

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

Barbara Oliveira dos Santos

**Aplicação de técnicas de propagação e quantificação do vírus Chikungunya para
fins de desenvolvimento de imunobiológicos**

Rio de Janeiro

2021

Barbara Oliveira dos Santos

Aplicação de técnicas de propagação e quantificação do vírus Chikungunya para fins de desenvolvimento de imunobiológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Tecnologia de Imunobiológicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Gisela Freitas Trindade

Coorientadora: Prof^a. Dra. Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio

Rio de Janeiro

2021

Santos, Barbara Oliveira dos.

Aplicação de técnicas de propagação e quantificação do vírus Chikungunya para fins de desenvolvimento de imunobiológicos / Barbara Oliveira dos Santos. - Rio de Janeiro, 2021.

155 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2021.

Orientadora: Gisela Freitas Trindade.

Co-orientadora: Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio.

Bibliografia: f. 133-155

1. Padronização. 2. Validação. 3. RT-qPCR. 4. Vírus Chikungunya. 5. Vacinas virais. I. Título.

Barbara Oliveira dos Santos

Aplicação de técnicas de propagação e quantificação do vírus Chikungunya para fins de desenvolvimento de imunobiológicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Tecnologia de Imunobiológicos.

Dissertação aprovada em 06 de outubro de 2021.

Banca examinadora:



Prof^a. Dra. Christiane de Fátima Silva Marques (1^a Examinadora - Presidente)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos – Fundação Oswaldo Cruz



Prof^a. Dra. Debora Ferreira Barreto Vieira (2^a Examinadora)
Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz



Prof^a. Dra. Erika Martins de Carvalho (3^a Examinadora)
Vice-Presidência de Produção e Inovação em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro
2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, à minha avó e ao meu namorado, pelo constante incentivo e suporte ao longo de toda a vida. Mais um degrau foi avançado com a fundamental ajuda de vocês! Muito obrigada!

Ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz), pela oportunidade de realizar o mestrado.

Às minhas orientadoras, Dra. Gisela Freitas Trindade e Dra. Renata Tourinho Santos Cantinho Bricio, por terem me aceitado como aluna e estarem sempre, pacientemente, dispostas a multiplicar seus conhecimentos, a sanar minhas dúvidas, me auxiliar e incentivar a todo o tempo. Muito obrigada por todo incentivo!

Aos docentes do MPTI, por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos coordenadores, Dr. Marco Alberto Medeiros e Dr. José Procopio Senna, e às secretárias do MPTI, Zaíra e Miriam, pela paciência e disponibilidade.

À toda a equipe da Plataforma de PCR do LATEV, que estiveram sempre disponíveis a me ajudar na execução dos ensaios de RT-qPCR.

À toda a equipe da Plataforma de Produção e Caracterização Viral do LATEV, pelos ensinamentos e auxílio durante a realização dos ensaios de cultivo celular.

À toda a equipe LATEV, pela incrível receptividade e oportunidade. Todos contribuíram e contribuem a cada dia para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Ao Luiz Augusto Lima, do SEVAN, por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas todas as vezes que precisei. Sua ajuda foi indispensável!

E a todos os colegas da turma MPTI 2019, que, por quase um ano, partilharam da convivência diária, dentro e fora da sala de aula, além me proporcionar boas risadas até quando o nervosismo não parecia ter fim. Em especial, à parceria grandiosa de Rafael Loureiro, Rafael Mendonça, João Vitor Inácio, Juliana Pascarelli, Henrique Rocha e Juliana Georg. Ninguém solta a mão de ninguém!

RESUMO

A aplicação de técnicas rápidas capazes de gerar resultados que atendam aos critérios de especificidade, sensibilidade, precisão e exatidão preconizados pelas agências regulamentadoras de saúde pública é um dos desafios enfrentados pelas indústrias biofarmacêuticas durante o processo de desenvolvimento de imunobiológicos. Considerando a significativa prevalência do vírus Chikungunya no Brasil, o desenvolvimento de uma vacina contra este patógeno seria uma das medidas de saúde pública mais apropriadas para a prevenção da doença causada pelo vírus. Ao longo do desenvolvimento de vacinas virais são necessários diversos estudos de monitoramento da potência vacinal, os quais são realizados, principalmente, por meio de técnicas baseadas em cultura de células. Estas demandam um longo tempo de execução e apresentam diversas fontes de variação entre os ensaios realizados. Por isso, abordagens moleculares têm sido desenvolvidas e empregadas nas etapas de desenvolvimento, produção e controle de qualidade de vacinas, reduzindo o tempo de execução e análise e as variações nos resultados. Neste contexto, o estudo aqui apresentado objetivou padronizar métodos de propagação e quantificação do vírus Chikungunya, visando avaliar seu potencial replicativo, e validar a metodologia de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), capaz de identificar e quantificar o vírus Chikungunya de maneira rápida, específica e sensível. Uma amostra do vírus utilizado no estudo foi submetida ao sequenciamento e alinhamento genético para identificação da linhagem. Além disso, a carga viral presente no sobrenadante de culturas de células Vero infectadas com MOI (multiplicidade de infecção) 0,01 foi titulada e comparada entre as técnicas de RT-qPCR e ensaio de plaque. O sequenciamento e alinhamento do vírus revelaram que 99% da sequência apresentou 99,97% de similaridade com a linhagem ECSA. A cinética de replicação demonstrou que, em menos de 24h de infecção, o vírus Chikungunya é capaz de gerar elevados títulos virais. A presença de contaminações e de detecções inespecíficas para o vírus, diluído em soro humano negativo, foram avaliadas pelos parâmetros de eficiência de extração de ácidos nucleicos (método semiautomático) e especificidade analítica/seletividade, demonstrando-se aceitáveis de acordo com os critérios predeterminados para os ensaios. A curva de calibração da RT-qPCR apresentou-se reprodutível, gerando resultados satisfatórios com relação à eficiência média de amplificação (101,15%) do método e ao estabelecimento da faixa linear (entre 2 Log_{10} e 7 Log_{10}) e dos seus limites inferior e superior (55,64 e 17.971.526 cópias/ μL , respectivamente). Já os parâmetros de precisão e exatidão não revelaram resultados homogêneos quanto à variabilidade e à dispersão dos dados, não sendo estabelecido o limite de quantificação do método. Por fim, a sensibilidade analítica/limite de detecção foi determinada em torno de 3,125 cópias/ μL . Mesmo após diluição do vírus em outras matrizes (meio de cultura 199 Earle e PBS) e sua extração por uma metodologia alternativa (coluna de sílica), a variação na matriz de diluição não evidenciou mudanças no perfil dos resultados obtidos. Apesar disso, a técnica de RT-qPCR apresentou-se como uma metodologia robusta para a quantificação de carga viral, permitindo sua aplicação no estudo, desenvolvimento e controle de qualidade de uma vacina contra o vírus Chikungunya.

