Roche CAT.Nº 07959818001	5.0	
Primer Mix WNV (5µM)	0.6	
Probe 10µM FAM	0.1	
Rox Dye	0.4	
RT	0.2	
RNAv	2,5 µl	
Volume final	10 µl	

Condições para amplificação:  
1 ciclo  
42°C 5' (RT)  
95°C 5' (Taq)  
45 ciclos  
95°C 3" (Denaturação)  
60°C 30" (Extensão)  
40X

Em cada placa óptica foram colocados 7,5µl do master mix por amostra e 2,5µl do material genético extraído (RNA/DNA). A placa foi centrifugada e colocada no termociclador em tempo real seguindo as condições de amplificação descritas acima.

Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados controles de reagentes e ambiente (NTC- no template control) e como controle positivo para MAYV, OROV e WNV foram usados antígenos liofilizados fornecidos pelo Laboratório de Referência em Arboviroses Instituto Evandro Chagas (IEC), Pará.

#### 5.6.4 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qPCR).

Para detecção do B19V foram utilizados os oligonucleotídeos (tabela 4) e o protocolo desenvolvido por Naveca e col. do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia (dados ainda não publicados).

Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados controles de reagentes e ambiente (NTC- no template control) e como o controle positivo para Parvovírus (B19) foi cedido pela profa Dra Luciane Amado do Instituto Oswaldo Cruz, RJ (IOC/ Fiocruz Rio de Janeiro).

Em todas as reações foi utilizado o gene humano de controle interno de amplificação (RNase P) para descartar falsos-negativos na avaliação dos vírus mencionados, certificando a acurácia dos resultados.

**Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na detecção de B19V**

Oligo	Sequência (5'-3')	Referência
B19_FNF	ACAAGCCTGGGCAAGTTAGC	Naveca <i>et al.</i>
B19_FNR	CATTRCCAGGCCCAACAT	
B19_FN_P	TACAACTACCCGGTACTAAC	

Foi utilizado o Kapa Probe Fast qPCR Master Mix (2x) - Sigma-aldrich na preparação dos reagentes para a qPCR, seguindo os cálculos mostrados no quadro 5:

**Quadro 5 - Cálculo do volume de reagente para PCR para pesquisa de B19V**

Reação	1 X	( x N )
H <sub>2</sub> O free	1,2	
2X PCR Master Mix Kapa Probe Roche CAT.Nº 07959818001	5.0	
Primer Mix MAYV (5µM)	0.6	
Probe 10µM FAM	0.1	
Rox Dye	0.4	
RT	0.2	
RNAv	2,5 µl	
Volume final	10 µl	

Condições para amplificação:  
1 ciclo  
42°C 5' (RT)  
95°C 5' (Taq)  
45 ciclos  
95°C 3" (Denaturação)  
60°C 30" (Extensão)  
40X

Em cada placa óptica foram colocados 7,5ul do master mix por amostra e 2,5ul do material genético extraído (DNA). A placa foi centrifugada e colocada no termociclador em tempo real seguindo as condições de amplificação descritas acima.

### 5.6.5 Interpretação dos resultados da RT-qPCR e qPCR

Os resultados foram reportados como “positivos ou detectáveis” ao observar uma curva sigmóide no software do equipamento utilizado (ABI 7500, QuantStudio™ 5 ou QuantStudio™ 7 Pro, da Applied Biosystems®), com valor de CT menor ou igual a 37 para os arbovírus e B19V (NAVECA *et al.*, 2017; LANCIOTTI *et al.*, 2000). O valor do CT ou “threshold cycle em inglês”, corresponde ao ciclo em que a fluorescência ultrapassa a linha do limite e permite correlacionar o aumento dela com a quantidade de DNA do patógeno avaliado.

### 5.6.6 Sequenciamento

Para a obtenção do genoma do B19V, os ácidos nucleicos extraídos foram, inicialmente, submetidos à reação de PCR convencional utilizando 3 pares de iniciadores (Quadro 6) que cobrem quase o genoma viral completo. As PCRs foram realizadas com a enzima SuperFi II Green (ThermoFisher, cat. 12361010) e iniciadores a 0,5µM em reações de 10µl (volume final),

as quais acrescentava-se 1µl dos ácidos nucleicos extraídos. Foi utilizada uma programação de 98°C por 30” / 35 ciclos: 98°C por 10” - 55°C por 10” - 72°C por 2’ / 72°C por 5’ / 4°C /∞.

**Quadro 6** – Sequências de oligonucleotídeos utilizados para detecção do B19V.

Forward	Sequência 5’- 3’	Reverse	Sequência 5’- 3’	Tamanho
B19V_350 FNF	CGGCATCTGATTTGGTGCTT C	B19V_2387 FNR	CACACATAATCAACCCCAACTA ACA	2037
B19V_1605 FNF	AAGTACAGGAAAAACAAACT TGGCAA	B19V_3862 FNR	GTAAGCATATTGAGGGGGAA AGTATAC	2258
B19V_3298 FNF	CCCAAGCATGACTTCAGTTAA TTCT	B19V_4976 FNR	GGAGTGTTTACAATGGGTGCA C	1679

Ao final das reações, cada amplicon foi submetido à eletroforese à 80V por 1h, sendo visualizado em gel de agarose a 1% corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). Para confirmar o tamanho esperado do produto foi utilizado o padrão de tamanho molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, cat. SM0314).

Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos a um protocolo de precipitação por polietilenoglicol 8000, com adaptações realizadas pelo grupo de pesquisa do Dr. Felipe Naveca. Inicialmente adicionou-se PEG8000 (Promega, Cat. V3011) a 20% em uma proporção 1/1 no tubo contendo o produto de PCR e seguiu-se incubação a 37°C por 15 minutos. Após o período de incubação era realizada uma centrifugação a 13.000g por 15 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 125µl de etanol 80%, seguindo uma nova etapa de centrifugação a 12.000g por 2 minutos com posterior descarte do sobrenadante. O microtubo foi então levado ao concentrador de DNA a vácuo Mivac (Genevc SP Scientific) onde permaneceu por 15 minutos a uma temperatura de 37° e então o DNA foi ressuspensionado em água livre de nucleases e quantificado em espectrofotômetro de micro volume (Biodrop Duo - Biochrom).

Os produtos purificados seguiram para sequenciamento de alto rendimento. Inicialmente, por se tratar de mais de um amplicon para cada amostra, foi necessário fazer o pool dos amplicons, ou seja, unir os três amplicons de cada amostra. Sendo assim, todos os amplicons foram quantificados no equipamento Qubit 2.0 com o kit Qubit dsDNA HS Assay (ThermoFisher) para utilização em quantidades equimolares.

O preparo das bibliotecas foi realizado com o kit *Nextera XT DNA Library Preparation* (Illumina). As etapas de tagmentação enzimática, adição de adaptadores e indexes, amplificação, normalização e preparo do pool das bibliotecas foi realizada conforme descrito no manual do fabricante a partir de 1ng de DNA em 5µl. Antes de preparar o pool das bibliotecas, todas foram quantificadas utilizando o kit Qubit dsDNA HS Assay.

O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina) utilizando o kit de sequenciamento MiSeq Reagent v2 de 500 ciclos (Figura 13). Os dados gerados após o sequenciamento foram analisados no software Geneious Prime 2022.0.1 para a montagem dos contigs de cada amostra, frente ao genoma de referência NC\_000883, utilizando a ferramenta BMAP v 38.84, sob condições “default”.

Figura 13 - Etapas para sequenciamento no sistema MiSeq (Illumina)



**Fonte:** <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/miseq-data-sheet-m-gl-00006-translations/miseq-system-specification-sheet-m-gl-00006-ptb.pdf>

## 5.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os genomas consensos do B19V obtidos nesse estudo e representantes dos genótipos G1a: M13178 (isolado Au); G1b: DQ357064 (isolado Vn147); G2: AY064475 (isolado A6); G2 AY044266 (isolado LaLi); G3a: AX003421 (isolado V9) e G3b: AY083234 (isolado D91.1) foram alinhados com a ferramenta MAFFT v7.490 com seleção automática do algoritmo.

Posteriormente, o arquivo de alinhamento foi submetido à reconstrução filogenética por máxima-verossimilhança usando o programa FastTree 2.1.11 usando modelo evolutivo GTR. A árvore filogenética teve a raiz colocada no ponto central e foi editada no programa FigTree 1.4.4.

## 5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Modelo lineares generalizados mistos, com efeito aleatório para os municípios e distribuição binomial, foram utilizados para entender como os resultados do teste de PCR podem estar relacionados com: (1) o sexo e a faixa etária dos pacientes, bem como com o ano de amostragem; e (2) os sintomas registrados nas fichas do pacientes. Assim, os seguintes modelos foram :

$$\text{logit}(\text{Resultado PCR}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Idade} + \beta_2 \text{Sexo} + \beta_3 \text{Idade} \times \text{Sexo} + \beta_4 \text{Ano} + b_{\text{municípios}}$$

$$\text{logit}(\text{Resultado PCR}) = \beta_0 + \beta_1 \text{Febre} + \beta_2 \text{Cefaleia} + \beta_3 \text{Mialgia} + \beta_4 \text{Exantema} + \beta_5 \text{Dor nas}$$

$$\text{costas} + \beta_6 \text{Dor retro-orbital} + \beta_7 \text{Artralgia} + \beta_8 \text{Conjuntivite} + \beta_9 \text{Náuseas} + \beta_{10} \text{Leucopenia} + \beta_{11} \text{Petéquias} + \beta_{12} \text{Mal estar} + \beta_{13} \text{Prurido} + \beta_{14} \text{Diarreia} + \beta_{15} \text{Falta de apetite} + b_{\text{municípios}}$$

Os sintomas foram avaliados em um modelo separado, por apresentarem um número menor de registros. O sintoma “desconforto abdominal” não foi adicionado no modelo por estar correlacionado com “diarreia”. Já os sintomas “dor de garganta”, “insuficiência renal” e “plaquetopenia” não foram inseridos por apresentarem 1–2 registros, gerando problemas nas estimativas, como separação completa de pontos.

As análises foram realizadas com o pacote ‘lme4’ (BATES; MÄCHLER; BOLKER; WALKER, 2015) no software R (TEAM, 2022). As tabelas e os gráficos das estimativas foram gerados com o pacote do R ‘jtools’ (LONG, 2022). Os modelos foram verificados quanto à normalidade com o teste de uniformidade (teste de Kolmogorov–Smirnov), dispersão dos resíduos e autocorrelação espacial (teste I de Moran), utilizando o pacote ‘DHARMA’ (HARTING, 2022).

Nos anos com amostragem para todos os meses, a estatística circular foi empregada para testar padrões sazonais no número de casos em Mato Grosso do Sul (ALMEIDA; CODEÇO; LUZ, 2018; L; GD; EP, 2019; LANDLER; INSTITUTE OF ZOOLOGY; RESEARCH INSTITUTE OF MOLECULAR PATHOLOGY (IMP); RUXTON *et al.*, 2022). Para isso foram utilizadas duas abordagens, um teste de hipóteses e uma abordagem baseada em modelos, ambos implementados no pacote do R ‘CircMLE’ (FITAK, 2017). No teste de hipóteses, a proposta é testar a hipótese nula de que os dados são distribuídos uniformemente ao longo do ano, versus alguma forma de concentração, seja ela unimodal, bimodal ou multimodal (LANDLER; INSTITUTE OF ZOOLOGY; RESEARCH INSTITUTE OF MOLECULAR PATHOLOGY (IMP); RUXTON *et al.*, 2022). O teste de Hermans-Rasson foi empregado para verificar a uniformidade nas distribuições, visto que tem alto poder estatístico para distribuições multimodais agrupadas (LANDLER, 2019).

Já na abordagem baseada em modelos, o pacote calcula a máxima verossimilhança (maximum likelihood) de 10 modelos descritos por (SCHNUTE, 1992) e os compara utilizando o Critério de Informação de Akaike (AIC) (S, 2020) o AIC com correção para tamanhos de amostra pequenos (AICc) ou o Critério de Informação Bayesiano (BIC). Assim, com essa abordagem é possível identificar padrões de ocorrência. Resumidamente, os modelos se enquadram em três categorias principais: (i) modelo uniforme (M1), cuja orientação é aleatória; (ii) modelos unimodais alternativos (M2A, M2B, M2C) com uma única direção preferencial; e (iii) modelos bimodais alternativos (M3, M4, M5) com duas direções preferenciais. Os modelos bimodais podem ainda ser divididos em axiais (M3A, M3B, M4A, M4B) e não axiais (M5A,

M5B). Cada modelo é descrito por até cinco parâmetros: uma direção média ( $\Phi_1$ , em radianos) e um parâmetro de concentração ( $k_1$ ) para o primeiro modo, uma direção média ( $\Phi_2$ , em radianos) e um parâmetro de concentração ( $k_2$ ) para o segundo modo, e o tamanho proporcional da primeira distribuição ( $\lambda$ ; a segunda distribuição é assim fixada no tamanho  $1-\lambda$ ) (Schnute & Groot, 1992; Fitak & Johnsen, 2017; Landler et al., 2020; (OJEDA; INIBIOMA (UNCOMA-CONICET); SCHAAF; INECO (UNJUJUY-CONICET) *et al.*, 2022).

No presente estudo, os modelos foram comparados utilizando o AICc (BURNHAM; ANDERSON; HUYVAERT, 2010). Além disso, foi utilizado o peso de Akaike ( $w_i$ ), que descreve a probabilidade de que um determinado modelo seja o melhor modelo (aproximado) dado os dados experimentais e a coleção de modelos considerados. A razão do peso do modelo  $i$  vs. o peso do modelo  $j$  quantifica a força da evidência a favor do modelo  $i$  sobre o modelo  $j$ , sempre que mais de um modelo for retido com base no  $\Delta AICc$  (BURNHAM; ANDERSON; HUYVAERT, 2010); (PORTET, 2020); (OJEDA; INIBIOMA (UNCOMA-CONICET); SCHAAF; INECO (UNJUJUY-CONICET) *et al.*, 2022). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* R v4.2.1.

## 6 RESULTADOS

Entre janeiro de 2017 e outubro de 2022, o LACEN MS recebeu 14.247 amostras para a pesquisa do vírus dengue, 7.239 para chikungunya e 4.668 para zika. Algumas amostras tinham na ficha médica a solicitação para pesquisa dos três arbovírus e outras, apenas para um deles. Porém, é rotina do LACEN incluir a pesquisa do DENV quando a ficha médica solicita somente CHIKV e/ou ZIKV, considerando que o estado de Mato Grosso do Sul é endêmico para esse patógeno. No entanto, 28 amostras com estas características não tiveram suas análises concluídas por vários fatores, entre eles: cadastro incorreto, requisição sem amostra, preenchimento inadequado da requisição/ficha de investigação, material insuficiente ou amostra imprópria para a análise solicitada.

A partir das amostras recebidas no LACEN MS, das 14.247 amostras analisadas para dengue, 7.340 (51,5%) resultaram negativas. Das 7.239 amostras para chikungunya, 7.162 (98,9%) foram negativas para esse alvo e, das 4.668 amostras com suspeita clínica de zika, 4.634 (99,3%) tiveram resultados negativos para o vírus zika (Quadros 07, 08 e 09).

**Quadro 7** - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de DENV por ano.

<b>DENV/ANO</b>	<b>Não Detectável</b>	<b>Detectável</b>	<b>Indeterminado</b>	<b>Não testado</b>	<b>Total</b>
<b>2017</b>	<b>89</b>	<b>32</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>122</b>
<b>2018</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>51</b>
<b>2019</b>	<b>489</b>	<b>1320</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1809</b>
<b>2020</b>	<b>506</b>	<b>2149</b>	<b>2</b>	<b>26</b>	<b>2685</b>
<b>2021</b>	<b>256</b>	<b>763</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1019</b>
<b>2022</b>	<b>5967</b>	<b>2594</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>8561</b>
<b>Total</b>	<b>7340 (51,5%)</b>	<b>6876 (48,3%)</b>	<b>3 (0,02%)</b>	<b>26 (0,18%)</b>	<b>14247 (100%)</b>

Fonte: GAL/LACEN-MS

**Quadro 8** - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de CHIKV, por ano.

<b>CHIKV/ANO</b>	<b>Não Detectável</b>	<b>Detectável</b>	<b>Indeterminado</b>	<b>Não testado</b>	<b>Total</b>
<b>2017</b>	<b>583</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>594</b>
<b>2018</b>	<b>393</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>434</b>
<b>2019</b>	<b>1115</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1115</b>
<b>2020</b>	<b>340</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>341</b>
<b>2021</b>	<b>621</b>	<b>20</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>642</b>
<b>2022</b>	<b>4110</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4113</b>
<b>Total</b>	<b>7162 (98,9%)</b>	<b>66 (0,91%)</b>	<b>10 (0,14%)</b>	<b>1 (0,014%)</b>	<b>7239 (100%)</b>

Fonte: GAL/LACEN – MS

**Quadro 9** - Total de amostras recebidas no LACEN/MS para a pesquisa de ZIKV, por ano.

<b>ZIKAV/ANO</b>	<b>Não Detectável</b>	<b>Detectável</b>	<b>Indeterminado</b>	<b>Não testado</b>	<b>Total</b>
<b>2017</b>	<b>456</b>	<b>19</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>478</b>
<b>2018</b>	<b>253</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>261</b>
<b>2019</b>	<b>1065</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1068</b>
<b>2020</b>	<b>355</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>356</b>
<b>2021</b>	<b>380</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>380</b>
<b>2022</b>	<b>2125</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2125</b>
<b>Total</b>	<b>4634 (99,3%)</b>	<b>23 (0,49%)</b>	<b>10 (0,21%)</b>	<b>1 (0,02%)</b>	<b>4668 (100%)</b>

Fonte: GAL/LACEN-MS

Na presente pesquisa para responder a situação do elevado número de amostras (19.136) com suspeita clínica de dengue, chikungunya e zika e, com resultado negativo para esses alvos, foram selecionadas todas as amostras que estavam armazenadas na soroteca do LACEN. Durante a rotina do laboratório, um grande número de frascos foi desprezado por ter volume insuficiente para as análises necessárias, algumas estavam com a identificação comprometida e outras foram desprezadas por falta de espaço para armazenamento, resultando em 773 amostras que foram analisadas pela técnica de RT-PCR para os vírus MAYV, OROV e WNV, e por qPCR para a pesquisa de B19V.