Palavras-chave: Padronização. Validação. RT-qPCR. Vírus Chikungunya. Vacinas virais.

ABSTRACT

The application of rapid techniques able to provide results in attendance to the specificity, sensitivity, precision and accuracy criteria recommended by public health regulatory agencies is one of the several challenges faced by biopharmaceutical industries during the development process of immunobiologicals. Considering the significant prevalence of the Chikungunya virus in Brazil, the development of a vaccine against this pathogen would be the most appropriate public health measure to prevent the disease caused by the virus. Throughout the development of viral vaccines several studies for monitoring vaccine's potency are necessary which are accomplished mainly by culture cell-based techniques. These studies demand a long execution time and present variations from different sources between the assays. Therefore, molecular approaches have been developed and applied during the phases of vaccine development, production and quality control, reducing the execution and analysis time and variations in the results. In this context, the present study aimed to standardize propagation and quantification methods of Chikungunya virus, in order to evaluate its replicative potential, and validate the quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique, which can identify and quantify Chikungunya virus in a fast, specific and sensitive manner. A virus sample was submitted to genetic sequencing and alignment to determinate which lineage it belongs to. Besides that, the viral load in the infected Vero cells culture supernatant with MOI (multiplicity of infection) 0.01 was titrated and compared between RT-qPCR and plaque assay techniques. The virus sequencing and alignment revealed that 99% of the analyzed sequence presented 99.97% of similarity with the ECSA lineage. The replication kinetic demonstrated that, less than 24h after the infection, Chikungunya virus was able to generate high viral titers. Thus, the presence of contaminants and unspecific detections of the virus diluted in human negative serum were evaluated by the extraction efficiency of nucleic acids (semiautomatic method) and analytic specificity/selectivity which demonstrated to be acceptable according to the predetermined criteria for the assays. The RT-qPCR calibration curve was reproducible, generating satisfactory results related to the average amplification efficiency (101.15%) and to the establishment of linear range (between 2 Log₁₀ and 7 Log₁₀) and its minor and higher limits (55.64 and 17,971,526 copies/μL, respectively). The precision and accuracy parameters did not reveal homogeneous results regarding to the data variability and dispersion. As a result, it was not possible to establish the method quantification limit. Lastly, the analytic sensibility/limit of detection was determined around 3.125 copies/μL. Even after dilution in other matrices (Earle 199 culture medium and PBS) and its extraction by an alternative methodology (silica column), the dilution matrix variation did not revealed changes in the profile of the results obtained. Despite that, the RT-qPCR technique was presented as a robust methodology of viral load quantification which allows its application in the study, development and quality control of a vaccine against Chikungunya virus.

Keywords: Standardization. Validation. RT-qPCR. Chikungunya virus. Viral vaccines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização genômica do vírus Chikungunya	27
Figura 2 – Ciclo replicativo do vírus Chikungunya	29
Figura 3 – Mapa da localização e distribuição mundial dos genótipos do vírus Chikungunya	34
Figura 4 – Representação gráfica do evento de amplificação em uma corrida de RT-qPCR.	53
Figura 5 – Anelamento de moléculas intercalantes de DNA e polimerização da fita dupla de DNA.....	54
Figura 6 – Estrutura e mecanismo de ação da sonda de hidrólise do tipo <i>TaqMan</i>	55
Figura 7 – Esquema da etapa de eficiência de extração da RT-qPCR.....	80
Figura 8 – Esquema das etapas de curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear da RT-qPCR	82
Figura 9 – Esquema das etapas de precisão e exatidão da RT-qPCR.....	84
Figura 10 – Esquema da etapa de sensibilidade analítica/limite de detecção (LD) da RT-qPCR.....	85
Figura 11 – Esquema da etapa de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR.....	86
Figura 12 – Desenho de placa para a etapa de especificidade analítica/seletividade	86
Figura 13 – Desenho de placa das amostras clínicas para a etapa de especificidade analítica/seletividade	87
Figura 14 – Alinhamento da sequência gênica do vírus Chikungunya	89
Figura 15 – Culturas de células Vero monitoradas ao longo da cinética de replicação do vírus Chikungunya.....	91
Figura 16 – Resultados experimentais, em C_q , das amostras virais testadas para o parâmetro de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR.....	111
Figura 17 – Gráfico de amplificação (<i>Amplification Plot</i>) e gráfico de multicomponentes (<i>Multicomponent Plot</i>) para as amostras testadas na etapa de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil de replicação de vírus Chikungunya em células Vero.....	92
Gráfico 2 – Análise comparativa dos títulos virais de Chikungunya	94
Gráfico 3 – Gráfico de monitoramento de desempenho do controle PEC da RT-qPCR obtido de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo.....	96
Gráfico 4 – Representação gráfica da dispersão dos valores de C_q obtidos a partir das curvas de calibração em função do logaritmo de base 10 das concentrações plasmidiais da RT-qPCR.....	99
Gráfico 5 – Representação gráfica da dispersão correlacionando, em função do logaritmo de base 10, as concentrações plasmidiais experimentais obtidas com as concentrações plasmidiais nominais da RT-qPCR.....	101
Gráfico 6 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo.....	108
Gráfico 7 – Gráfico controle dos valores de <i>slope</i> obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya	114
Gráfico 8 – Gráfico controle dos valores de <i>intercept</i> obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya	115
Gráfico 9 – Gráfico controle dos valores de R^2 obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya	115
Gráfico 10 – Gráfico controle dos valores de C_q obtidos de todas as replicatas das curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya..	116
Gráfico 11 – Gráfico controle dos valores de PEC obtidos de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR	116
Gráfico 12 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado.....	121
Gráfico 13 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em PBS	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para os controles de extração (PEC e NEC) e de reação (NTC) da RT-qPCR.....	95
Tabela 2 – Valores de C_q obtidos para os níveis de concentração negativo para a avaliação da curva de calibração da RT-qPCR.....	97
Tabela 3 – Resultados obtidos para a avaliação dos parâmetros de regressão linear das curvas de calibração da RT-qPCR.....	98
Tabela 4 – Compilado dos parâmetros de regressão obtidos das curvas de calibração da RT-qPCR	99
Tabela 5 – Valores de concentrações plasmidiais ajustadas obtidas a partir da equação de regressão linear Log_{10} da concentração plasmidial experimental da RT-qPCR.....	101
Tabela 6 – Parâmetros e coeficientes para a curva ajustada via modelo linear correlacionando, em função do logaritmo de base 10, as concentrações plasmidiais experimentais ajustadas com as concentrações plasmidiais nominais da RT-qPCR.....	102
Tabela 7 – Resumo estatístico para avaliação da dispersão dos dados obtidos para curva de calibração da RT-qPCR.....	102
Tabela 8 – Cálculo do LI e LS para determinação da faixa linear da RT-qPCR.....	103
Tabela 9 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária	104
Tabela 10 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo.....	104
Tabela 11 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para a avaliação da exatidão da RT-qPCR.....	107
Tabela 12 – Resultados de recuperação percentual média da RT-qPCR obtidos de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo por níveis de concentração e por analistas	109
Tabela 13 – Percentuais de resultados de amostras positivas de CHIKV diluído em soro humano negativo para a estimativa do LD 95% da RT-qPCR.....	110
Tabela 14 – Resultados de RT-qPCR das amostras clínicas analisadas para especificidade analítica.....	113

Tabela 15 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária.....	118
Tabela 16 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado.....	118
Tabela 17 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado para a avaliação da exatidão da RT-qPCR	120
Tabela 18 – Resultados de recuperação percentual média da RT-qPCR obtidos de amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado por níveis de concentração e por analistas	121
Tabela 19 – Resultados experimentais da RT-qPCR para CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado e não suplementado.....	123
Tabela 20 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em PBS para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária.....	125
Tabela 21 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em PBS	125
Tabela 22 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em PBS para a avaliação da exatidão da RT-qPCR	126
Tabela 23 – Resultados de recuperação percentual média da RT-qPCR obtidos de amostras de CHIKV diluído em PBS por níveis de concentração e por analistas.....	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação das vacinas para o vírus Chikungunya em fase de estudo clínico	48
Quadro 2 – Definição dos termos e parâmetros utilizados na RT-qPCR.	53
Quadro 3 – Vírus utilizados nos ensaios de cultivo, titulação viral e RT-qPCR executados pelo LATEV.	68
Quadro 4 – Etapas da ciclagem térmica da RT-qPCR para CHIKV com seus respectivos tempos e temperaturas.	75
Quadro 5 – Critérios de aceitação dos ensaios de RT-qPCR.	76
Quadro 6 – Sequência gênica do inserto da proteína nsP1 de Chikungunya inserido no plasmídeo utilizado na curva padrão da RT-qPCR.	77
Quadro 7 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na RT-qPCR de CHIKV.	78
Quadro 8 – Faixas de concentrações e número de réplicas analisadas para LD 95%	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A226V	Posição do resíduo de aminoácido localizado na posição 226 da proteína E1 do envelope viral responsável pelo surgimento da linhagem IOL do vírus Chikungunya
A	Alanina
aa	aminoácido
AcMo	Anticorpo monoclonal
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUD	Domínio único de alfavírus (do inglês, <i>alphavirus unique domain</i>)
BFV	Vírus Barmah Forest (do inglês, <i>Barmah Forest virus</i>)
C	Capsídeo
C6/36	Linhagem de células de <i>Aedes albopictus</i>
Cap	região capeada
poli-A	poliadenilada
CCID ₅₀	ensaio de dose infectante em 50% da cultura de células
CD4	Grupamento de diferenciação (do inglês, <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CHIK	Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMC	carboximetilcelulose
CO ₂	dióxido de carbono
CPE	evento citopático (do inglês, <i>cytopathic effect</i>)
CPV-I e CPV-II	Vacúolo citopático (do inglês, <i>cytopathic vacuole</i>)
C_q	ciclo de quantificação (do inglês, <i>cycle of quantification</i>)
CRV	Complexo de replicação viral
C_t	ciclo de detecção do <i>threshold</i> (do inglês, <i>threshold cycle</i>)
CV	Coefficiente de variação
d.p.i.	Dia pós-infecção

D60G	Posição do resíduo de aminoácido localizado na posição 60 do gene correspondente à proteína E2 do envelope viral responsável por mutações epistáticas na linhagem Asiática do vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue (do inglês, <i>Dengue virus</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
DNAc	DNA complementar
DNA _{df}	DNA de dupla fita
DNA _{pol}	Enzima DNA polimerase
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
E1, E2 e E3	Glicoproteínas transmembranares presente no envelope do vírus Chikungunya
ECSA	Linhagem da África Oriental/Central/Meridional do vírus Chikungunya (do inglês, <i>Eastern/Central/Southern Africa</i>)
EILV	Vírus Eilat (do inglês, <i>Eilat virus</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMA	<i>European Medicine Agency</i>
EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
FAM	Fluoróforo de comprimento de onda de, aproximadamente, 494-515 nm usado como <i>reporter</i> na posição 5' da sonda <i>TaqMan</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FRET	Transferência de energia fluorescente por ressonância (do inglês, <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GAG	Glicosaminoglicana
GMKC	células de rim de macaco verde africano (do inglês, <i>green monkey kidney cell</i>)
GTase	Guanililtransferase
h.p.i.	Hora pós-infecção
HeLa	Linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma cérvix humano
HepG2	Linhagem de células epiteliais de hepatocarcinoma humano
HI	Inibição da hemaglutinação (do inglês, <i>hemagglutination inhibition</i>)