A seleção das amostras foi feita com base na demanda espontânea da rotina do LACEN, tomando em conta os sintomas registrados nas fichas médicas: pacientes com síndrome febril aguda, febre (aferida ou não), acompanhada pelos sintomas cefaleia, mialgia, artralgia, dor retro orbitária, mialgia, e mal-estar geral. Os dados sociodemográficos também foram obtidos das fichas de notificação que acompanham as amostras. No Quadro 10 está demonstrada a população total do estudo e as amostras que foram positivas na pesquisa de B19V.

**Quadro 10** - População do estudo por ano e os casos positivos de B19V.

ANO Nº amostras	2017 n=82	2018 n=160	2019 n=285	2020 n=71	2021 n=86	2022 n=89	Total n=773
MAYV/OROV	Não detectável						
WNV	Não detectável						
B19V	17 (20,7%)	22 (13,75%)	25 (8,8%)	13 (18,3%)	02 (2,3%)	03 (3,4%)	82 (10,6%)
Total	17	22	25	13	02	03	82
Sequenciadas	03	01	-	-	-	-	-

Na Figura 14 mostra a representação gráfica dos casos positivos de B19V em relação ao número total de amostras analisadas de cada ano. É importante salientar que, em todos os anos analisados, foi possível a detecção do B19V.

A Figura 15 apresenta a comparação entre os casos positivos de ZIKV, DENV e CHIKV pesquisados na rotina espontânea do LACEN/MS com os resultados de B19V realizados neste estudo, representados por suas linhas específicas sobrepostas sobre as colunas que indicam toda a população de amostras que entraram na rotina do laboratório para a pesquisa de arboviroses, no período de 2017 a 2022. Ainda na Figura 15 observamos que B19V foi o segundo vírus de maior ocorrência nesse período, abaixo somente do DENV.

Figura 14 - Número de amostras com resultado "detectável" (Positivo) e "não detectável" (Negativo) para o B19V, no período de 2017 a 2022.

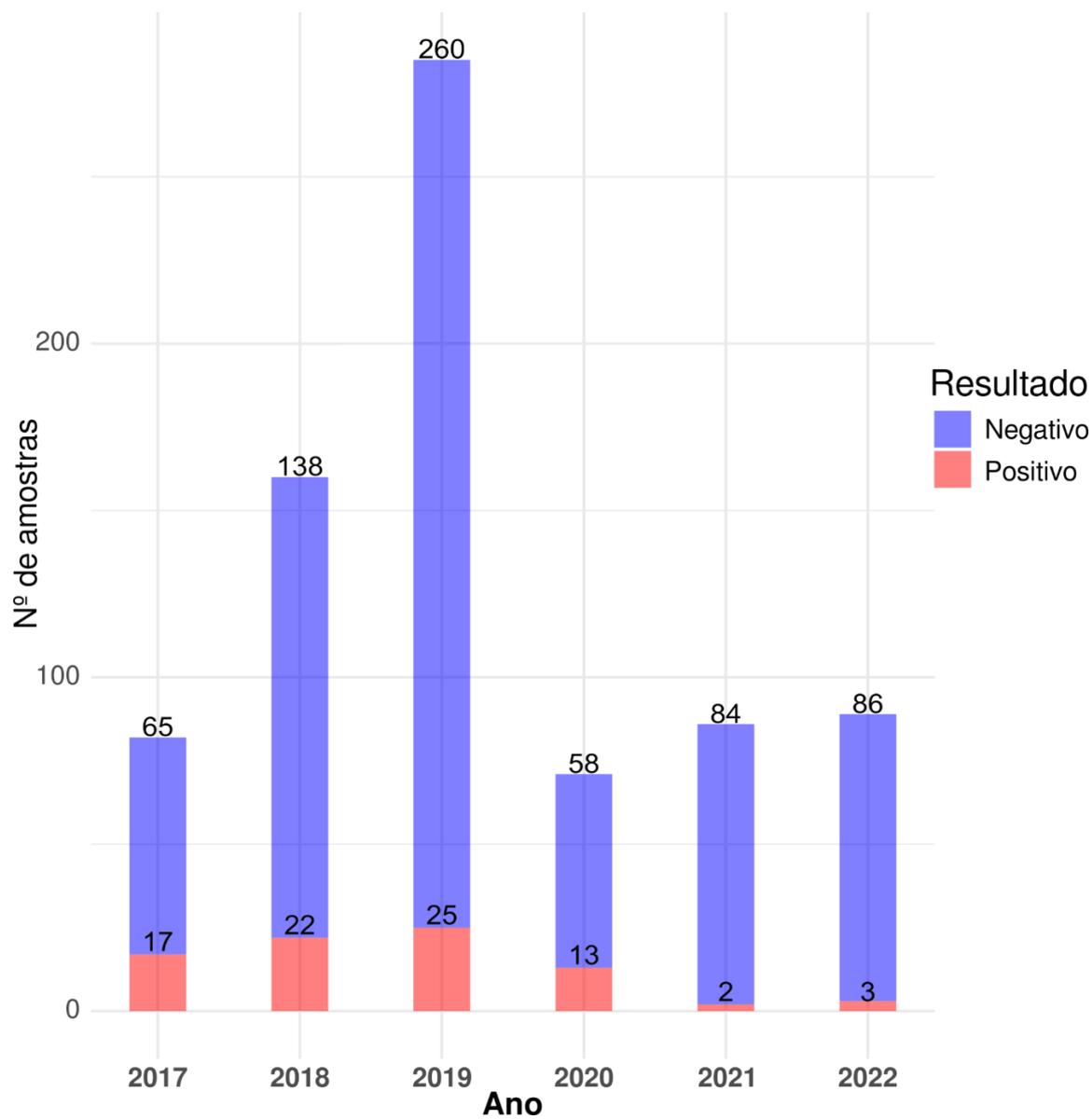
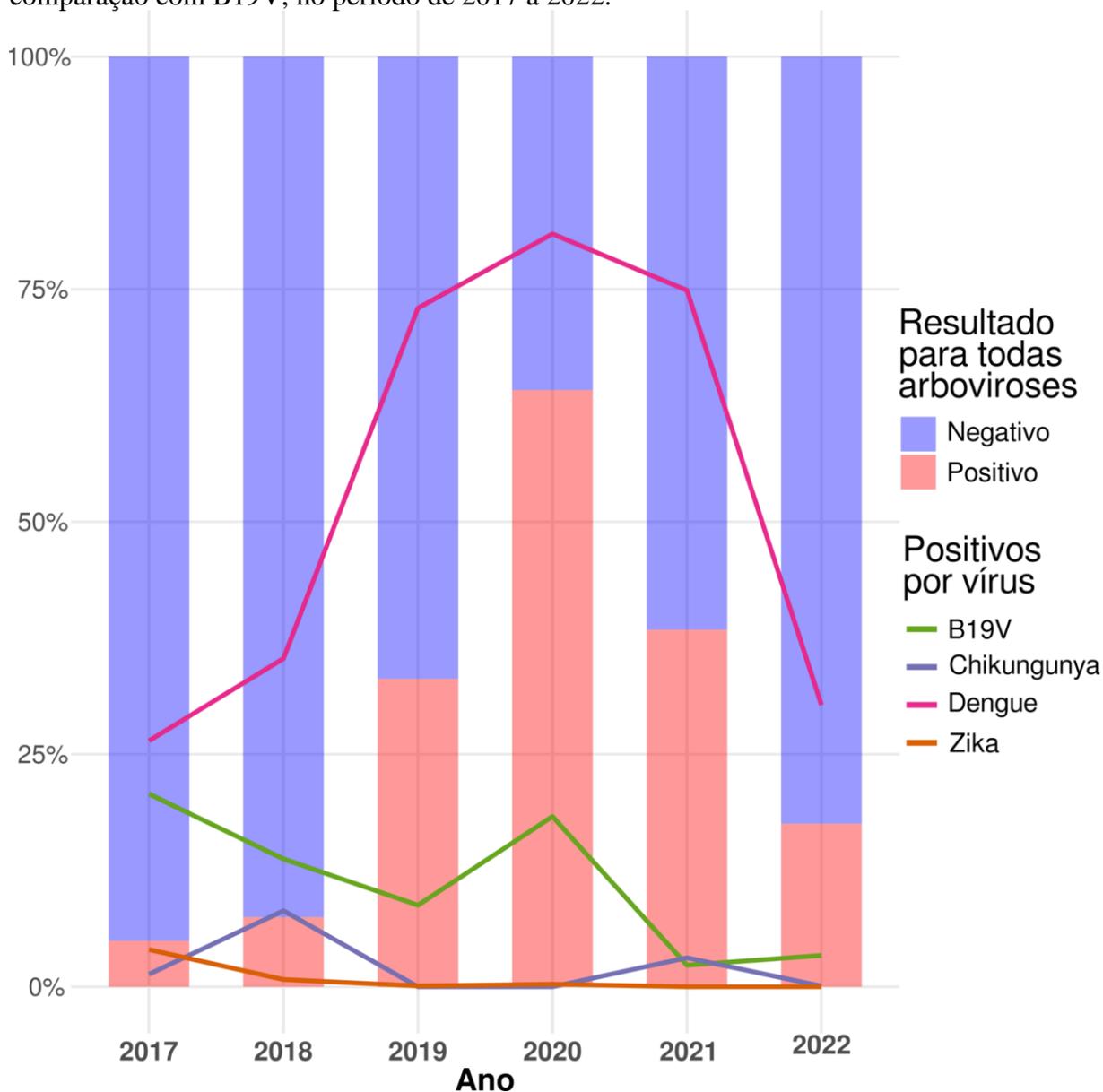
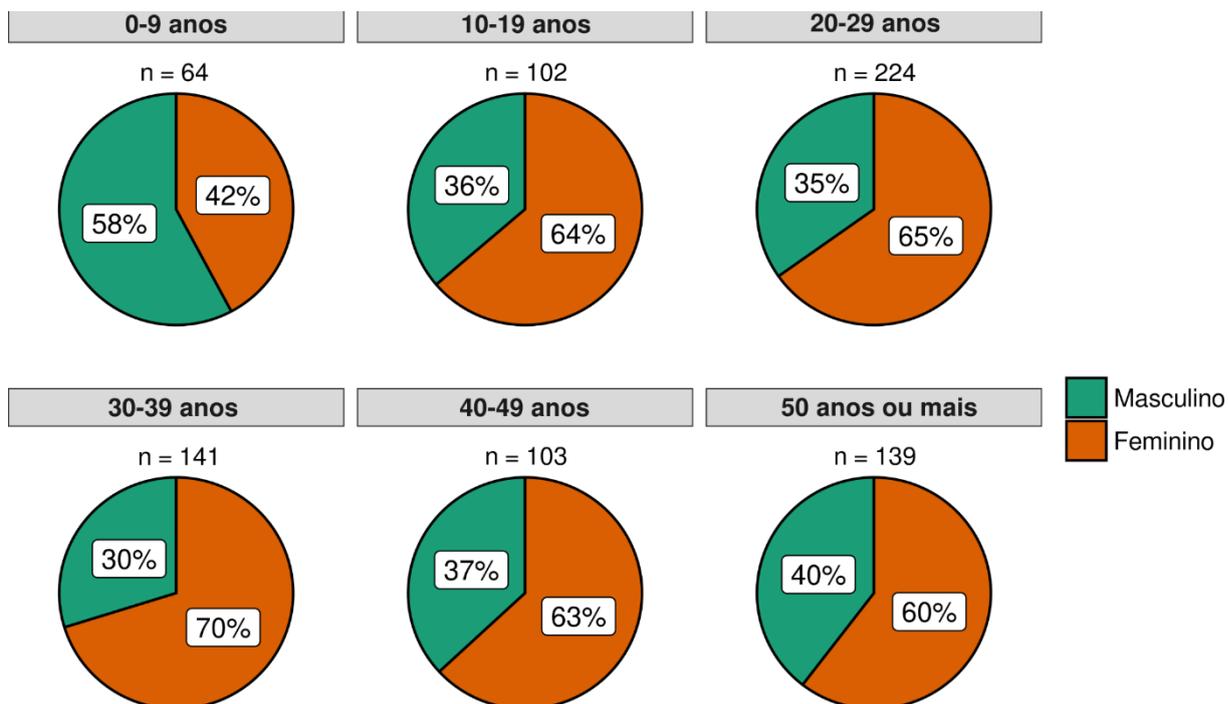


Figura 15 - Amostras de arboviroses pesquisadas no LACEN/MS e seus resultados em comparação com B19V, no período de 2017 a 2022.



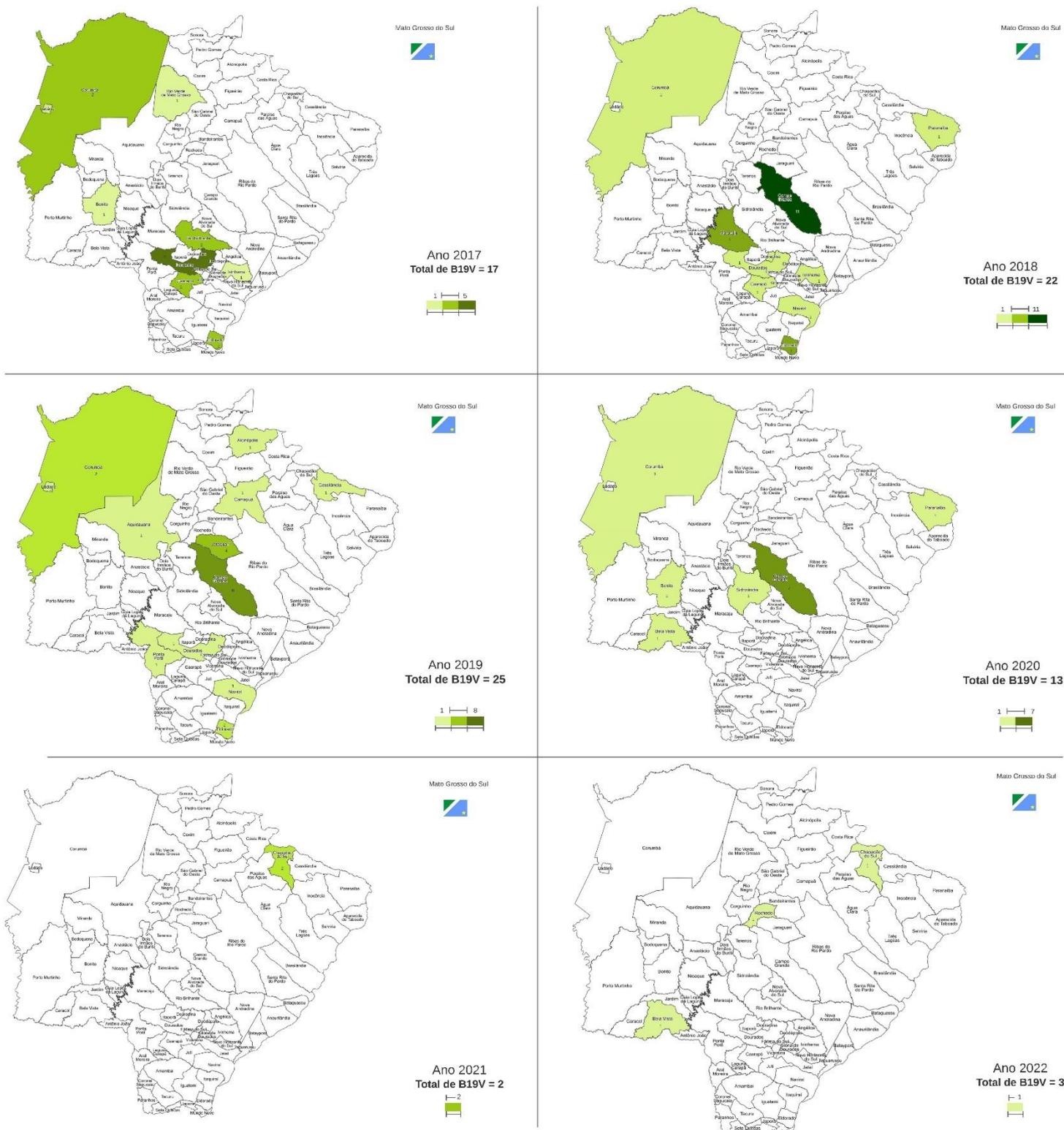
A análise do perfil da população total pode ser evidenciada na figura 15 com a descrição das variáveis, faixa etária e sexo, distribuídas no período analisado. Entre as amostras do estudo foi evidenciado que até os 9 anos de idade, o sexo masculino teve uma taxa de infecção de 58% vs. 42% no sexo feminino. Em idades acima dos 10 anos e até os 50 anos ou mais, ocorre uma inversão, o sexo feminino teve uma taxa de infecção igual ou superior a 60%. Vale ressaltar que na faixa etária de 30 a 39 anos, a taxa de infecção no sexo feminino foi de 70% (Figura 16).