I211T	Posição do resíduo de aminoácido localizado na posição 211 da proteína E2 do envelope viral responsável por mutações epistáticas na linhagem Asiática do vírus Chikungunya
IFA	Imunofluorescência indireta (do inglês, <i>indirect immunofluorescence assay</i>)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IOL	Linhagem do Oceano Índico do vírus Chikungunya (do inglês, <i>Indian Ocean lineage</i>)
IRES	sítio interno de entrada no ribossomo (do inglês, <i>internal ribosome entry site</i>)
LAMEV	Laboratório de Metrologia e Validação – Bio-Manguinhos/Fiocruz
LATER	Laboratório de Tecnologia Recombinante - Bio-Manguinhos/Fiocruz
LATEV	Laboratório de Tecnologia Viroológica - Bio-Manguinhos/Fiocruz
LD	Limite de detecção
LI	limite inferior de linearidade
LIQ	Limite inferior de quantificação
LQ	Limite de quantificação
LS	limite superior de linearidade
LSQ	Limite superior de quantificação
Lulo	Linhagem de células de mosquito da espécie <i>Lutzomyia longipalpis</i>
MAYV	Vírus Mayaro (do inglês, <i>Mayaro virus</i>)
MC	Membrana celular
MeV	Vírus do Sarampo (do inglês, <i>Measles virus</i>)
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês, <i>multiplicity of infection</i>)
MRC-5	Linhagem de células de tecido pulmonar de feto humano
MTase	Metiltransferase
MuV	Vírus da Caxumba (do inglês, <i>Mumps virus</i>)

MVA	Vírus Vaccinia Ankara modificado (do inglês <i>modified vaccinia virus Ankara</i>)
NB	Nível de biossegurança
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEC	Controle negativo de extração (do inglês, <i>negative extraction control</i>)
NK	Célula exterminadora natural (do inglês, <i>natural killer</i>)
NoLs	sequência de localização nuclear (do inglês <i>nuclear localization sequence</i>)
nsP	Proteína não estrutural (do inglês, <i>non-structural protein</i>)
Nt	Neutralização
NTC	Controle negativo da reação (do inglês, <i>non template control</i>)
NTPase	Nucleosídeo-trifosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONNV	Vírus O’Nyong Nyong (do inglês, <i>O’Nyong Nyong virus</i>)
ORF	Região de leitura aberta do genoma viral (do inglês, <i>open reading frames</i>)
P123	Poliproteína componente do complexo de replicação do vírus Chikungunya
P1234	Poliproteína precursora das proteínas não estruturais
pb	par de base
PBS	Tampão fosfato (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
pE2	Proteína precursora da proteína E2
PEC	Controle positivo de extração (do inglês, <i>positive extraction control</i>)
PFU	Unidade formadora de plaque (do inglês, <i>plaque forming unit</i>)
Poli-A	Poliadenilada
PRNT	Teste de neutralização por redução de plaques (do inglês <i>plaque-reduction neutralization test</i>)
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões (do inglês, <i>pattern recognition receptor</i>)
QMR	Quadrado médio da regressão

qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleotídeo
RNAg ou 49S	RNA genômico
RNAm	RNA mensageiro
RNAsg ou 26S	RNA subgenômico
ROX	Fluoróforo de comprimento de onda de, aproximadamente, 575-602 nm
RRV	Vírus Ross River (do inglês, <i>Ross River virus</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (do inglês, <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>) na presença da enzima transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (do inglês, <i>quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction</i>) na presença da enzima transcriptase reversa
RuV	Vírus da Rubéola (do inglês, <i>Rubella virus</i>)
SEVAN	Seção de Validação Analítica - Bio-Manguinhos/Fiocruz
SFB	Soro fetal bovino
SFV	Vírus Semliki Forest (do inglês, <i>Semliki Forest virus</i>)
SINV	Vírus Sindbis (do inglês <i>Sindbis virus</i>)
sP	Proteína estrutural (do inglês, <i>structural protein</i>)
Taq	Enzima polimerase termoestável proveniente da bactéria extremófila <i>Thermus aquaticus</i>
<i>TaqMan</i>	Sondas de hidrólise utilizadas em RT-PCR
TCID ₅₀	ensaio de dose infectante em 50% da cultura de tecidos (do inglês <i>fifty-percent-tissue-culture-infective-dose</i>)
TF	Glicoproteína transmembranar presente no envelope do vírus Chikungunya
UV	Ultravioleta
V	Valina
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana (do inglês <i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>)

Vero	Linhagem de células de rim de macaco verde
VLP	Partícula semelhante a vírus (do inglês, <i>virus-like particles</i>)
VSV	Vírus da estomatite vesicular (do inglês <i>vesicular stomatitis virus</i>)
WNV	Vírus do Oeste do Nilo (do inglês, <i>West Nile virus</i>)
WRAIR	<i>Walter Reed Army Institute of Research</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela (do inglês, <i>Yellow Fever virus</i>)
ZIKV	Vírus Zika (do inglês, <i>Zika virus</i>)
6K	Glicoproteína transmembranar presente no envelope do vírus Chikungunya

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentual
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
α	alfa
β	beta
°C	graus Celsius
<i>c</i>	coeficiente linear ou <i>intercept</i>
cm ²	centímetros quadrados
E	eficiência de amplificação
γ	gama
<i>k</i>	coeficiente angular ou <i>slope</i>
Log	logaritmo
min	minuto(s)
mL	mililitro
mM	milimolar
ND	não detectado
nM	nanomolar
n°	número
pmol	picomol
p-valor	significância do coeficiente angular
<i>r</i>	coeficiente de correlação
<i>Rn</i>	intensidade de emissão do sinal fluorescente emitido pelo produto da PCR
ΔRn	proporção da intensidade de emissão do sinal fluorescente emitido pelo produto da PCR

R^2	coeficiente de determinação
x	concentração/quantidade de alvos identificados na reação
y	valor de C_q

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	Vírus Chikungunya	24
2.1.1	Estrutura, genoma e ciclo replicativo.....	24
2.1.2	Ciclo biológico e as interações entre reservatórios e vetores	30
2.2	Epidemiologia	32
2.3	Patogênese	35
2.4	Prevenção, controle viral e tratamento	38
2.5	Vacinas em desenvolvimento para o vírus Chikungunya	39
2.5.1	Vacina inativada.....	40
2.5.2	Vacina atenuada	42
2.5.3	Vacinas de subunidade	43
2.5.4	Vacina de <i>virus-like particles</i> (VLPs).....	44
2.5.5	Vacinas de vetor viral.....	45
2.5.6	Vacinas de ácidos nucleicos.....	46
2.6	Deteção viral e diagnóstico laboratorial	49
2.7	Princípios básicos da reação em cadeia da polimerase (PCR)	51
2.8	Validação da metodologia de RT-qPCR	57
2.8.1	Eficiência de extração	59
2.8.2	Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear	60
2.8.3	Precisão	61
2.8.4	Exatidão.....	62
2.8.5	Limite de quantificação (LQ)	62
2.8.6	Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD).....	62
2.8.7	Especificidade analítica ou Seletividade	63

2.8.8	Cenário dos estudos de validação de qPCR para o desenvolvimento de vacinas virais	64
3	JUSTIFICATIVA	66
4	OBJETIVOS	67
4.1	Geral	67
4.2	Específicos	67
5	MATERIAIS E MÉTODOS	68
5.1	Biossegurança	68
5.2	Linhagem celular	68
5.3	Vírus	68
5.4	Propagação viral.....	69
5.5	Determinação do título viral.....	70
5.6	Sequenciamento viral e alinhamento	70
5.7	Cinética de replicação viral	71
5.8	Padronização da RT-qPCR para o vírus Chikungunya	71
5.8.1	Estoques virais.....	71
5.8.2	Controles de ensaio	72
5.8.3	Extração semiautomática de ácido nucleico (método de partículas magnéticas)	72
5.8.4	Extração manual de ácido nucleico (método de coluna de sílica).....	73
5.8.5	Diluição seriada do vírus Chikungunya	74
5.8.6	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)	75
5.9	Validação da metodologia de RT-qPCR	78
5.9.1	Eficiência de extração	79
5.9.2	Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear	80
5.9.3	Precisão	82
5.9.4	Exatidão.....	83

5.9.5	Limite de quantificação (LQ)	84
5.9.6	Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD 95%)	84
5.9.7	Especificidade analítica ou Seletividade	85
5.9.8	Controle de qualidade da RT-qPCR.....	87
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
6.1	Produção e determinação do título do banco de trabalho do vírus Chikungunya.....	88
6.2	Sequenciamento viral e alinhamento	88
6.3	Cinética de replicação viral	89
6.4	Validação da RT-qPCR em matriz soro humano negativo	95
6.4.1	Eficiência de extração	95
6.4.2	Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear	96
6.4.3	Precisão	104
6.4.4	Exatidão.....	107
6.4.5	Limite de quantificação (LQ)	110
6.4.6	Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD 95%)	110
6.4.7	Especificidade analítica ou Seletividade	111
6.4.8	Controle de qualidade da RT-qPCR.....	114
6.5	Avaliação da influência de diferentes matrizes na metodologia RT-qPCR	117
6.6	Considerações finais.....	128
6.7	CONCLUSÕES	130
6.8	PERSPECTIVAS.....	132
	REFERÊNCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

Doenças virais causadas por arbovírus emergentes e reemergentes representam um grande problema sanitário no Brasil, sendo o vírus Chikungunya (CHIKV) o responsável por sérios agravos à saúde dos pacientes infectados. Pertencente ao gênero *Alphavirus*, o CHIKV está distribuído por todo o mundo provocando a Chikungunya (CHIK), doença autolimitante de manifestações aguda e crônica, que atinge milhares de pessoas, impactando na qualidade de vida daqueles que por ela são acometidos (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WEAVER; LECUIT, 2015).

Um alvo bastante almejado, com relação às doenças virais, como a CHIK, é o desenvolvimento de um imunobiológico que seja capaz de prevenir o desenvolvimento da doença, como, por exemplo, uma vacina. Entretanto, o caminho percorrido até a disponibilização de uma vacina licenciada e potencialmente eficaz apresenta diversas etapas onde se faz necessário o monitoramento da carga viral presente em cada uma das fases de estudo, conforme exigido pelas agências regulamentadoras.

As abordagens mais empregadas para o acompanhamento da carga viral presente em uma vacina são os ensaios baseados em culturas de células, dos quais podem ser citados os ensaios de plaque e de dose infectante em 50% da cultura de tecidos (TCID₅₀). Embora, sejam os métodos de utilização mais frequente, estes apresentam algumas limitações quanto à sensibilidade de detecção, como ocorre para os vírus incapazes de gerar efeitos citopáticos (CPE) em cultura e são propensas a recorrentes contaminações. Além disso, essas técnicas são extremamente laboriosas e, na maioria das vezes, apresentam baixa reprodutibilidade.

Neste cenário, a aplicação de técnicas moleculares tem ganhado espaço nas últimas décadas. Uma delas é a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR), técnica rápida, sensível, reprodutível e capaz de reduzir os riscos de contaminação cruzada, que tem sido utilizada para a detecção e quantificação de material genético viral (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002). Esta abordagem, por sua vez, já foi empregada para a avaliação da potência de diferentes tipos vacinas para vírus variados (FERNANDES-MONTEIRO et al., 2015; MAHAJAN et al., 2008; RANHEIM et al., 2006; SCHALK et al., 2004; SCHALK; DE VRIES; JONGEN, 2005).