Figura 16 - Faixa etária e sexo dos pacientes amostrados. N:número de pacientes amostrados por faixa etária.



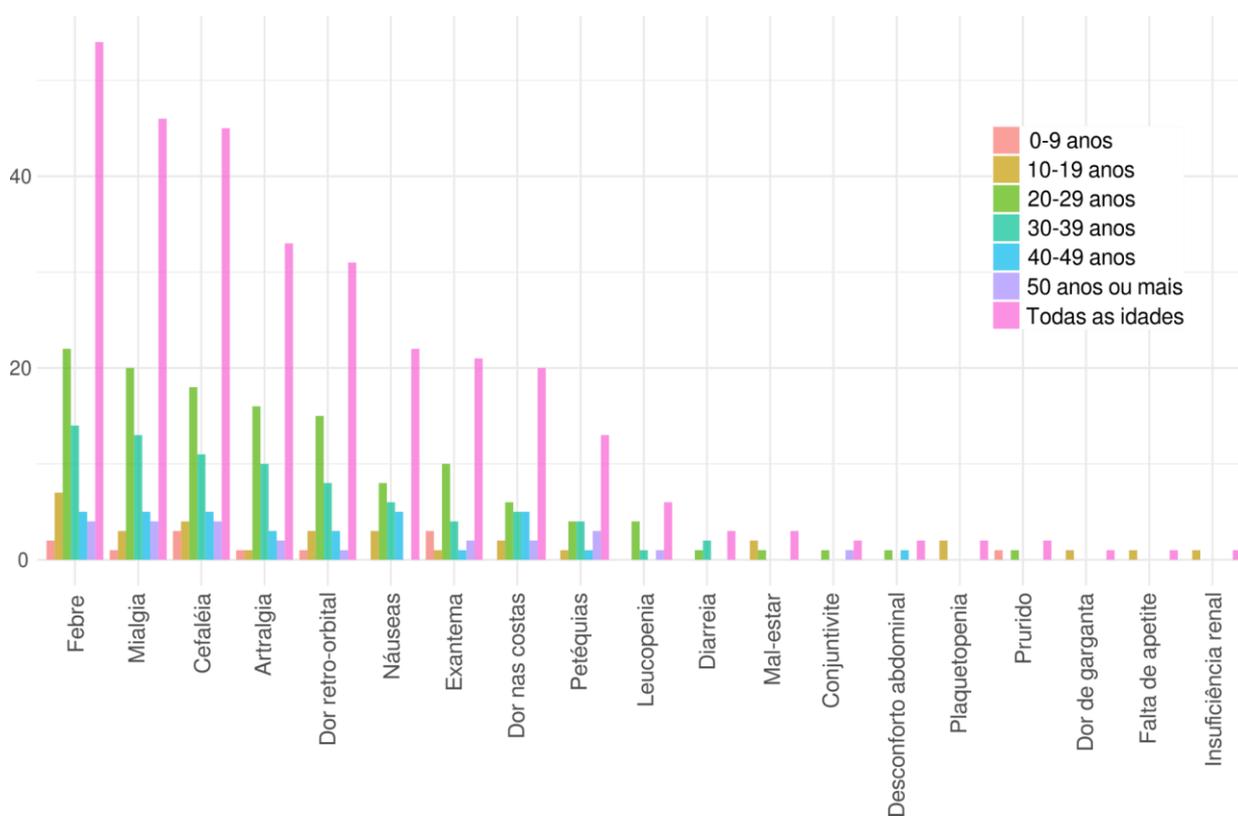
No que se refere aos municípios, a análise dos dados possibilitou a identificação, no período do estudo, de amostras procedentes dos 79 municípios de Mato Grosso do Sul, 24 tiveram casos positivos para B19V. São eles: Alcinoópolis (1 caso), Aquidauana (1 caso), Bela Vista (2), Bonito (3), Caarapó (3), Camapuã (1), Campo Grande (28), Cassilândia (1), Chapadão (4), Corumbá (7), Douradina (1), Dourados (6), Eldorado (6), Ivinhema (2), Jaraguari (4), Ladário (2), Maracaju (1), Naviraí (2), Paranaíba (2), Ponta Porã (1), Rio Brilhante (2), Rio Verde de Mato Grosso (1), Rochedo (1) e Sidrolândia (1 caso). Figura 17.

Figura 17 - Casos positivos de B19V, segundo os municípios do estado de Mato Grosso do Sul, durante o período de 2017 a 2022.



Após a avaliação da frequência de manifestações clínicas encontradas nas fichas dos pacientes com B19V, observou-se que a febre predominou seguida de mialgia, cefaléia, artralgia, dor retro orbital, náuseas, exantema entre outros (Figura 18). Do total de 83 pessoas infectadas 28 eram do sexo masculino e 55 do sexo feminino. Ao considerar a distribuição de casos por faixa etária, observou-se que os adultos entre 18 a 70 anos de idade foram os mais acometidos (84,3%) e, nas idades de 1 a 17 anos o número de casos foi de 13(15,7%).

Figura 18 - Frequência dos sintomas e faixa etária dos casos de B19V, no estado de Mato Grosso do Sul (2017 a 2022).



O protocolo de detecção do B19V por PCR em tempo real, utilizado neste trabalho, foi padronizado e validado pelo pesquisador Felipe Naveca e equipe (Fiocruz Amazônia), a fim de estabelecer um diagnóstico diferencial para esse vírus em grupos de pacientes que apresentem sintomas similares a outras doenças exantemáticas. Foi possível amplificar o material genético do vírus em amostras que tinham diferentes cargas virais, com valores de Cq variando entre 4 e 37 (figuras 19 e 20).

Figura 19 - Amplificação e detecção de B19V em amostras com Cq variando de 4 a 37.

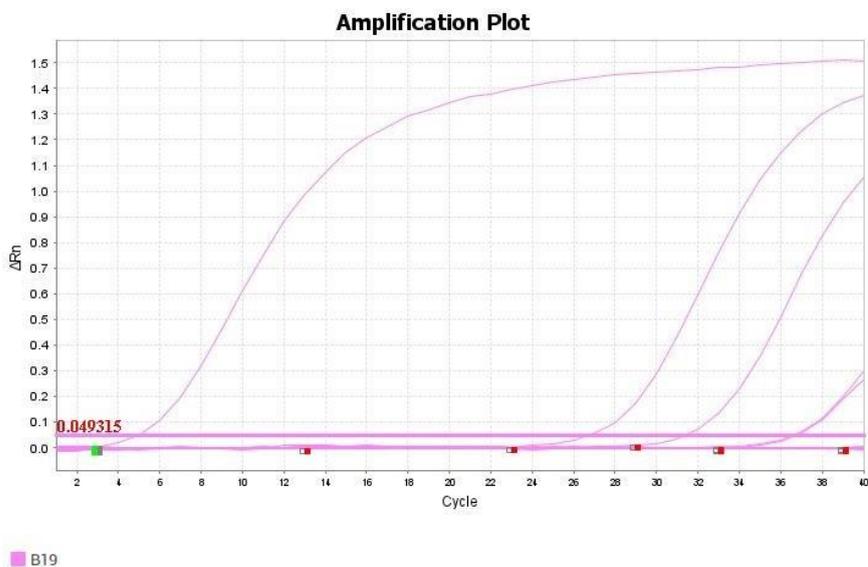
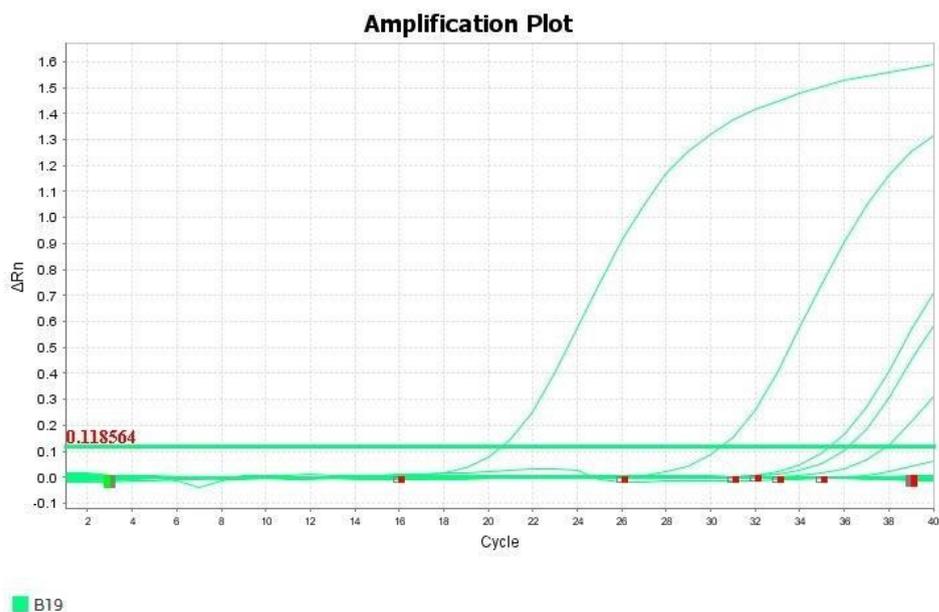


Figura 20 - Amplificação e detecção de B19V em amostras com Cq variando de 20 a 37.



Com o intuito de conhecer as características genéticas do eritrovírus B19 circulante na região, foram sequenciadas as amostras positivas representativas do período do estudo e com principal atenção às gestantes. Infecções pelo B19V podem resultar em transmissão vertical para o feto, causando infecção dos precursores eritróides e hemólise intensa, levando a severa anemia, hidropsia fetal e morte (BONVICINI, 2017). O desfecho fetal adverso após a infecção parece ser maior entre 11 e 23 semanas de gestação, relacionado com o período hepático de atividade hematopoiética (YAEGASHI *et al.*, 1998). A infecção pelo B19V durante a gestação é um grave problema de saúde pública, pois no primeiro trimestre de gestação pode ocorrer o

aborto e no segundo trimestre o feto pode desenvolver a hidropsia fetal não imune (Brown *et al.*, 1994).

Neste estudo, entre os casos de B19V, tivemos 10 gestantes com resultado positivo que não tiveram o diagnóstico em tempo oportuno para o devido acompanhamento durante a gestação (Quadro 11).

Quadro 11 - Casos positivos de B19V em amostras de gestantes.

Ano	Idade	Município	Período gestação	Sequenciamento	Carga Viral (Cq)
2017	21	Dourados	gestante	Não	22
2017	20	Corumbá	gestante	Não	30
2017	32	Corumbá	gestante	Não	31
2017	26	Dourados	gestante	Não	30
<b>2017</b>	<b>19</b>	<b>Dourados</b>	<b>gestante</b>	<b>Genótipo 1a</b>	<b>13</b>
2019	17	Corumbá	33 semanas	Não	36
2019	25	Campo Grande	gestante	Não	37
2019	28	Campo Grande	8 semanas	Não	36
2019	20	Campo Grande	18 semanas	Não	35
2019	28	Campo Grande	29 semanas	Não	31

Foi selecionado para o sequenciamento inicial a amostra de uma gestante de 19 anos com Cq de 13, alta carga viral, com apenas febre referida e plaquetopenia (46.000 plaquetas) descritos na ficha de notificação. Foi realizado contato com a vigilância epidemiológica do estado para tentar conhecer os fatos ocorridos durante a gestação e pós-parto, porém nenhuma informação relevante havia sido reportada na época.

Também dentre as amostras positivas para B19V por qPCR, uma pertence ao paciente que evoluiu para óbito, porém, não foi possível sequenciar por não possuir material clínico (soro) suficiente e também apresentou um Cq de 37, com carga viral baixa sugerindo coleta fora do tempo oportuno para pesquisa direta do vírus, portanto não seria uma amostra de escolha para essa finalidade. Na requisição do exame nenhuma informação relevante estava relacionada. As amostras inicialmente sequenciadas pertenciam a pacientes que relataram

principalmente sintomas como febre, dor de cabeça, dor retro orbital, dor muscular e também exantema no momento da coleta (Tabela 05), apresentando sintomas inespecíficos de difícil diferenciação com uma série de doenças endêmicas no Brasil.

**Tabela 5 - Informações como sexo, idade, carga viral, principais características clínicas e genótipo dos pacientes B19V positivos sequenciados.**

Após o sequenciamento procedeu-se o alinhamento dos segmentos consenso,

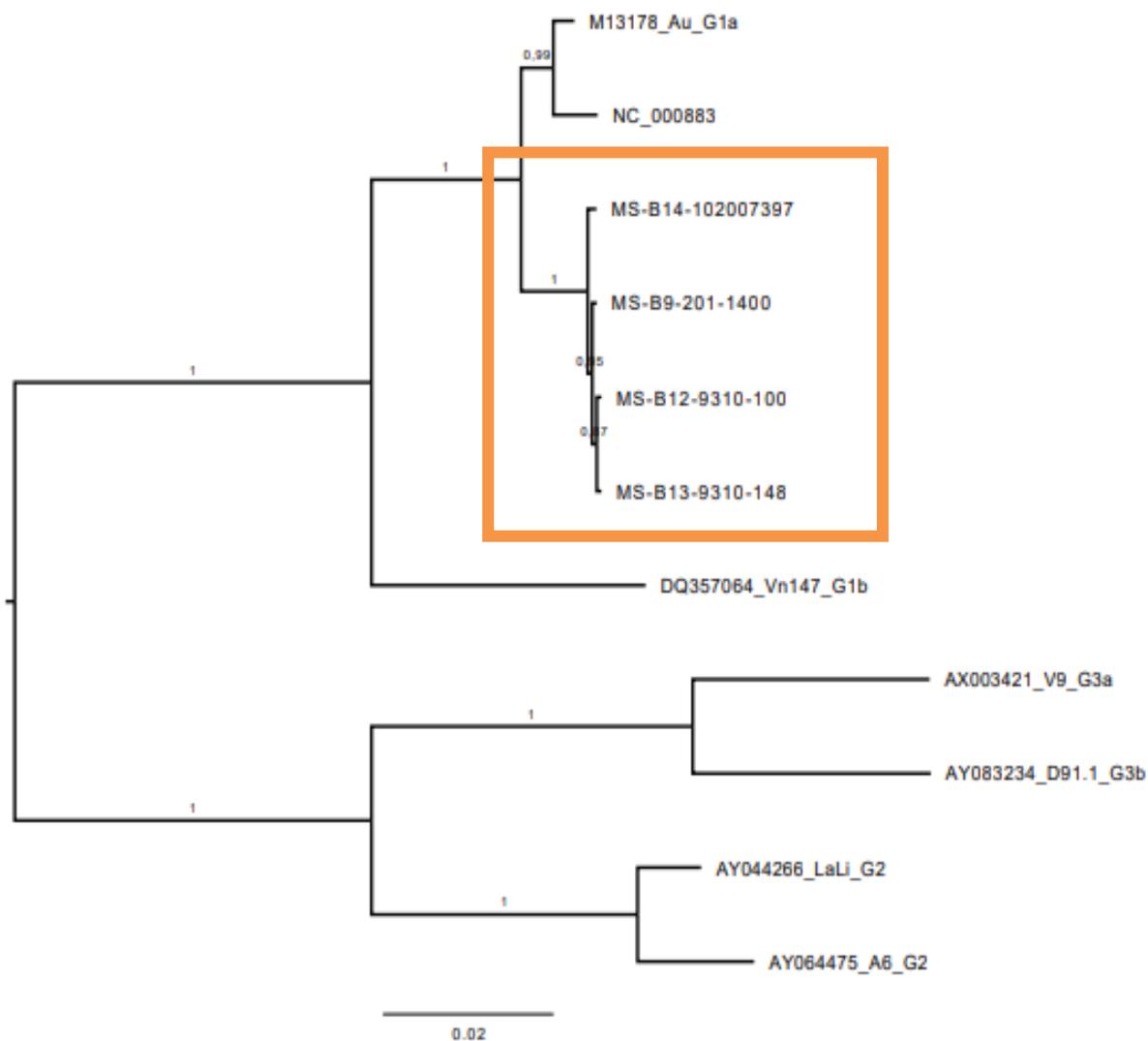
Sequências	Sexo	Idade	Cq	Febre	Cefaleia	Dor retro-orbital	Artralgia	Exantema	Genótipo
<b>MS B14 102007397</b>	F	20	5	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	G1a
<b>MS B9 2011400</b>	M	26	4	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	G1a
<b>MS B12 9310-100</b>	F	19	13	Sim	Não	Não	Não	Não	G1a
<b>MS B13 9310-148</b>	M	32	4	Sim	Não	Sim	Sim	Não	G1a

possibilitando o estudo da variabilidade genética destas amostras. Das quatro amostras sequenciadas inicialmente, todas foram similares entre si e entre as sequências padrões de eritrovírus no GenBank.