Apesar de ser uma técnica que apresenta diversas vantagens, seus resultados devem ser comprovadamente acurados. Sendo assim, sua padronização e validação devem ser comprovados, conforme as recomendações dos órgãos responsáveis, para a constatar a qualidade do imunobiológico produzido. Então, a fim de avaliar a eficiência do método de RT-

qPCR para a quantificação viral e sua aplicação em projetos direcionados ao desenvolvimento de vacinas contra CHIKV, este foi submetido aos ensaios de padronização exigidos com o objetivo de estabelecer a validação do método e seus resultados de quantificação do RNA viral foram comparados à quantificação obtida por meio do ensaio de plaque.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus (do inglês, “ar” = *arthropod*, “bo” = *borne*) reemergente, transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (WEAVER, 2006). É o agente etiológico da doença conhecida como Chikungunya (CHIK) (TAUBITZ et al., 2007), descoberto em 1952 e isolado pela primeira vez a partir do soro de um paciente infectado durante um surto ocorrido na província de Tanganyika, atual Tanzânia, no ano de 1953 (LUMSDEN, 1955; ROSS, 1956).

Derivada da língua Makonde, falada no sul da Tanzânia, a palavra “*chikungunya*” significa “aquilo que se dobra; aquilo que se curva” e, pelo fato de indivíduos acometidos pela doença apresentarem a postura curvada ao andar devido a intensas dores articulares, a doença foi assim nomeada (ROBINSON, 1955).

Devido à falta de tratamento eficiente e de uma vacina licenciada capaz de prevenir a infecção por CHIKV, esta tem se tornado uma epidemia e um sério problema de saúde pública, representando uma ameaça à saúde humana e veterinária devido à sua ampla distribuição (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; WEAVER et al., 2012).

2.1.1 Estrutura, genoma e ciclo replicativo

O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* e ao complexo antigênico *Semliki Forest virus* (SFV), um dos sete diferentes complexos antigênicos, no qual também estão contidos os vírus O’Nyong Nyong (ONNV), Mayaro (MAYV), Barmah Forest (BFV) e Ross River (RRV) (CAGLIOTI et al., 2013; ICTV, 2018; LWANDE et al., 2015).

Os vírions apresentam cerca de 70 nm de diâmetro, sendo formados por um envelope viral, fortemente associado a um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e constituídos por 240 unidades de heterodímeros triméricos de duas glicoproteínas transmembranares (E1 e E2), que se organizam na forma de espículas (KUHN, 2013; VOSS et al., 2010); pelo capsídeo viral, originado por parte da bicamada lipídica da membrana celular (MC); e por uma única molécula de RNA mensageiro (RNAm) de polaridade positiva, que corresponde ao genoma viral (TANG et al., 2011).

Seu genoma é constituído por aproximadamente 12 kb de tamanho, apresentando duas regiões de leitura aberta 5’ e 3’, mais conhecidas como ORFs (do inglês, *open reading frames*),

separadas por junções não codificantes ou regiões não traduzíveis. Nessas regiões são encontradas uma região capeada (Cap) 7-metilguanossina (extremidade 5') e uma cauda poliadenilada ou poli-A (extremidade 3') (KHAN et al., 2002; SOLIGNAT et al., 2009).

As proteínas localizadas na ORF 3' do genoma viral são responsáveis pela tradução do RNA subgenômico (RNAsg) ou 26S, ou seja, responsáveis pela tradução das 6 proteínas estruturais (sPs) do vírus (KUHN, 2013), representadas pelas proteínas do capsídeo (C) e do envelope viral (E1, E2, E3, TF e 6K), que correspondem a 1244 aminoácidos do genoma viral. Já as proteínas presentes na ORF 5' compõem a maquinaria viral, realizando a tradução do RNA genômico (RNAg) ou 49S, responsáveis pela tradução de 4 proteínas não estruturais (nsPs): nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, representadas por 2474 aminoácidos (Figura 1) (FIRTH et al., 2008; KHAN et al., 2002; KUHN, 2013; LEUNG; NG; CHU, 2011; POWERS; LOGUE, 2007; SNYDER et al., 2013; SOLIGNAT et al., 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

As sPs E1 e E2 constituídas, respectivamente, por 435 e 423 resíduos de aminoácidos (KHAN et al., 2002; WEGER-LUCARELLI et al., 2015) correspondem aos principais epítomos virais, sendo considerados alvos da resposta imune humoral de um hospedeiro e da ação antiviral de vacinas (revisado em POWERS, 2018). Enquanto a glicoproteína E2 tem como função promover a adesão dos vírions aos receptores presentes na MC, a E1 encarrega-se de realizar a fusão entre as membranas da célula hospedeira e do vírion, permitindo, assim, a invasão celular (VOSS et al., 2010). E3 é formada por 61 resíduos de aminoácidos necessários para a translocação da poliproteína E3-E2-6K-E1 ou E3-E2-TF para dentro do retículo endoplasmático, resultando na formação das espículas virais (SNYDER; SOKOLOSKI; MUKHOPADHYAY, 2012).

A proteína 6K corresponde a um canal catiônico que promove o aumento da permeabilidade celular, permitindo a passagem de cátions monovalentes e das partículas virais para o interior da célula durante a infecção (MELTON et al., 2002). Além disso, 6K e E3 atuam como peptídeos precursores das proteínas E1 e E2, e encontram-se em poucas unidades nas partículas virais maduras, assim como a proteína TF (GAEDIGK-NITSCHKO; SCHLESINGER, 1990; JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; LUSA; GAROFF; LIUESTRÖM, 1991; SNYDER et al., 2013). Esta última é formada a partir da extensão da proteína 6K, onde ambas compartilham entre si a região N-terminal do genoma viral, apresentando diferentes extremidades C-terminais (FIRTH et al., 2008). Sua atividade é similar à de 6K, sendo importante para a montagem e liberação dos vírions (SNYDER et al., 2013), bem como para a patogênese (TAYLOR et al., 2016).

A proteína nsP1 é uma enzima que apresenta atividades metiltransferase (MTase) e guanililtransferase (GTase), atuando, respectivamente, na metilação e no capeamento dos novos RNAg e RNAsg sintetizados (CROSS, 1983; LAAKKONEN et al., 1994). Sua ação GTase é essencial para a tradução do RNAm, prevenindo sua degradação por meio de exonucleases (AHOLA et al., 1999; LAAKKONEN; AHOLA; KÄÄRIÄINEN, 1996; LAMPIO et al., 2000).

Diferentemente à nsP1, a proteína nsP2 apresenta variadas atividades enzimáticas e funcionalidades. Sua região N-terminal contém um domínio helicase (GORBALENYA et al., 1984) sustentado, energeticamente, por sua outra função de nucleosídeo-trifosfatase (NTPase) (KARPE; AHER; LOLE, 2011; RIKKONEN; PERÄNEN; KÄÄRIÄINEN, 1994), enquanto a região C-terminal apresenta uma cisteína protease do tipo papaína altamente regulada, que cliva a poliproteína por meio do reconhecimento de suas regiões conservadas (LULLA et al., 2006; RAMAKRISHNAN et al., 2017; VASILJEVA et al., 2003). Além disso, esta proteína tem sido descrita como fator de virulência responsável pelo desligamento dos processos de transcrição e tradução das células hospedeiras e da inibição da resposta antiviral mediada por interferon (IFN), o que contribui para o controle da maquinaria de tradução pelos elementos virais (BHALLA et al., 2016; BREAKWELL et al., 2007).

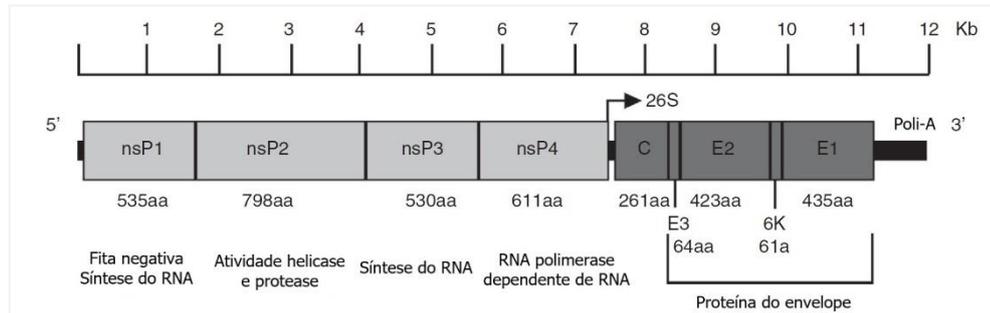
O papel da proteína nsP3 ainda não foi bem descrito, mas sabe-se que esta apresenta três domínios já conhecidos: o macrodomínio N-terminal de atividade fosfatase e de ligação à ácido nucleico, o domínio único de alfavírus (AUD, do inglês, *alphavirus unique domain*) e o domínio hipervariável C-terminal (MALET et al., 2009). Já foi demonstrado que o domínio hipervariável, quando mantido em deleção em SFV, promove uma redução da patogenicidade deste vírus (TUITTILA et al., 2000).

Por fim, a nsP4 corresponde à proteína mais conservada em alfavírus (FORRESTER et al., 2012; WESTON et al., 2002), pois é uma polimerase RNA-dependente que participa da replicação do RNAg por meio do RNA de polaridade negativa e da transcrição do RNAsg (RUBACH et al., 2009).

Devido ao fato de apresentar amplo tropismo, o CHIKV é capaz de se replicar em variadas linhagens celulares de vertebrados e invertebrados (GAY et al., 2012; OZDEN et al., 2007; SALVADOR et al., 2009; SOURISSEAU et al., 2007). Sua replicação é iniciada a partir da interação da proteína E2 do envelope viral à MC (Figura 2 (i)), onde, em seguida, a partícula viral é internalizada por meio do processo de endocitose mediado por clatrina (BERNARD et al., 2010; LEE et al., 2013; SOURISSEAU et al., 2007; VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015) (Figura 2 (ii)). Alguns receptores celulares, como, por exemplo, heparan sulfato, lamininas,

integrinas (KUHN, 2013) e, mais recentemente descrita, proibitina (WINTACHAI et al., 2012), são importantes mediadores deste processo.

Figura 1 – Organização genômica do vírus Chikungunya



Na figura estão sendo demonstradas as proteínas estruturais e não estruturais componentes do genoma viral, suas respectivas funções, o tamanho de cada uma em número de aminoácidos e sua disposição quanto às extremidades 5' e 3'. nsP, proteína não estrutural; aa, aminoácidos; 26S, RNA subgenômico; E, proteína do envelope viral; C, proteína do capsídeo; 6K, proteína estrutural. Fonte: Adaptado de GALÁN-HUERTA et al., 2015.

As glicosaminoglicanas (GAGs) também são caracterizadas por facilitar a adesão vírus-célula hospedeira, levando ao aumento sua capacidade infectiva (ACHARYA et al., 2015; ASHBROOK et al., 2014; KUHN, 2013; SILVA et al., 2014; VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015). Após o evento endocítico, o compartimento endossômico torna-se ácido, desencadeando uma mudança conformacional nas glicoproteínas do envelope viral e promovendo a exposição do peptídeo E1, resultando na fusão de membrana do envelope viral com a membrana do endossoma (Figura 2 (iii)). A partícula viral é, então, desmontada pelo processo conhecido como desnudamento, e o genoma liberado no citoplasma celular. Assim, inicia-se a tradução das nsPs a partir de seu RNAg (Figura 2 (iv)) (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

A poliproteína P1234, precursora das nsPs, é traduzida e clivada por proteases virais na região da nsP2, dando origem à P123 e nsP4 que, por sua vez se unem para formar o complexo de replicação viral (CRV), responsável por sintetizar uma molécula completa de RNAg de polaridade negativa, a qual serve como molde para a geração das moléculas de RNAsg e RNAg (KUHN, 2013; SCHWARTZ; ALBERT, 2010; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