Os quatro genomas consensos do B19V obtidos nesse estudo (todos acima de 5500bp) e representantes dos genótipos G1a: M13178 (isolado Au); G1b: DQ357064 (isolado Vn147); G2: AY064475 (isolado A6); G2 AY044266 (isolado LaLi); G3a: AX003421 (isolado V9) e G3b: AY083234 (isolado D91.1) foram alinhados com a ferramenta MAFFT v7.490 com seleção automática do algoritmo. Posteriormente, o arquivo de alinhamento foi submetido à reconstrução filogenética por máxima-verossimilhança usando o programa FastTree 2.1.11 usando modelo evolutivo GTR. A árvore filogenética teve a raiz colocada no ponto central e foi editada no programa FigTree 1.4.4 (Figura 21).

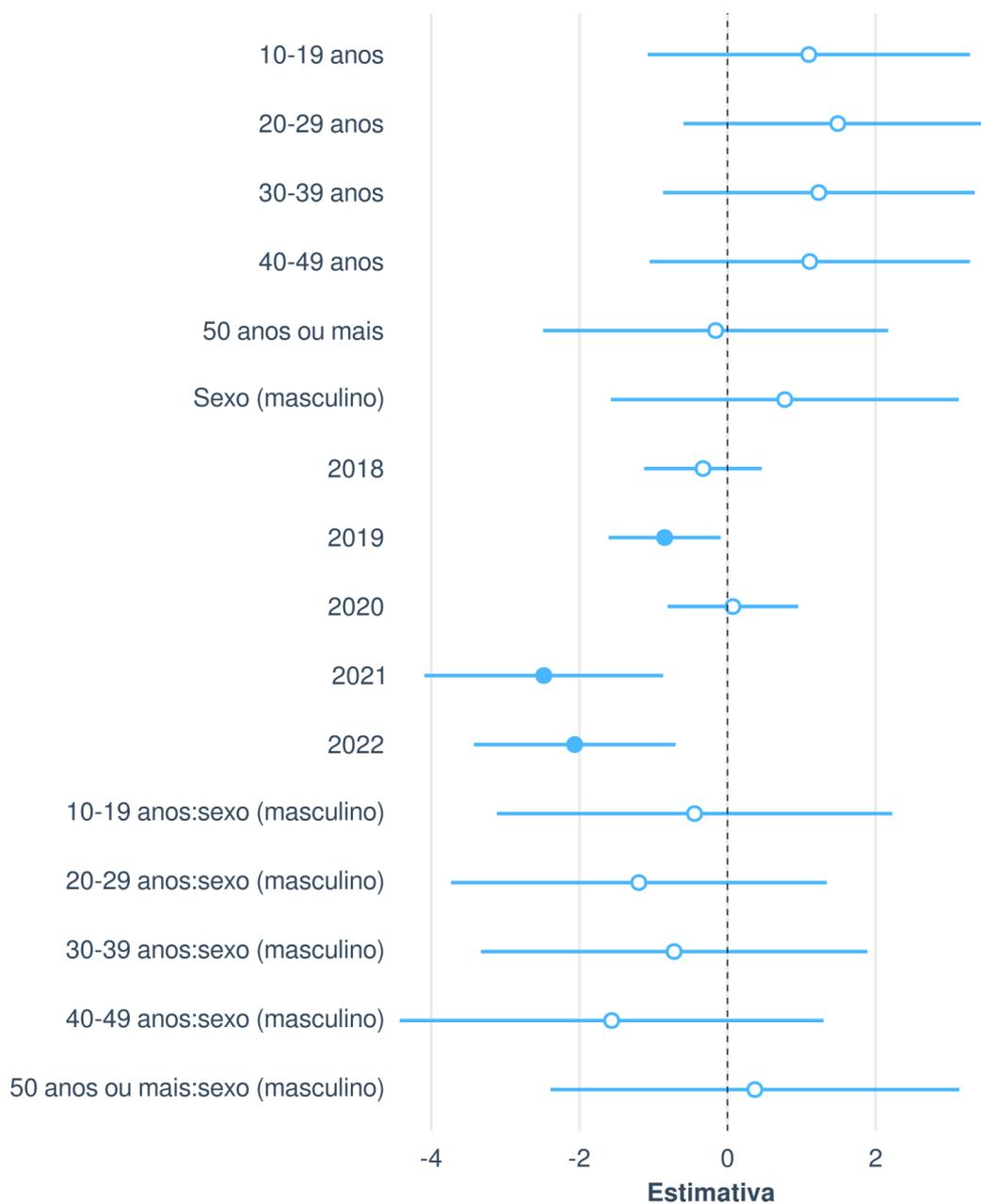
O resultado da reconstrução filogenética mostra que todas as amostras pertencem ao genótipo 1a (G1a) do B19V.

Figura 21 - Análise filogenética dos Eritrovírus: Sequências do MS (iniciadas por MS seguida por número comparadas com sequências padrões no GenBank.



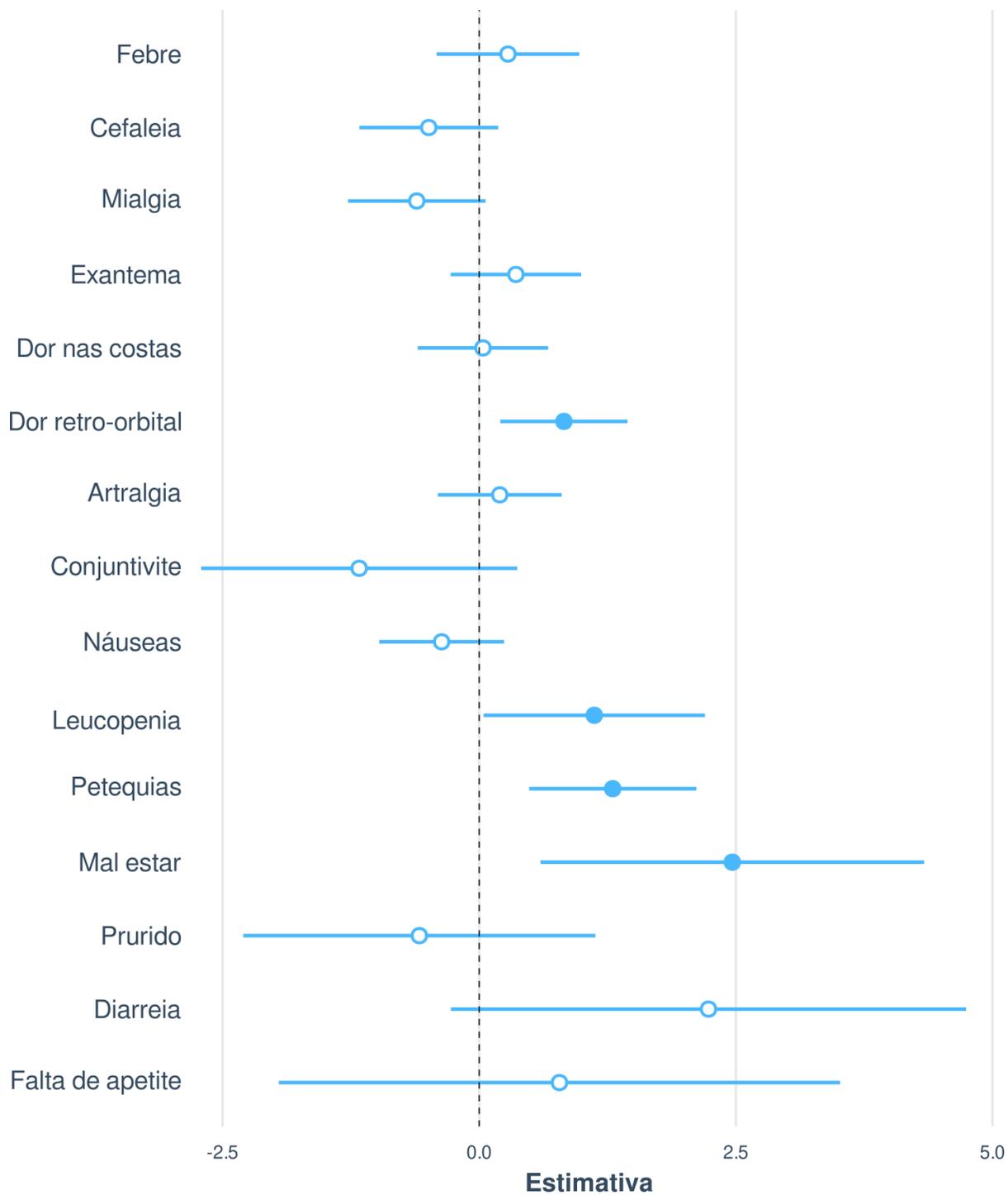
A probabilidade de resultados positivos para B19 não variou significativamente em relação ao sexo e a faixa etária dos pacientes. Entretanto, a ocorrência foi diferente entre os anos 2019, 2021 e 2022 sendo significativamente menores que 2017. Nos anos 2018 e 2020 não houve diferença em relação a 2017 (**Tabela 06; Figura 22**).

Figura 22 - Estimativas do modelo linear generalizado misto das características dos pacientes e período. Pontos preenchidos indicam as variáveis significativas ( $p < 0.05$ ), enquanto as barras r o intervalo de confiança 95%.



Já em relação aos sintomas, a detecção de B19 ficou significativamente associada com os sintomas “dor retro-orbital”, “leucopenia”, “petéquias” e “mal estar” quando comparados com os sintomas das amostras que foram negativas para B19V. (Tabela 07; Figura 23).

Figura 23 - Estimativas do modelo linear generalizado dos sintomas. Pontos preenchidos indicam as variáveis significativas ( $p < 0.05$ ), enquanto as barras representam o intervalo de confiança 95%.



**Tabela 6.** Estimativas do modelo linear generalizado misto das características dos pacientes e período, com o intervalo de confiança 95% entre colchetes.

Variáveis	Estimativa
10-19 anos	1.1 [-1.08, 3.28]
20-29 anos	1.49 [-0.59, 3.57]
30-39 anos	1.23 [-0.87, 3.34]
40-49 anos	1.11 [-1.05, 3.27]
50 anos ou mais	-0.16 [-2.49, 2.17]
Sexo (masculino)	0.77 [-1.58, 3.12]
2018	-0.33 [-1.12, 0.47]
2019	-0.85* [-1.60, -0.09]
2020	0.07 [-0.81, 0.96]
2021	-2.48* [-4.09, -0.87]
2022	-2.06* [-3.43, -0.70]
10-19 anos:sexo (masculino)	-0.44 [-3.11, 2.23]
20-29 anos:sexo (masculino)	-1.2 [-3.73, 1.34]
30-39 anos:sexo (masculino)	-0.72 [-3.33, 1.89]
40-49 anos:sexo (masculino)	-1.56 [-4.43, 1.30]
50 anos ou mais:sexo (masculino)	0.37 [-2.39, 3.13]

\*  $p < 0.05$ .

**Tabela 7.** Estimativas do modelo linear generalizado misto dos sintomas, com o intervalo de confiança 95% entre colchetes.

<b>Variáveis</b>	<b>Estimativa</b>
Febre	0.28 [-0.41, 0.97]
Cefaleia	-0.49 [-1.17, 0.18]
Mialgia	-0.61 [-1.28, 0.06]
Exantema	0.36 [-0.28, 0.99]
Dor nas costas	0.04 [-0.60, 0.67]
Dor retro-orbital	0.82* [0.21, 1.44]
Artralgia	0.20 [-0.40, 0.80]
Conjuntivite	-1.17 [-2.71, 0.37]
Náuseas	-0.37 [-0.97, 0.24]
Leucopenia	1.12* [0.04, 2.20]
Petéquias	1.30* [0.49, 2.12]
Mal estar	2.47* [0.60, 4.33]
Prurido	-0.58 [-2.30, 1.13]
Diarreia	2.23 [-0.28, 4.74]
Falta de apetite	0.78 [-1.95, 3.51]

\*  $p < 0.05$ .

Uma característica importante da infecção pelo B19V no Brasil é seu padrão cíclico de ocorrência cada 3 a 5 anos, observando-se anos com altas taxas de infecção seguidos por períodos com baixa circulação, como ocorreu em 1988-1989, 1995-1996, 1999-2000, 2004-2005, 2009-2010, 2013-2014 (GARCIA; LEON, 2021; OLIVEIRA; AFONSO; CURTI; SILVA *et al.*, 2017). Após o ano de 2014, não houve estudos observacionais que verificassem os períodos epidêmicos de infecção pelo B19V. Após a avaliação da sazonalidade do B19V nas amostras estudadas no período de 2017 a 2022, observou-se que os casos de infecção pelo vírus se distribuem ao longo dos anos. No ano de 2017 a ocorrência de B19V se mostrou mais elevada quando comparada com os outros anos, porém próxima dos anos 2018 e 2020.

Os resultados do teste de Hermans-Rasson demonstraram que o número de casos foi sazonal para todos os anos avaliados, 2017 (7.29;  $p = 0.033$ ), 2018 (13.02;  $p < 0.001$ ) e 2019 (13.90;  $p < 0.001$ ). Para o ano de 2017, apesar do melhor modelo (M3A; **Tabela 08; Figura 24**) ter apresentado um AICc  $w_i$  com mais que o dobro do segundo, os modelos seguintes ainda assim podem ser considerados escolhas plausíveis. Ao considerar os dois primeiros modelos (M3A e M4A; **Tabela 08; Figura 24**), eles apresentaram juntos um AICc  $w_i = 0.55$ , o que significa que há pelo menos 55% de chance de que seja realmente a melhor aproximação que descreve os dados, dado o conjunto candidato de orientações consideradas. Ambos os modelos são bimodais axiais, sugerindo uma distribuição em dois pontos de tamanhos iguais no ano de 2017, uma em cada semestre, com a data média de casos em **setembro** (data média = 01/09/2017).

No ano de 2018, não houve um modelo que se destacou, sendo que os dois primeiros foram igualmente suportados, com AICc  $w_i$  muito próximos. Os dois primeiros (M5A e M3A; **Tabela 09; Figura 25**) apresentaram juntos um AICc  $w_i = 0.71$ . Apesar dos dois serem bimodais, um não é axial (M5A), enquanto o outro sim (M3A), sendo mais complicado determinar um padrão para o ano de 2018. Mesmo assim, ambos os modelos apresentaram uma divisão de distribuição entre os dois semestres, com uma maior presença de casos mais próximo do final de cada semestre, com a data média de casos entre julho e agosto (data média = 23/07/2018).

Em contraste, o padrão apresentado em 2019 foi inequívoco, com uma distribuição unimodal (M2A, AICc  $w_i = 0.72$ ; **Tabela 10; Figura 26**) e concentrada entre março e abril (data média = 17/03/2019).

Figura 24 - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2017. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (setas tracejadas).

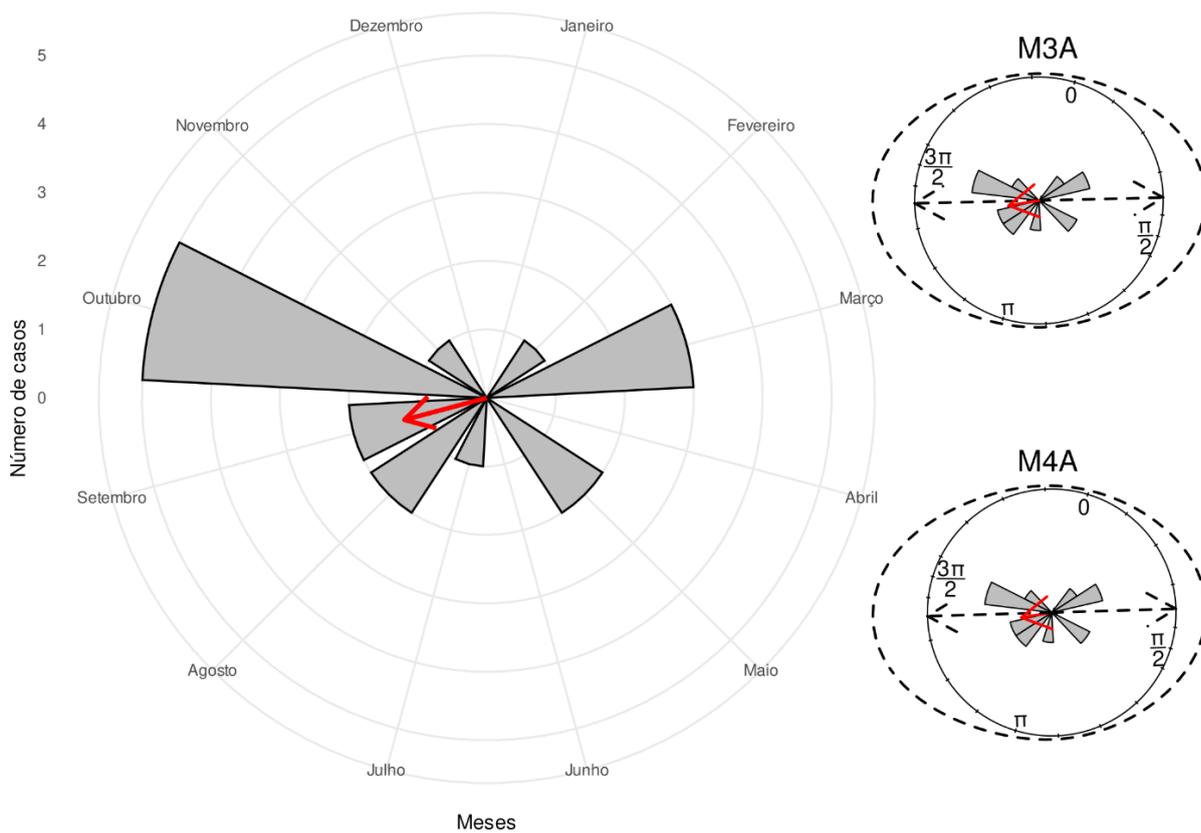


Figura 25 - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2018. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (setas tracejadas).

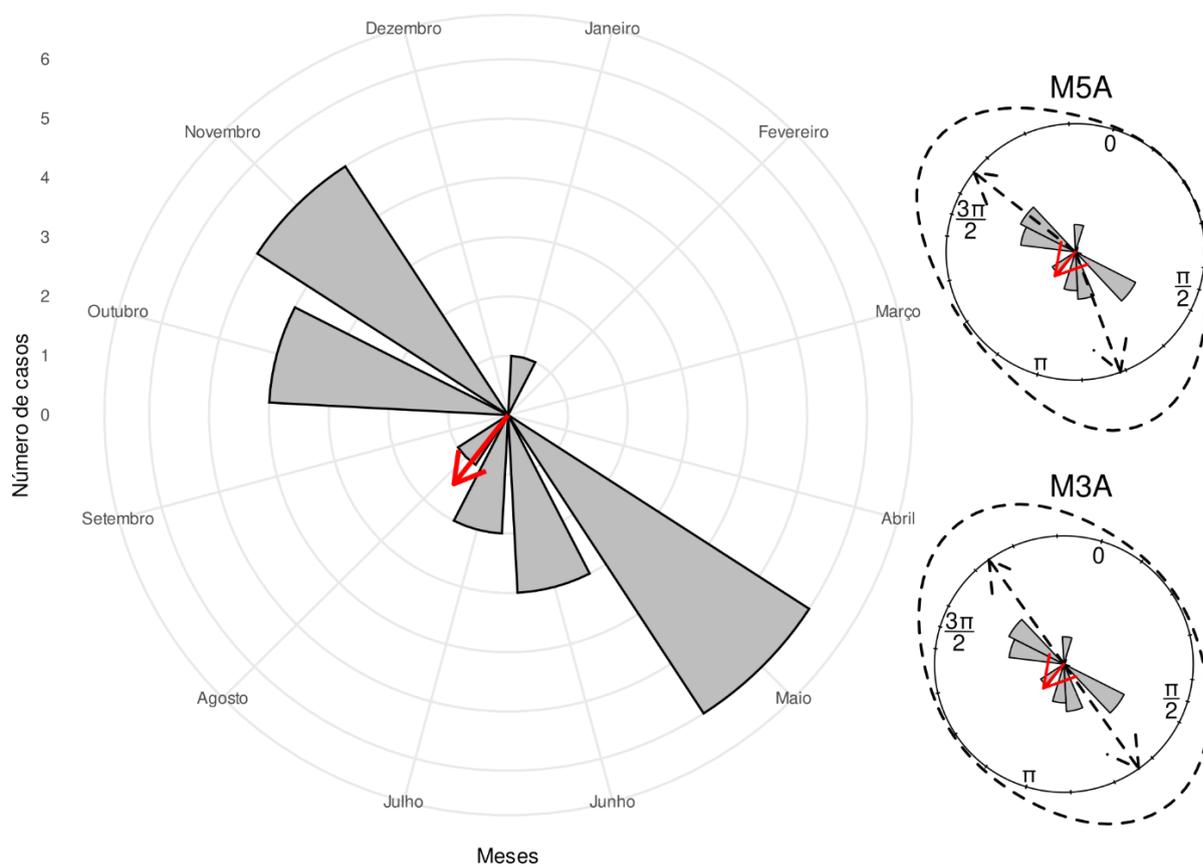
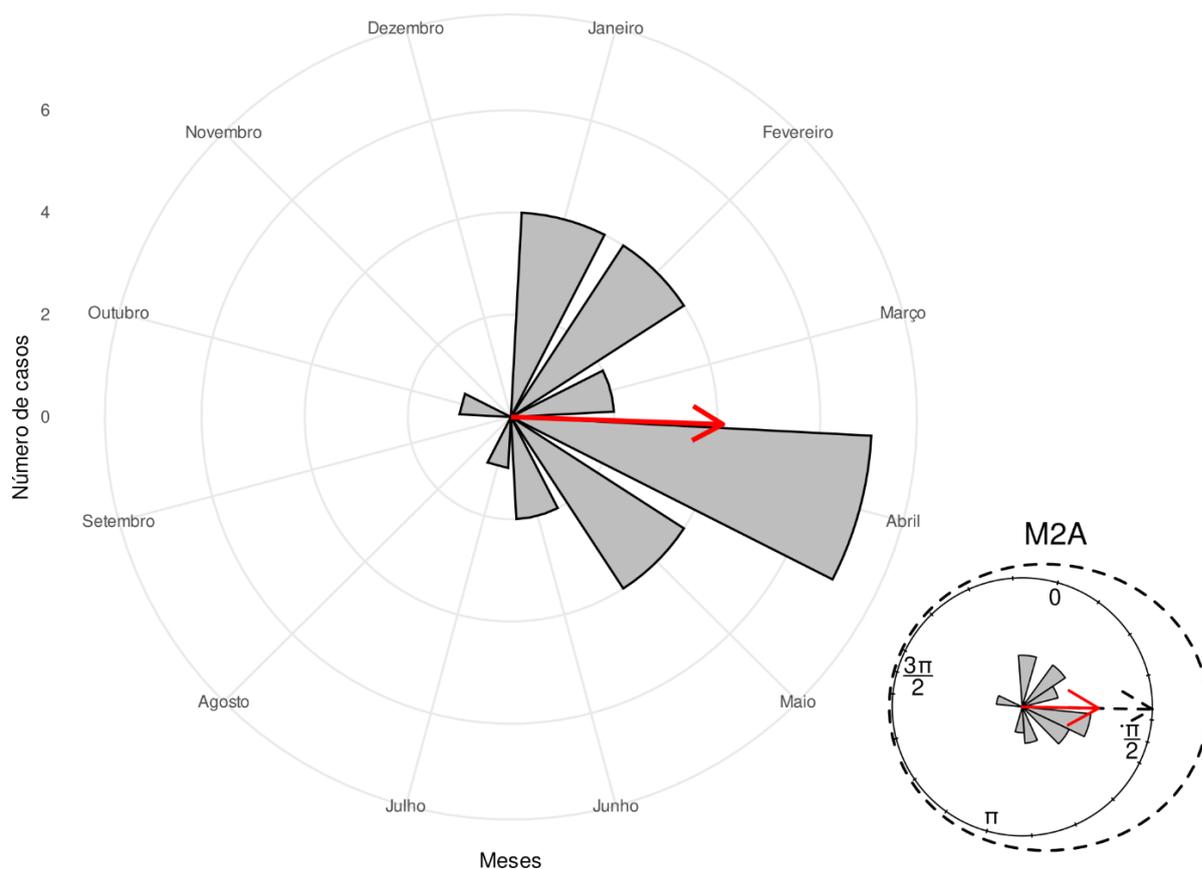


Figura 26 - Histogramas circulares de número de casos de B19 por mês para o ano de 2019. No histograma maior, os números indicam o número de casos no respectivo mês e o vetor médio (seta vermelha) o comprimento e a direção da data média de casos. Os histogramas menores representam os melhores modelos encontrados, com o vetor médio (seta vermelha), a densidade (linha tracejada) e a direção média (seta tracejada).



**Tabela 08.** Resultado para os dados do ano de 2017, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc.ER = razão entre AICc  $w_i$  do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s).

Modelo	$\phi_1$	$k_1$	$\lambda$	$\phi_2$	$k_2$	AICc	$\Delta$ AICc	AICc $w_i$	ER
M3A	4.40	3.18	0.50	7.54	3.18	59.11	0.00	0.38	-
M4A	4.39	3.20	0.65	7.53	3.20	60.68	1.58	0.17	2.20
M2C	4.66	49.99	0.25	-	0.00	61.27	2.17	0.13	2.96
M2B	4.50	5.80	0.50	-	0.00	61.60	2.50	0.11	3.49
M3B	4.45	4.05	0.50	7.59	1.64	61.81	2.70	0.10	3.86
M1	-	0.00	1.00	-	0.00	62.49	3.38	0.07	5.43
M4B	1.25	3.02	0.36	4.39	3.29	64.16	5.06	0.03	12.53
M2A	4.25	0.51	1.00	-	0.00	65.23	6.13	0.02	21.40
M5B	4.36	3.31	0.64	1.31	3.02	68.20	9.10	0.00	94.38
M5A	3.45	5.00	0.41	2.66	5.00	2000000011.33	1999999952.23	0.00	-

**Tabela 09.** Resultado para os dados do ano de 2018, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc.ER = razão entre AICc  $w_i$  do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s).

<b>Modelo</b>	$\phi_1$	$k_1$	$\lambda$	$\phi_2$	$k_2$	<b>AICc</b>	$\Delta$ <b>AICc</b>	<b>AICc</b> $w_i$	<b>ER</b>
M5A	5.08	4.62	0.47	2.49	4.62	71.17	0.00	0.38	-
M3A	5.37	3.63	0.50	8.51	3.63	71.44	0.27	0.33	1.15
M4A	2.23	3.64	0.54	5.37	3.64	74.04	2.87	0.09	4.20
M3B	2.26	4.48	0.50	5.40	2.84	74.05	2.88	0.09	4.22
M5B	2.49	4.49	0.54	5.09	4.82	74.56	3.39	0.07	5.45
M4B	2.25	4.10	0.53	5.39	3.15	77.03	5.86	0.02	18.73
M2C	2.12	30.86	0.25	-	0.00	79.63	8.46	0.01	68.53
M2B	2.26	16.46	0.50	-	0.00	80.36	9.19	0.00	98.94
M1	-	0.00	1.00	-	0.00	80.87	9.70	0.00	127.51
M2A	3.55	0.51	1.00	-	0.00	82.80	11.63	0.00	335.68

**Tabela 10.** Resultado para os dados do ano de 2019, com a comparação para todos os 10 modelos de orientação, classificados com base no AICc.ER = razão entre AICc  $w_i$  do melhor modelo com o(s) modelo(s) seguinte(s).

<b>Modelo</b>	$\phi_1$	$k_1$	$\lambda$	$\phi_2$	$k_2$	<b>AICc</b>	$\Delta$ <b>AICc</b>	<b>AICc</b> $w_i$	<b>ER</b>
M2A	1.31	1.46	1.00	-	0.00	77.34	0.00	0.72	-
M5A	0.33	2.58	0.37	1.82	2.58	81.43	4.09	0.09	7.73
M2C	1.33	2.15	0.75	-	0.00	81.65	4.32	0.08	8.66
M2B	1.39	2.36	0.50	-	0.00	82.11	4.78	0.07	10.89
M3B	4.62	0.00	0.50	7.76	2.24	84.84	7.51	0.02	42.64
M4B	4.40	0.00	0.27	7.54	2.30	85.00	7.67	0.02	46.20
M5B	6.28	2.53	0.49	1.71	3.82	88.08	10.74	0.00	215.33
M1	-	0.00	1.00	-	0.00	91.89	14.56	0.00	1450.15
M3A	1.52	0.98	0.50	4.66	0.98	95.82	18.48	0.00	10315.06
M4A	5.56	0.81	0.25	8.70	0.81	96.28	18.95	0.00	13008.91

Apesar de estudos sorológicos realizados no estado de Mato Grosso do Sul mostrarem níveis de anticorpos para os vírus MAYV e OROV em primatas não humanos, e de ter sido detectado anticorpos neutralizantes de WNV em cavalos saudáveis da região do Pantanal, sugerindo a possível circulação destes vírus nesta região, não foi possível a identificação direta dos vírus nas amostras analisadas neste estudo. A viremia do WNV é de curta duração em hospedeiros acidentais, diminuindo consideravelmente após o início dos sintomas (BARZON et al 2013), portanto a detecção torna-se cada vez mais difícil com o passar do tempo. Logo, o RNA WNV geralmente não é detectável no sangue de pacientes com infecção sintomática. O padrão ouro para o diagnóstico do OROV é o isolamento viral (PINHEIRO *et al.*, 1994). As amostras de sangue devem ser obtidas preferencialmente até o segundo dia dos sintomas, quando a viremia é mais elevada (SANTOS *et al.*, 2008), o que dificulta, após esse período, obter resultados positivos mesmo usando técnicas moleculares de alta sensibilidade.

Abaixo está representada a amplificação dos Controles Positivos (CP) para os alvos de MAYV (Sonda YAK), OROV (Sonda FAM) **Figura 27** e WNV (Sonda FAM) **Figura 28**.

Figura 27 - Amplificação dos CP de MAYV e OROV (reação duplex).

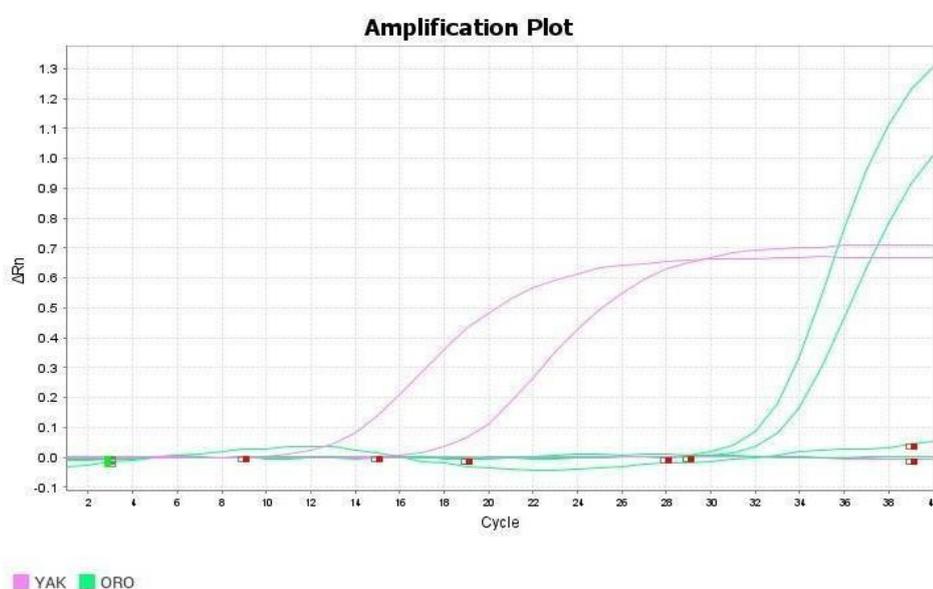
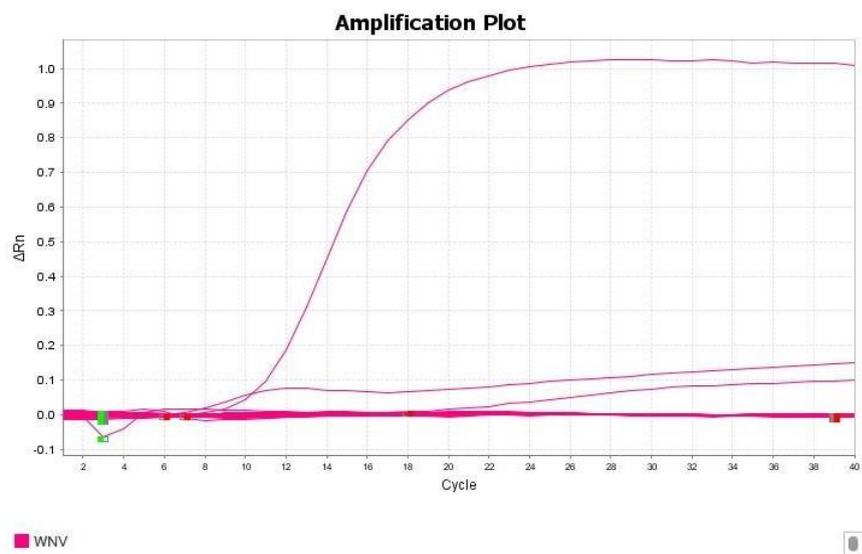


Figura 28 - Amplificação dos CP de WNV.



## 7 DISCUSSÃO

Uma grande variedade de vírus possui a capacidade de causar exantemas e dores articulares, em crianças, adolescentes e adultos, levando a identificação etiológica exclusivamente por meio do exame clínico, o que torna uma tarefa desafiadora. Os agentes mais comuns de doença exantemática (DE) incluem o vírus do Sarampo, Rubéola, Dengue, Varicela, Citomegalovírus, Epstein Barr, Herpes Vírus Humano 6, Enterovírus, Eritrovírus (Parvovírus Humano B19), Chikungunya e Zika (MENDELSON *et al.*, 2006). Apesar dessas serem comuns no Brasil, existem diversas dificuldades em determinar um diagnóstico etiológico preciso.

Para compor o referencial bibliográfico desta pesquisa observou-se que os estudos são escassos sobre a circulação de arbovírus emergentes no estado de Mato Grosso do Sul, por meio da pesquisa direta do vírus pela metodologia de RT-qPCR e para a pesquisa de B19V não foi encontrado nenhum estudo realizado no estado. A falta de estudos específicos para outros vírus no estado de Mato Grosso do Sul de forma contínua pode estar contribuindo para o elevado número de casos que não são confirmados laboratorialmente, destacando a necessidade da ampliação do diagnóstico laboratorial para que seja realizado um monitoramento de outros arbovírus, além do dengue, zika e chikungunya e de vírus que tenham os mesmos sinais e sintomas, assim como o B19V.

O diagnóstico diferencial das doenças exantemáticas é de suma importância, não só para fins epidemiológicos, bem como para o controle e conduta de tratamento das infecções. Mesmo que a maioria delas tenha um curso benigno, para certos grupos etários, gestantes e imunocomprometidos, algumas infecções representam um risco importante, pois podem evoluir para casos graves, que poderão necessitar de internação hospitalar de emergência, onerando o serviço público de saúde (GARCIA; LEON, 2021).

Os resultados negativos de RT-qPCR encontrados no estudo sugerem que não houve viremia causada por MAYV, OROV ou WNV durante o período de coleta das amostras biológicas nos pacientes em vários municípios do estado de Mato Grosso do Sul. Mesmo utilizando protocolos de método muito sensível (NAVECA *et al.*, 2017; LANCIOTTI *et al.*, 2000), capaz de detectar um baixo número de cópias de RNA, as amostras analisadas foram negativas.

Apesar da ausência de evidências moleculares de MAYV, OROV e WNV nas amostras analisadas neste estudo, o Centro-Oeste tem se estabelecido como uma relevante área de circulação do MAYV e OROV com detecções em humanos durante epidemias de DENV e em vetores em períodos interepidêmicos (ZUCHI *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2015; SERRA *et*

*al.*, 2016) enfatizamos a importância da vigilância ativa na interface homem-animal para detectar a atividade de arbovírus negligenciados e emergentes no Brasil. É importante destacar a necessidade de diagnóstico diferencial para MAYV, OROV e WNV em humanos com quadro febril agudo suspeitos de infecções por arbovirus no Centro-Oeste do Brasil.

A infecção por Eritrovirus B19 afeta, exclusivamente humanos, de diversos grupos populacionais, com diferentes apresentações clínicas, de acordo com o perfil imunológico e hematológico desses indivíduos dessas populações (QIU; SODERLUND-VENERMO; YOUNG, 2017).

No presente estudo tivemos a identificação tardia de 82 amostras positivas para B19V que correspondem a 10,6% das amostras selecionadas. Os resultados deste estudo revelam a circulação do genótipo 1a do B19V em Mato Grosso do Sul e com isso, também enfatizam a importância do diagnóstico diferencial laboratorial usando técnicas moleculares em pacientes com febre e sintomatologia característica para que auxiliem o sistema de vigilância em saúde na melhoria do atendimento ao paciente.

O diagnóstico molecular da infecção pelo B19V não é comumente utilizado como diagnóstico diferencial. Neste estudo, a qPCR validou o protocolo para detecção do DNA de B19V, desenvolvido pelo Dr Naveca e sua equipe, da Ficoruz Amazonas, a fim de implantar um diagnóstico diferencial para B19V em pacientes suspeitos de infecção por arbovirus no estado de Mato Grosso do Sul. É importante salientar que o uso de método molecular sensível e específico é de suma importância para o esclarecimento do diagnóstico laboratorial em diferentes infecções viriais.

Entretanto, muitos casos permanecem sem etiologia definida. A infecção por Eritrovirus B19 (B19V) pode causar DE, e em alguns grupos de risco essas infecções podem se tornar persistentes (ou latentes) e podem exigir tratamento hospitalar. Na NOTA TÉCNICA CONJUNTA N° 04/2021 – DGVS /LACEN E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA foram disponibilizadas orientações sobre condutas e procedimentos frente a notificação compulsória (ficha de notificação em anexo) de casos suspeitos de infecção por ERITEMA INFECCIOSO (PARVOVÍRUS B19) conforme resolução N° 88/CIB/SES do ano de 2020.

A possibilidade de detecção e caracterização do B19V no estado de Mato Grosso do Sul permitiu sua classificação em um (G1a) dos três genótipos propostos por Servant (SERVANT *et al.*, 2002) bem como a realização de estudos filogenéticos e de evolução molecular com outros eritrovirus detectados em diferentes áreas geográficas, previamente cadastrados no banco de dados GenBank. O genótipo 1 é o mais prevalente no mundo e no Brasil e representa uma frequência de 87,9% a partir de poucos estudos de caracterização molecular (FREITAS *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2017).

Quanto às manifestações clínicas, foi observada frequência de febre em todos os casos, artralgia e mialgia em 75% e exantema em 50% dos casos de genótipo 1, sendo todas em adultos jovens (20 a 32 anos). Um estudo publicado em 2003 mostrou que cerca de 19% dos casos de doenças exantemáticas permanecem sem o diagnóstico confirmatório e entre esses casos a infecção pelo B19V é a maior causa (33%), demonstrando a necessidade da realização do diagnóstico laboratorial específico (ALONSO, 2003).

Os pacientes correspondentes a esta população do estudo não tiveram um diagnóstico confirmado laboratorialmente e desta forma não houve por parte da vigilância a execução de ações de controle, destacando a necessidade de investimento na implantação de metodologias que mantenham uma sensibilidade alta de detecção viral em áreas que apresentam situação de risco para o surgimento de patógenos emergentes e reemergentes. Conhecendo-se o agente que está acometendo a população, as condutas médicas e as ações de vigilância epidemiológica terão melhores direcionamentos.

No cenário, onde o Brasil vive ano após ano uma tríplice epidemia com Dengue, Zika e Chikungunya co-circulando, e pacientes apresentando manifestações clínicas semelhantes à infecção pelo B19V, um resultado negativo para essas arboviroses, poderia ser um indicativo para a inclusão do diagnóstico diferencial de B19V, o que não é rotineiramente realizado nos centros de saúde brasileiros. Investigações clínico-epidemiológicas conduzidas na região Norte, no ano de 1993, demonstraram já naquela época, que o B19V se configura como um problema emergente de saúde pública (FREITAS; MIRANDA; SHIRLEY; TUDOR *et al.*, 1993). Nossos dados destacam a importância da infecção pelo B19V ser considerada no diagnóstico diferencial em diferentes grupos populacionais.

No ano de 2020 foi pactuado em reunião conjunta entre Secretaria de Estado de Saúde de Mato Grosso do Sul (SES) e LACEN que os casos suspeitos de Eritema Infeccioso (B19V) deveriam ser notificados, porém apenas a partir de 2021 que alguns casos foram inseridos no SINAN (Sistema de informação de agravos de Notificação). Os últimos dados coletados no SINAN foi no dia 25 de novembro de 2022 onde apenas 8 municípios haviam notificado (Angélica, Aquidauana, Campo Grande, Fátima do Sul, Miranda, Ribas do Rio Pardo, Sidrolândia e Três Lagoas), totalizando 17 notificações, sendo 10 somente no município de Campo Grande.

A informação é instrumento essencial para a tomada de decisões. Aquilo que não é investigado, não é conhecido e se não é conhecido não é passível de ação. Dessa forma, a informação oportuna, representa imprescindível ferramenta à vigilância epidemiológica, por desencadear o processo **“informação-decisão-ação”**, tríade que sintetiza a dinâmica de suas atividades que, como se sabe, devem ser iniciadas a partir da informação de um indício ou suspeita de caso de alguma doença ou agravo. Mediante esta definição é que se questiona como a vigilância do estado pode planejar ações de controle que se tornem eficazes se está havendo um número significativo de diagnósticos laboratoriais que não estão sendo detectados pelas técnicas disponíveis na rede credenciada e se os profissionais de saúde não estão sensibilizados com a ocorrência desses vírus em seus municípios. O que traz o enorme desafio para a vigilância epidemiológica em reconhecer precocemente as novas áreas com transmissão para minimizar o impacto dessas doenças na população.

## 8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir:

A importância da inclusão de B19V no diagnóstico laboratorial diferencial em pacientes com doença febril aguda, não apenas para fins epidemiológicos, mas também para o manejo adequado do paciente.

Embora somente 10 amostras de gestantes tenham sido PCR positivas, não é possível descartar a possibilidade de outros casos de B19V, considerando o grande número de amostras que não puderam ser analisadas em decorrência da restrição de insumos e da inelegibilidade de muitas amostras.

A análise dos sequenciamentos obtidos apresentou 100% de identidade com as sequências correspondentes dos genomas de eritrovírus B19 humano genótipo 1a, disponíveis no GenBank, confirmando a importância deste agente etiológico com a causa de gestação no estado do Mato Grosso do Sul.

Conhecer a incidência desses vírus emergentes e reemergentes na população brasileira, para adoção de políticas públicas eficazes de prevenção e controle, assim como alertar para a necessidade de mais estudos científicos e pesquisas em relação à ocorrência desses vírus e suas consequências tanto a nível individual quanto no âmbito coletivo.

Observar e descrever a ocorrência das doenças com o uso de dados que alimentam as análises estatísticas possibilitando tornar visível o problema e assim, buscar as soluções. É o “conhecer” que desencadeia a “ação”.

É preciso produzir instrumentos para ampliar a capacidade preventiva. Dessa forma, faz-se necessário o fortalecimento e a integração das vigilâncias entomológica, epidemiológica e laboratorial, a fim de direcionarmos métodos de controle e prevenção contra essas doenças no País.

Baseado nos resultados deste estudo é importante que o diagnóstico diferencial seja implementado nos casos das doenças exantemáticas, para que outros agravos possam ser melhor investigados, norteados permanentemente o sistema de vigilância e apoiando devidamente a rede de atenção à Saúde.

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Implementar o diagnóstico diferencial por B19V nos casos de pacientes com sintomatologia características, gestantes, casos graves e óbitos.

Publicar em revista científica indexada os resultados levantados nesta dissertação, sendo um artigo com os dados gerais, na fase de redação e, outro com os resultados de B19V, na fase de submissão.

Estudos adicionais: pretendemos continuar o monitoramento da ocorrência de outros vírus no estado de Mato Grosso do Sul mediante pesquisa de outros painéis virais e metagenômica nas amostras que continuaram negativas para todos os vírus pesquisados neste estudo.

## 10 REFERÊNCIAS

- ABERHAM, Claudia et al. A quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. **Journal of virological methods**, v. 92, n. 2, p. 183-191, 2001.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y.; MONSALVE, D. M.; RODRÍGUEZ, Y.; *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>, 26Sep 2018.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients experiencing Primary or Secondary Infections. *J Clin Microbiol*, 40(2):376-81, 2002.
- ALONSO, Vega et al. Incidence and clinical characteristics of maculopapular exanthemas of viral aetiology. **Atencion Primaria**, v. 32, n. 9, p. 517-523, 2003.
- ALLANDER, T.; TAMMI, M. T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. 2005-9-6 2005.
- ALMEIDA, A.; CODEÇO, C.; LUZ, P. M. Seasonal dynamics of influenza in Brazil: the latitude effect. **BMC Infectious Diseases**, 18, n. 1, p. 1-9, 2018-12-27 2018.
- ANDERSON, Charles R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 4, p. 574-8, 1961.
- BARENFANGER, J.; DRAKE, C.; LAWHORN, J.; O'BRIEN, J. *et al.* Clinical impact of timely reporting of IgM for West Nile Virus. **J Clin Virol**, 34, n. 2, p. 122-124, Oct 2005.
- BARZON, L.; DEPARTMENT OF MOLECULAR MEDICINE, U. O. P.; REGIONAL REFERENCE LABORATORY FOR INFECTIOUS DISEASES, M. A. V. U., PADOVA UNIVERSITY HOSPITAL, PADOVA, ITALY; *et al.* Excretion of West Nile Virus in Urine During Acute Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 208, n. 7, p. 1086-92, 2013.
- BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.; WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. <https://www.jstatsoft.org/index.php/iss>, 2015-10-06 2015.
- BATISTA, Paulo Mira et al. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 168-173, 2012.
- BERNSTEIN, David I. et al. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. **Vaccine**, v. 29, n. 43, p. 7357-7363, 2011.
- BIEDENBENDER, R.; THE GLENNAN CENTER FOR GERIATRICS AND GERONTOLOGY, E. V. M. S., NORFOLK; BEVILACQUA, J.; SANOFI PASTEUR, T.,

ONTARIO, CANADA *et al.* Phase II, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study to Investigate the Immunogenicity and Safety of a West Nile Virus Vaccine in Healthy Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, 203, n. 1, p. 75-84, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Febre do Nilo Ocidental. Gov.br, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-do-nilo-ocidental>. Acesso em: 13/02/22.

BRASIL. Ministério da Saúde. NOTA TÉCNICA Nº 427/2021 CGLAB/DAEVS/SVS/MS.

BONVICINI, Francesca; BUA, Gloria; GALLINELLA, Giorgio. Parvovirus B19 infection in pregnancy—awareness and opportunities. **Current Opinion in Virology**, v. 27, p. 8- 14, 2017.

BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R.; HUYVAERT, K. P. AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology: some background, observations, and comparisons. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 65, n. 1, p. 23-35, 2010.

CABRAL-CASTRO, Mauro Jorge *et al.* Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108-111, 2016.

CANDOTTI, D.; ETIZ, N.; PARSYAN, A.; ALLAIN, J.-P. Identification and Characterization of Persistent Human Erythrovirus Infection in Blood Donor Samples. 2004.

CAMPBELL, Grant L. *et al.* West nile virus. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 9, p. 519-529, 2002.

CARDOSO, B. F.; GROSSO, U. F. D. M.; SERRA, O. P.; GROSSO, U. F. D. M. *et al.* Detection of Oropouche virus segment S in patients and in. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, p. 745-754, 2015.

CARLSEN. Human Parvovirus B19 Erythrovirus - Carlsen - 2006 - **APMIS** - Wiley Online Library. 2006.

CASSEB, Alexandre do Rosário *et al.* Alphavirus serosurvey in domestic herbivores in Pará State, Brazilian Amazon. 2012.

CASSEB, Alexandre do Rosário *et al.* Prevalence of antibodies to equine alphaviruses in the State of Pará, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

CAUSEY, Ottis R.; MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human disease agent III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent (Publicado originalmente em 1957). 2002.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. West Nile Virus. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/westnile/index.htm>

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. FLAVIVIRUS GENOME ORGANIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>, 2003-11-28 2003.

CHANCEY, C. **The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus**. 2015.

CONTEVILLE, Liliane Costa et al. Parvovirus B19 1A complete genome from a fatal case in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 820-821, 2015.

COSTA, E. A.; GIOVANETTI, M.; CATENACCI, L. S.; FONSECA, V. *et al.* West Nile virus detection in horses in three Brazilian states. 2021-01-09 2021.

COSSART, Y. E. et al. Parvovirus-like particles in human sera. **The Lancet**, v. 305, n. 7898, p. 72-73, 1975.

COTMORE, S. F.; AGBANDJE-MCKENNA, M.; CANUTI, M.; CHIORINI, J. A. *et al.* **ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae**. 2019/01/23 2019.

CUBEL, R. C. N.; CRUZ, F. O.; SIQUEIRA, M. M.; SANTOS, E. O. *et al.* Human parvovirus B19 infections among exanthematic diseases notified as measles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30, p. 15-20, 1997.

GARCIA, Rita de Cássia Nasser Cubel et al. Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 102-106, 2017.

DA ROSA, Jorge Fernando Travassos et al. Oropouche virus: clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected Orthobunyavirus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1019, 2017.

DE CURCIO, Juliana Santana et al. Detection of Mayaro virus in *Aedes aegypti* mosquitoes circulating in Goiania-Goiias-Brazil. **Microbes and Infection**, v. 24, n. 4, p. 104948, 2022.

DE MIRANDA, Mário FR; LINHARES, Alexandre da Costa; SHIRLEY, J. A. Fifth disease in children living in Belém, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, p. 359-362, 1989.

DENISE F. POLIT, C. T. B. **Nursing Research - Google Books**. 2004. Disponível em: [https://www.google.com.br/books/edition/Nursing\\_Research/5g6VttYWnjUC?hl=pt-BR&gbpv=1&dq=Nursing+Research:+Principles+and+Methods+Por+Denise+F.+Polit,+Cheryl+Tatano+Beck&printsec=frontcover](https://www.google.com.br/books/edition/Nursing_Research/5g6VttYWnjUC?hl=pt-BR&gbpv=1&dq=Nursing+Research:+Principles+and+Methods+Por+Denise+F.+Polit,+Cheryl+Tatano+Beck&printsec=frontcover)

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, 51, 2017.

DURIGON, Edison L. et al. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. **Journal of virological methods**, v. 44, n. 2-3, p. 155-165, 1993.

ECDC – EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Factsheet about West Nile virus infection. 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nilefever/facts>

ESPOSITO, Danillo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 540-544, 2017.

FREITAS, Ronaldo B. et al. Molecular characterization of human erythrovirus B19 strains obtained from patients with several clinical presentations in the Amazon region of Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 60-65, 2008.

FALL, G. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus | **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 2017.

FITAK, Robert R.; JOHNSEN, Sönke. Bringing the analysis of animal orientation data full circle: model-based approaches with maximum likelihood. **Journal of experimental biology**, v. 220, n. 21, p. 3878-3882, 2017.

FREITAS, R. B. D.; MIRANDA, M. F. R. D.; SHIRLEY, J.; TUDOR, R. *et al.* Parvovirus B19 antibodies in sera of patients with unexplained exanthemata from Belém, Pará, Brazil. 1993.

GALLINELLA, G. Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases - Gallinella - 2003 - **Journal of Medical Virology** - Wiley Online Library. 2003.

GARCIA, R.; LEON, L. A. Human parvovirus B19: a review of clinical and epidemiological aspects in Brazil. **Future Microbiol**, 16, n. 1, p. 37-50, 2021.

GARCIA, S. O.; PAULO, U. D. S.; PEREIRA, J.; PAULO, U. D. S. *et al.* Doenças hematológicas associadas ao eritrovírus. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 31, p. 285-290, 2009.

GARCIA, Rita de Cássia Nasser Cubel et al. Molecular diversity of human parvovirus B19 during two outbreaks of erythema infectiosum in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, p. 102-106, 2017.

GOULD, Ernest A.; HIGGS, Stephen. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 109-121, 2009.

GOULD, Ernest et al. Emerging arboviruses: why today? **One health**, v. 4, p. 1-13, 2017.

GREGIANINI, T. Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil: Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016. 2017.

GUBLER, D. J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21st

Century. **Tropical Medicine and Health**, 39, n. 4SUPPLEMENT, p. S3-S11, 2011.

HANG, Jun et al. Random amplification and pyrosequencing for identification of novel viral genome sequences. **Journal of Biomolecular Techniques: JBT**, v. 23, n. 1, p. 4, 2012.

HARTING. CRAN - Package DHARMa. 2022.

HAYES, Edward B. et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1174, 2005.

HEEGAARD, Erik D.; BROWN, Kevin E. Human parvovirus B19. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 3, p. 485-505, 2002.

HICKS, K. E.; CUBEL, R. C. N.; COHEN, B. J.; CLEWLEY, J. P. Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. **Archives of Virology**, 141, n. 7, p. 1319-1327, 1996.

HUATUCO, E. M. M.; DURIGON, E. L.; LEBRUN, F. L. A. S.; PASSOS, S. D. *et al.* Seroprevalence of human parvovirus B19 in a suburban population in São Paulo, Brazil. <https://www.revistas.usp.br/rsp>, 2012-07-08 2012. Original Articles.

HUGHES, Holly R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Peribunyaviridae. **The Journal of general virology**, v. 101, n. 1, p. 1, 2020.

JONES, M. S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V. V.; SIMMONDS, P. *et al.* New DNA Viruses Identified in Patients with Acute Viral Infection Syndrome. 2005-7-1 2005.

KILPATRICK, A. Marm; RANDOLPH, Sarah E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1946-1955, 2012.

KOPPELMAN, M. Parvovirus B19 genotypes 1 and 2 detection with real-time polymerase chain reaction assays - Koppelman - 2007 - Vox Sanguinis - Wiley Online Library. 2007.

KOMAR, Nicholas et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 3, p. 311, 2003.

KOURÍ, MG Guzman G. Dengue diagnosis, advances and challenges Int. **J. Infect. Dis**, v. 8, p. 69-80, 2004.

KREUDER JOHNSON, C.; HITCHENS, P. L.; SMILEY EVANS, T.; GOLDSTEIN, T. *et al.* Spillover and pandemic properties of zoonotic viruses with high host plasticity. **Scientific Reports**, 5, n. 1, p. 1-8, 2015.

LANCIOTTI, Robert S. et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **J Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066-71, 2000.

LANDLER, Lukas; RUXTON, Graeme D.; MALKEMPER, E. Pascal. The Hermans–Rasson test as a powerful alternative to the Rayleigh test for circular statistics in biology. **BMC ecology**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.

LANDLER, L.; INSTITUTE OF ZOOLOGY, D. O. I. B. A. B. R., UNIVERSITY OF NATURAL RESOURCES AND LIFE SCIENCES VIENNA, GREGOR-MENDEL-STRASSE 33, A-1180 VIENNA, AUSTRIA; RESEARCH INSTITUTE OF MOLECULAR PATHOLOGY (IMP), V. B. V., CAMPUS-VIENNA-BIOCENTER VIENNA, AUSTRIA; RUXTON, G. D. *et al.* Model selection versus traditional hypothesis testing in circular statistics: a simulation study. **Biology Open**, 9, n. 6, 2022.

LEFKOWITZ, E. J.; DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, U. O. A. A. B., BIRMINGHAM, AL, USA; DEMPSEY, D. M.; DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, U. O. A. A. B., BIRMINGHAM, AL, USA *et al.* Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic Acids Research**, 46, n. D1, 2017.

LONG, Kanya C. *et al.* Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750, 2011.

LONG, J. A. CRAN - Package tools. 2022.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características generales y epidemiología de los arbovirus emergentes en Brasil. <https://ojs.iec.gov.br/index.php/rpas>, 2020-03-23 2014.

LUNA, E. J. A.; PAULO, S. C. D. M. D. S. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 5, p. 229-243, 2002.

LUNA, L. Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients - de Souza Luna - 2017 - Journal of Medical Virology - Wiley Online Library. 2016.

MACKAY, Ian M.; ARDEN, Katherine E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and infection**, v. 18, n. 12, p. 724-734, 2016.

MAPLE, P. A. C.; HEDMAN, L.; DHANILALL, P.; KANTOLA, K. *et al.* Identification of Past and Recent Parvovirus B19 Infection in Immunocompetent Individuals by Quantitative PCR and Enzyme Immunoassays: a Dual-Laboratory Study. 2014.

MARTINS, L. C.; CHAGAS, I. E.; SILVA, E. V. P. D.; CHAGAS, I. E. *et al.* First isolation of West Nile virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 114, 2019.

MIYAMOTO, K. *et al.* Outbreak of human parvovirus B19 in hospital workers. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, n. 3, p. 238-241, 2000.

MENDELSON, Ella *et al.* Laboratory assessment and diagnosis of congenital viral infections: Rubella, cytomegalovirus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), herpes simplex virus (HSV), parvovirus B19 and human immunodeficiency virus (HIV).

**Reproductive toxicology**, v. 21, n. 4, p. 350-382, 2006.

MENDONÇA, Marcos César Lima de et al. Genotyping of human parvovirus B19 in clinical samples from Brazil and Paraguay using heteroduplex mobility assay, single-stranded conformation polymorphism and nucleotide sequencing. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 502-504, 2011.

MESSIAS, M. C. Vivendo com os insetos. 2011 2011.

MOTA, M. T. D. O.; RIBEIRO, M. R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M. L. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.15.76>, 2015-09-08, 2015.

MOURÃO, M. P. G.; DOURADO, F. D. M. T. D. H. V.; BASTOS, M. D. S.; *et al.* Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 48, p. 20-26, 2015.

MULLER, David A.; YOUNG, Paul R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.

MURAKI, Y.; FUJITA, T.; MATSUURA, M.; FUKU, I. *et al.* The efficacy of inactivated West Nile vaccine (WN-VAX) in mice and monkeys. **Virology Journal**, 12, n. 1, p. 1-6, 2015-04-09, 2015.

MURRAY, Catherine L.; JONES, Christopher T.; RICE, Charles M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 6, n. 9, p. 699-708, 2008.

MURRAY, Kristy et al. Persistent infection with West Nile virus years after initial infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 1, p. 2-4, 2010.

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

NGUYEN, Quang Tri et al. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. **Virology**, v. 301, n. 2, p. 374-380, 2002.

NORJA, Päivi et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 19, p. 7450-7453, 2006.

NUNES, Márcio Roberto Teixeira et al. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1610, 2005.

OJEDA, V.; INIBIOMA (UNCOMA- CONICET), B., RÍO NEGRO, ARGENTINA; SCHAFF, A.; INECO (UNJUJUY-CONICET), J., ARGENTINA *et al.* Latitude does

not influence cavity entrance orientation of South American avian excavators. **Ornithology**, 138, n. 1, 2022.

OLIVEIRA, M. I. D.; AFONSO, A. M. S.; CURTI, S. P.; SILVA, P. E. *et al.* Genotype 1 of human parvovirus B19 in clinical cases. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 63, p. 224-228, 2017.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; CRUZ, I. O.; VARELLA, R. B.; JANEIRO, U. F. D. R. D. Aspectos epidemiológicos da Febre do Oeste do Nilo. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 11, p. 463-472, 2008.

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

PAUVOLID-CORRÊA, Alex *et al.* Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 125-133, 2015.

PAUVOLID-CORRÊA, Alex *et al.* Neutralizing antibodies for orthobunyaviruses in Pantanal, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006014, 2017.

PENKERT, Rhiannon R. *et al.* Saccharomyces cerevisiae-derived virus-like particle parvovirus B19 vaccine elicits binding and neutralizing antibodies in a mouse model for sickle cell disease. **Vaccine**, v. 35, n. 29, p. 3615-3620, 2017.

PEREIRA, Thiago Nunes *et al.* Wolbachia significantly impacts the vector competence of Aedes aegypti for Mayaro virus. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; VASCONCELOS, P. Arboviral zoonoses of Central and South America. **Handbook of Zoonoses: viral**, v. 210, p. 212, 1994.

PORTET, Stéphanie. A primer on model selection using the Akaike Information Criterion. **Infectious Disease Modelling**, v. 5, p. 111-128, 2020.

QIU, Jianming; SÖDERLUND-VENERMO, Maria; YOUNG, Neal S. Human parvoviruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 43-113, 2017.

RAMÍREZ, Ana L. *et al.* Searching for the proverbial needle in a haystack: advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2018.

RIZZOLI, A. *et al.* The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 20, 2015.

RODENHUIS-ZYBERT, Izabela A.; WILSCHUT, Jan; SMIT, Jolanda M. Partial maturation: an immune-evasion strategy of dengue virus? **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 248-254, 2011.

SAEED, Mohammad F. *et al.* Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. **Virus research**, v. 77, n. 1, p. 25-30, 2001.

SANABANI, S.; NETO, W. K.; PEREIRA, J.; SABINO, E. C. Sequence Variability of Human Erythroviruses Present in Bone Marrow of Brazilian Patients with Various Parvovirus B19-Related Hematological Symptoms. 2006-February 2006.

SANTOS, Rodrigo IM et al. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus research**, v. 138, n. 1-2, p. 139-143, 2008.

SCHNUTE, J. Statistical analysis of animal orientation data. 1992.

SCHORLING, Stefan et al. Quantification of parvovirus B19 DNA using COBAS AmpliPrep automated sample preparation and LightCycler real-time PCR. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 1, p. 37-41, 2004.

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

SERVANT, A.; LAPERCHE, S.; LALLEMAND, F.; MARINHO, V. R. *et al.* Genetic Diversity within Human Erythroviruses: Identification of Three Genotypes. 2002-9-15 2002.

SERVANT-DELMAS, A.; MORINET, F. Update of the human parvovirus B19 biology. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 23, n. 1, p. 5-12, 2016.

SKJOLDEBRAND-SPARRE. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death - Skjöldebrand-Sparre - 2000 - **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology** - Wiley Online Library. 2005.

SLAVOV, Svetoslav Nanev et al. Molecular and phylogenetic analyses of human Parvovirus B19 isolated from Brazilian patients with sickle cell disease and  $\beta$ -thalassemia major and healthy blood donors. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 10, p. 1652-1665, 2012.

SLAVOV, S. Frequent human parvovirus B19 DNA occurrence and high seroprevalence in haemophilic patients from a non-metropolitan blood centre, Brazil - Slavov - 2014 - **Transfusion Medicine** - Wiley Online Library. 2014.

TEAM, R. C. **R: The R Project for Statistical Computing**. 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

TERZIAN, A. Sporadic Oropouche Infection, Acre, Brazil - Volume 15, Number 2—February 2009 - **Emerging Infectious Diseases journal** - CDC. December 08, 2010, 2010.

TESH, R. B.; FROM THE DEPARTMENT OF PATHOLOGY, C. F. T. D., UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH, GALVESTON, TEXAS, THE DIVISION OF VECTOR-BORNE INFECTIOUS DISEASES, NATIONAL CENTER FOR INFECTIOUS DISEASES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, PUBLIC HEALTH SERVICE, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FORT COLLINS, COLORADO, THE PARMA COMMUNITY GENERAL HOSPITAL, PARMA, OHIO, AND THE U. S. NAVAL MEDICAL RESEARCH INSTITUTE, BETHESDA, AND THE U.S. ARMY MEDICAL RESEARCH INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES, FREDERICK, MARYLAND, USA; AND THE INSTITUTO

NACIONAL DE SALUD, H. N. A. T. U. S. N. M. R. I. D., LIMA, AND THE MINISTEREO DE SALUD, IQUITOS, PERU; WATTS, D. M. *et al.* Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, 28, n. 1, p. 67-73, 1999.

THEILACKER, Christian *et al.* Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-4, 2013.

UEDA, E. Elsevier Enhanced Reader. 2021.

VASCONCELOS, Helena B. *et al.* Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, 2009.

VASCONCELOS, Helena Baldez *et al.* Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 800, 2011.

VALERA, Elvis T. *et al.* Transient pancytopenia induced by parvovirus B19 in a child with hereditary spherocytosis. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 4, p. 323-326, 2000.

VIEIRA, Carla Julia da Silva Pessoa *et al.* Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta tropica**, v. 147, p. 12-16, 2015.

VIEIRA, Marcelo ACS *et al.* Case report: West Nile Virus encephalitis: The first human case recorded in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 377, 2015.

WALDMAN, E. A. Doenças infecciosas emergentes e reemergentes. <https://www.revistas.usp.br/revusp>, 2015-03-30 2015.

WEIDMANN, M.; RUDAZ, V.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Rapid Detection of Human Pathogenic Orthobunyaviruses. 2003-7 2003.

WONG, Susan J. *et al.* A multiplex microsphere immunoassay for Zika virus diagnosis. **EBioMedicine**, v. 16, p. 136-140, 2017.

YE, C.; AM, F.; B, C.; D, W. Parvovirus-like particles in human sera. **Lancet (London, England)**, 1, n. 7898, 01/11/1975 1975.

YOTO, Yuko; QIU, Jianming; PINTEL, David J. Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. **Journal of virology**, v. 80, n. 3, p. 1604-1609, 2006.

YOUNG, N. S. *et al.* Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. **The Journal of clinical investigation**, v. 73, n. 1, p. 224-230, 1984.

YOUNG, N. S.; BROWN, K. E. Parvovirus B19. <https://doi.org/10.1056/NEJMra030840>, 2004-02-05 2004.

ZHANG, Hao *et al.* NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue

infection: a meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 57-66, 2014.

ZUCHI, Nayara et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 820-823, 2014.

## 11 ANEXOS

### ANEXO A - NOTA TÉCNICA ERITEMA INFECCIOSO



Campo Grande, 03 de agosto de 2021

#### NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 04/2021 – DGVS /LACEN E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

**Assunto:** Orientações sobre condutas e procedimentos frente notificação compulsória de casos suspeitos de infecção por ERITEMA INFECCIOSO (PARVOVÍRUS B19) conforme resolução Nº 88/CIB/SES do ano de 2020;

#### 1 - Definição de caso para fins de vigilância epidemiológica – sinais e sintomas.

- Todo indivíduo que apresente uma combinação de sinais e sintomas como exantema (céfalo caudal), febre, cefaléia, artralgia e mialgia.
- A frequência de exantema é mais comum em indivíduos menores de quinze anos.
- O eritema infeccioso também conhecido por parvovirose e outros nomes, sendo os mais comuns, quinta moléstia ou síndrome da face esbofetada.

#### 2 – Agente Etiológico

- O Eritema Infeccioso, geralmente responsável por infecções na infância, causado pelo parvovírus humano B19, este vírus apresenta uma distribuição mundial e é o único membro da família *Parvoviridae* normalmente conhecido por ser patogênico no homem.

#### 3 – Período de incubação

- O período de incubação da doença é de geralmente 4 a 14 dias, mas pode estender-se por um período de 28 dias.

#### 4 – Período de Transmissão



- Transmitido por secreções das vias respiratórias, através de gotículas de saliva, do beijo, de mãos contaminadas, de copos e talheres contaminados, da roupa de cama, etc.
- Observações clínicas e laboratoriais indicam que o vírus se propaga com relativa facilidade entre crianças que integram comunidades fechadas como creches e escolas ou entre os contatos no âmbito domiciliar por exemplo.
- O período de transmissão vai de 7 dias antes da erupção até o primeiro dia do exantema em indivíduos normais. No entanto, pacientes com crise aplástica tomam-se potencialmente contagiosos por uma semana ou mais após o surgimento do exantema.

## 5 – Diagnóstico Laboratorial

5.1 - Realizar sorologia para parvovírus B19.

5.2 – Diagnóstico diferencial:

Considerando que vários agentes virais como rubéola, sarampo, parvovírus B19 e arboviroses são responsáveis pela ocorrência de doenças exantemáticas e artropatias. Sendo assim, é recomendável o diagnóstico diferencial das doenças exantemáticas, o que proporcionou a descrição dos primeiros casos de parvovírus B19. Para tal, tais exames devem ser solicitados pelo médico, cadastrados no GAL e realizado envio de amostra suficiente.

## 6 – Vigilância Epidemiológica: conduta frente ao caso

6.1 – Prevenção – recomendações para evitar contágio:

- Lavar as mãos frequentemente;
- Usar lenços, toalhas e fronhas dos travesseiros individuais.
- Não compartilhar objetos de uso pessoal, como copos e talheres;
- Isolamento social conforme orientação médica;
- Evitar contato com brinquedos ou objetos que possam ter sido contaminados, realizar a higienização dos mesmos.
- Medidas básicas de higiene em superfícies, reduz a transmissão.

## 7 - Notificação/ Investigação



Notificação dos casos de Parvovirus B19, preenchimento e digitação da Ficha de notificação individual (descrever os sinais e sintomas na área de observação). Em caso de surto também preencher a ficha de Surto do Sinan/Net;

#### BIBLIOGRAFIA

Acesso dia 14/12/2020, disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822005000500006&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822005000500006&script=sci_arttext&tlng=pt)>

Acesso dia 14/12/2020, disponível em: <<https://patua.iec.gov.br/bitstream/handle/iec/2622/Parvov%C3%ADrus%20B19%2C%20eritema%20infeccioso%20e%20outras%20manifesta%C3%A7%C3%B5es%20cl%C3%ADnicas.pdf?sequence=1&isAllowed=Y>>

Acesso dia 14/12/2020, disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/rbc/n\\_50/v03/pdf/REVISAO1.pdf](http://www1.inca.gov.br/rbc/n_50/v03/pdf/REVISAO1.pdf)>

Acesso dia 14/12/2020, disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/79766/1/Abordagem%20em%20Medicina%20Geral%20e%20Familiar%20dos%20Exantemas%20V%C3%ADricos.pdf>>

## ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA  
DOM BOSCO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Pesquisa de patógenos de interesse em saúde pública em amostras com diagnóstico negativo para Dengue, Zika e Chikungunya

**Pesquisador:** Cristiano Marcelo Espinola Carvalho

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 54019821.2.0000.5162

**Instituição Proponente:** Universidade Católica Dom Bosco

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.156.703

#### Apresentação do Projeto:

As informações referentes aos tópicos 'Informações do Projeto' foram extraídas do documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1859452.pdf", postado pela autor. "A pesquisa pretende colaborar com o serviço de saúde do estado de Mato Grosso do Sul no que tange ao diagnóstico diferencial de arboviroses e outras doenças que geram sintomas similares nos pacientes. Nesse sentido, a implementação de técnicas moleculares para detecção de dengue, Zika e Chikungunya e outras arboviroses como Mayaro, Oropouche, Parvovirus B19, nas amostras armazenadas no LACEN permitirá definir o diagnóstico do paciente e direcionar o tratamento adequado."

#### Objetivo da Pesquisa:

As informações referentes aos tópicos 'Objetivo da Pesquisa', foram extraídas do documento "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1859452.pdf", postado pela autor. Objetivo geral: "Padronizar no LACEN/MS o método de RT-qPCR para o diagnóstico diferencial de agentes patógenos que geram sintomas similares nos pacientes com de Dengue, Zika e Chikungunya." Objetivo secundário "Caracterizar geneticamente os patógenos emergentes detectados por RT-PCR em tempo real."

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As informações referentes aos tópicos 'Avaliação dos Riscos e Benefícios' foram extraídas do

Endereço: Av. Tancrede, 6000

Bairro: Jardim Seminário

CEP: 79.117-900

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3312-3478

E-mail: cep@uodb.br

## ANEXO C – FICHA DE NOTIFICAÇÃO COMPULSÓRIA

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO FICHA DE NOTIFICAÇÃO/CONCLUSÃO		Nº	
Dados Gerais	1 Tipo de Notificação	2 - Individual			
	2 Agravado/bença	Código (CID10)	3 Data da Notificação		
	4 UF	5 Município de Notificação	Código (IBGE)		
	6 Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)	Código	7 Data dos Primeiros Sintomas		
Notificação Individual	8 Nome do Paciente		9 Data de Nascimento		
	10 (ou) Idade	11 Sexo M - Masculino <input type="checkbox"/> F - Feminino <input type="checkbox"/> Ignorado <input type="checkbox"/>	12 Gestante	13 Raça/Cor	
	14 Escolaridade <small>0 - Analfabeto 1 - 1ª a 4ª série incompleta do EF (anexo anexo ao 1º grau) 2 - 4ª série completa do EF (anexo anexo ao 1º grau)  3 - 5ª a 8ª série incompleta do EF (anexo anexo ao 1º grau) 4 - Ensino fundamental completo (anexo anexo ao 1º grau) 5 - Ensino médio incompleto (anexo anexo ao 2º grau)  6 - Ensino médio completo (anexo anexo ao 2º grau) 7 - Educação superior incompleta 8 - Educação superior completa 9 - Ignorado 10 - Não se aplica</small>				
	15 Número do Cartão SUS		16 Nome da mãe		
	17 UF	18 Município de Residência	Código (IBGE)	19 Distrito	
	20 Bairro	21 Logradouro (rua, avenida, ...)		Código	
Dados de Residência	22 Número	23 Complemento (apto., casa, ...)	24 Geo campo 1		
	25 Geo campo 2		26 Ponto de Referência	27 CEP	
	28 (DDD) Telefone		29 Zona 1 - Urbana 2 - Rural <input type="checkbox"/> 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30 País (se residente fora do Brasil)	
	<b>Conclusão</b>				
	31 Data de Investigação		32 Classificação Final	33 Critério de Confirmação/Descarte	
	Local Provável da Fonte de Infecção				
34 O caso é autóctone do município de residência?		35 UF 36 País			
37 Município		Código (IBGE)	38 Distrito	39 Bairro	
40 Doença Relacionada ao Trabalho		41 Evolução do Caso			
42 Data do Óbito		43 Data do Encerramento			
<b>Informações complementares e observações</b>					
Observações adicionais					
Investigador	Município/Unidade de Saúde		Cód. da Unid. de Saúde		
	Nome	Função	Assinatura		
	Notificação/conclusão		Sinan NET		
		SVS 27/09/2005			

## ANEXO D: PROTOCOLOS DE REAÇÃO : DETECÇÃO DE FEBRE DO NILO

	<p>GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL SECRETARIA DE ESTADO DE SAUDE SUPERINTENDENCIA GERAL DE VIGILANCIA EM SAUDE LABORATORIO CENTRAL DE SAUDE PUBLICA - LACEN <small>Av. Sen. Celso Müller, 1.889 - V. Ipiranga - CEP 79174-960-Campo Grande, MS. Fone/Fax (087) 3349-1300</small></p>											
<b>NÚMERO</b>	<b>TÍTULO</b>											
	<b>PROTOCOLO DE REAÇÃO - DETECÇÃO DE FEBRE DO NILO (WNV)</b>											
Método: RT-PCR Tempo Real one step - SIGMA		Data: ____/____/____										
<b>7.5uL de MIX + 2.5uL de RNA</b>												
Reação	1 X	( N x)										
H <sub>2</sub> O free	1,2											
2X PCR Master Mix	5,0											
Primer Mix WNV (5µM)	0,8											
Probe 10µM FAM	0,1											
Rox Dye	0,4											
RT	0,2											
RNAv	2,5 µl											
Volume final	10 µl											
<p>Condições para amplificação: 1 ciclo 42°C 5' (RT) 95°C 5' (Taq) 45 ciclos 95°C 3' (Denaturations) 60°C 30" (Extension) 40X</p>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
Observações:								Carimbo e assinatura				

## ANEXO E: PROTOCOLOS DE REAÇÃO: DETECÇÃO DE VÍRUS OROPOUCHE/ MAYARO

 GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE SUPERINTENDENCIA GERAL DE VIGILANCIA EM SAÚDE LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA - LACEN <small>Av. Sen. Celso Müller, 1.099 - Vl. Ipiranga - CEP 79074-460 - Campo Grande-MS Fone/Fax (087) 3345-1300</small>											
<b>NÚMERO</b>	<b>TÍTULO</b>										
	<b>PROTOCOLO DE REAÇÃO - DETECÇÃO DE VÍRUS OROPOUCHE/MAYARO</b>										
Método: RT-PCR Tempo Real one step - SIGMA							Data: ____/____/____				
<b>7.5uL de MIX + 2.5uL de RNA</b>											
Reação		1 X	( x)								
H <sub>2</sub> O free		0.5									
2X PCR Master Mix		5.0									
Primer Mix MAYV 5µM		0.6									
Probe MAYV 10µM YAK		0.1									
Primer Mix OROV 5µM		0.6									
Probe OROV 10µM FAM		0.1									
Rox Dye		0.4									
RT		0.2									
RNAv		2,5 µl									
Volume final		10 µl									

Condições para amplificação:  
 → 1 ciclo  
 42°C 5' (RT)  
 95°C 5' (Taq)  
 → 45 ciclos  
 95°C 3' (Denaturations)  
 60°C 30" (Extensão)  
 40X

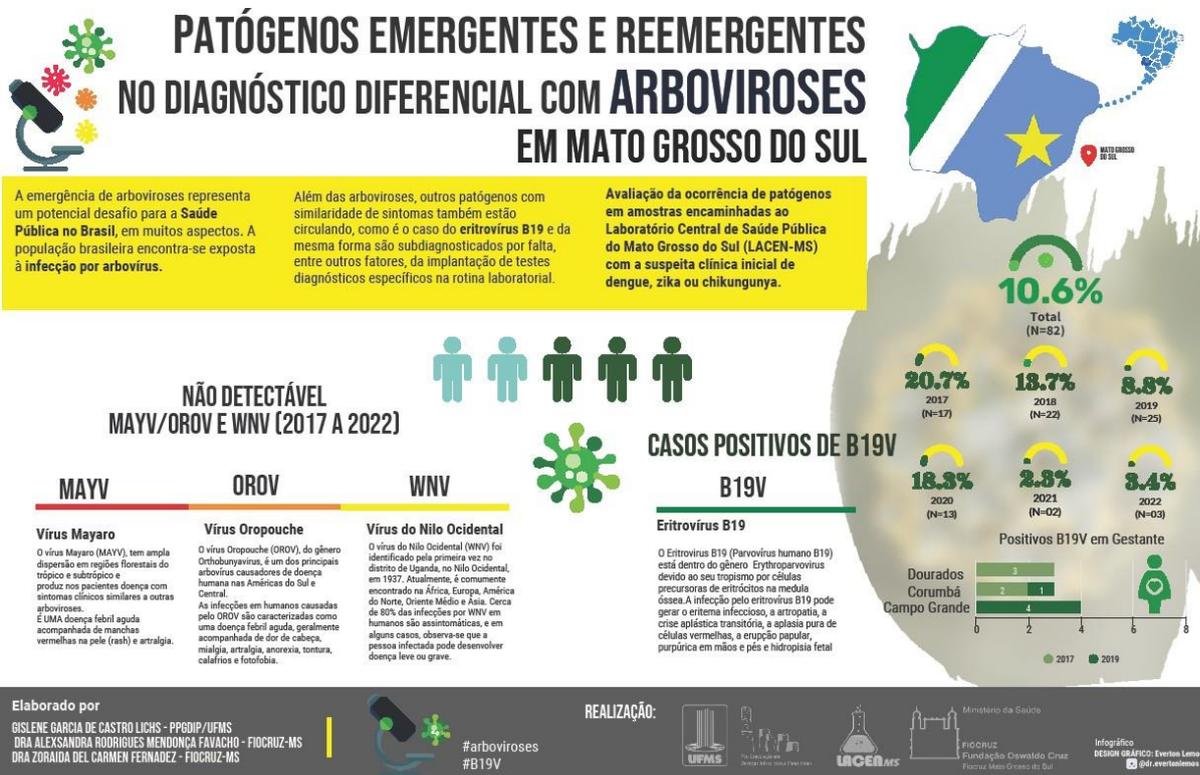
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Observações:	
Carimbo e assinatura	

## ANEXO F: PROTOCOLOS DE REAÇÃO: DETECÇÃO DE ERITROVÍRUS B19.

NÚMERO	TÍTULO																											
	<b>PROTOCOLO DE REAÇÃO - DETECÇÃO DE ERITROVÍRUS (B19)</b>																											
<p>Método: RT-PCR Tempo Real one step - SIGMA      Data: ____/____/____</p> <p style="text-align: center;"><b>7.5uL de MIX + 2.5uL de RNA</b></p>																												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Reação</th> <th>1 X</th> <th>( x)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>H<sub>2</sub>O free</td><td>1.2</td><td></td></tr> <tr><td>2X PCR Master Mix</td><td>5.0</td><td></td></tr> <tr><td>Primer Mix B19 (5µM)</td><td>0.8</td><td></td></tr> <tr><td>Probe 10µM FAM</td><td>0.1</td><td></td></tr> <tr><td>Rox Dye</td><td>0.4</td><td></td></tr> <tr><td>RT</td><td>0.2</td><td></td></tr> <tr><td>RNAv</td><td>2,5 µl</td><td></td></tr> <tr><td>Volume final</td><td>10 µl</td><td></td></tr> </tbody> </table>	Reação	1 X	( x)	H <sub>2</sub> O free	1.2		2X PCR Master Mix	5.0		Primer Mix B19 (5µM)	0.8		Probe 10µM FAM	0.1		Rox Dye	0.4		RT	0.2		RNAv	2,5 µl		Volume final	10 µl		<p>Condições para amplificação:</p> <p>1 ciclo            42°C 5' (RT)            95°C 5' (Taq)            45 ciclos            95°C 3" (Denaturations)            60°C 30" (Extension)            40X</p>
Reação	1 X	( x)																										
H <sub>2</sub> O free	1.2																											
2X PCR Master Mix	5.0																											
Primer Mix B19 (5µM)	0.8																											
Probe 10µM FAM	0.1																											
Rox Dye	0.4																											
RT	0.2																											
RNAv	2,5 µl																											
Volume final	10 µl																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																
A																												
B																												
C																												
D																												
E																												
F																												
G																												
H																												
Observações:								Carimbo e assinatura																				

## ANEXO G: INFOGRÁFICO COM AS INFORMAÇÕES RESUMIDAS DO ESTUDO



**ANEXO H - ANUÊNCIA DE PESQUISA**

GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE



Campo Grande, Mato Grosso do Sul  
26 de Fevereiro de 2021.

**ANUÊNCIA DE PESQUISA**

O Senhor Secretário Estadual de Saúde do Estado de Mato Grosso do Sul, Dr. Geraldo Resende Pereira, CPF: 128.969.181-91, autORIZA a pesquisa "PESQUISA DE PATÓGENOS EMERGENTES E REEMERGENTES NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL COM ARBOVIROSES NO ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL" a ser realizada pela aluna Gislene Garcia de Castro Lichsda, do Programa de pós-graduação em doenças infecciosas e parasitárias, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob a orientação da Profa. Dra. Alexandra Rodrigues Mendonça Favacho (UFMS).

O objetivo da pesquisa é avaliar a ocorrência de patógenos em amostras encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul (LACEN-MS) com a suspeita clínica inicial de dengue, Zika ou Chikungunya, e que tiveram resultados negativos para esses vírus, por meio de um novo fluxograma de diagnóstico diferencial para outros agentes infecciosos.

A diretoria do LACEN-MS autorizou o acesso dos pesquisadores aos dados e as dependências da unidade. A diretoria do LACEN-MS solicita ser informada quando da interrupção da pesquisa, e que seja assegurado a confidencialidade e a privacidade dos dados, que serão disponibilizados apenas para a finalidade descrita no projeto. Alterações no projeto deverão ser comunicadas a diretoria do LACEN-MS. Os resultados e conclusões finais devem após a finalização do estudo, serem relatados no fluxo de conclusão de pesquisas da Gerência de Pesquisa, Extensão e Inovação em Saúde da Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser. Solicita-se ainda que o LACEN-MS seja mencionado como apoiador do estudo, em divulgações de eventos científicos.



---

**Geraldo Resende Pereira**  
Secretário Estadual de Saúde  
Geraldo Resende Pereira  
Secretaria de Estado de Saúde/SES/MS  
Matrícula 723377