A síntese desta molécula está associada à formação das esférulas, invaginações da MC em forma de vesículas, que atuam como sítios para a replicação viral (Figura 2 (v)). Além disso, sugere-se que as nsPs sejam constituintes estruturais desses compartimentos, servindo de proteção contra a degradação e pelo reconhecimento por receptores de reconhecimento padrões, os PRRs (do inglês, *pattern recognition receptors*), para as fitas duplas intermediárias de RNA (FROLOVA et al., 2010; KUHN, 2013; KUJALA et al., 2001; SPUUL et al., 2010; THAA et al., 2015; UTT et al., 2016). As esférulas são internalizadas e formam grandes vacúolos

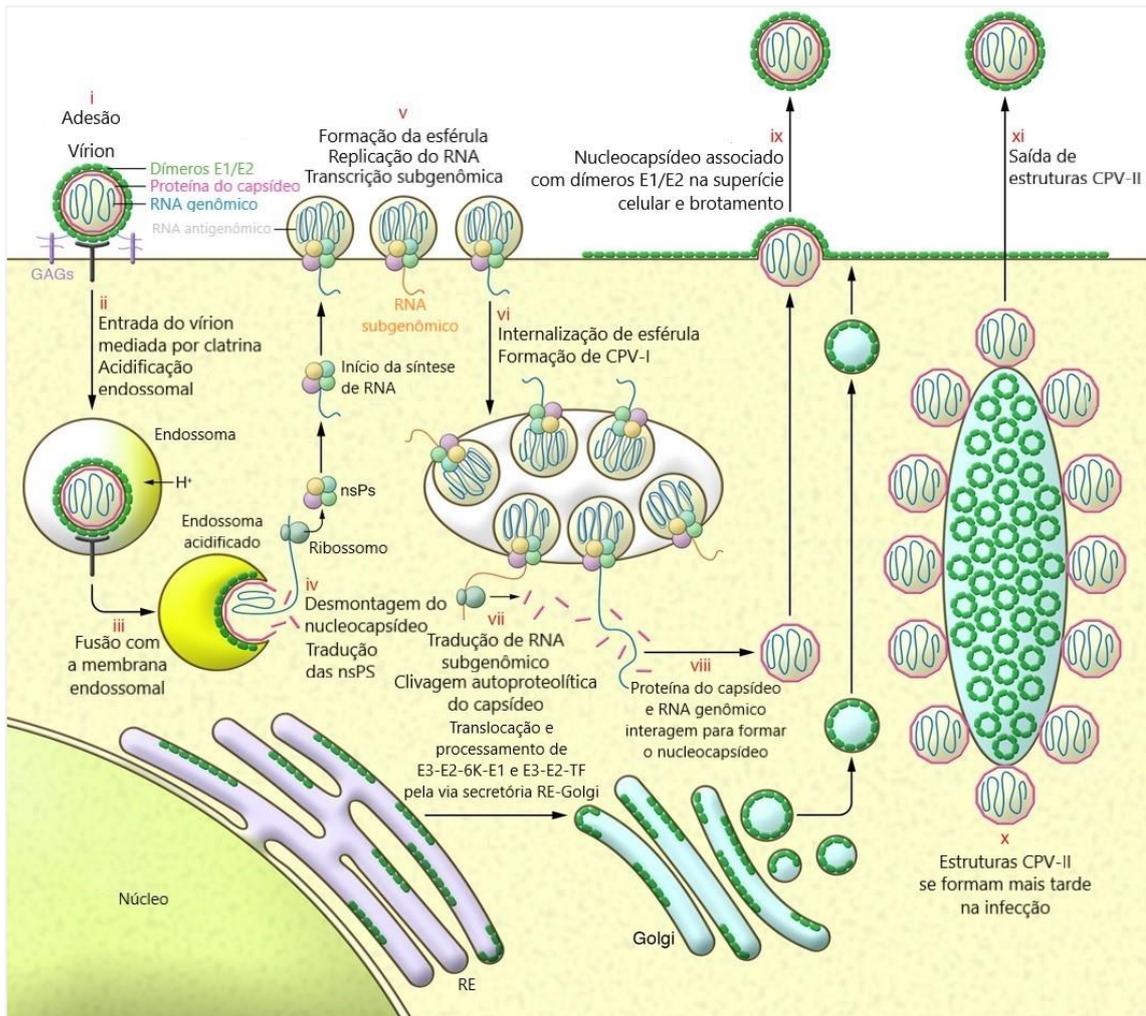
citopáticos, os CPV-I, do inglês *cytopathic vacuoles*, onde estão contidos marcadores de membranas endossomais e lisossomais (Figura 2 (vi)) (FROLOVA et al., 2010; KUJALA et al., 2001; SPUUL et al., 2010).

O acúmulo de P123 desencadeia a proteólise desta poliproteína, o que resulta na modificação da replicase para uma conformação abundante que utiliza RNAg de polaridade negativa como molde para a amplificação do RNAg de polaridade positiva, da mesma forma que para a transcrição do RNAsg de polaridade, também, positiva, que codifica as 6 sPs (Figura 2 (vii)). Ao término da transcrição, a proteína C é clivada do restante da poliproteína, o que permite a interação com parte do genoma viral já sintetizado, promovendo a catálise oligomérica e a formação de nucleocapsídeos contendo uma única molécula de RNAm (KUHN, 2013).

Durante o processo de tradução das sPs são gerados dois diferentes produtos poliproteicos: E3-E2-6K-E1, encontrado em maior quantidade, e E3-E2-TF, em menor quantidade, onde, a partir de uma sequência sinal na porção N-terminal de E3, esses produtos são direcionados à via secretória e, então, no Golgi, clivados na proteína precursora pE2 (E2-E3), E1, e 6K ou TF (Figura 2 (vii)) (FIRTH et al., 2008; SNYDER et al., 2013). Mantidas na forma de um complexo heterologomérico, E1 e E2-E3 são submetidas às modificações conformacionais e pós-traducionais, que permitem a liberação de E3 por meio da ação de uma furina, para a então formação de estruturas em forma de espículas na MC (IVANOVA; SCHLESINGER, 1993; RYAN; IVANOVA; SCHLESINGER, 1998). Em consequência, há o recrutamento de proteínas que formam os nucleocapsídeos em direção às glicoproteínas do envelope viral (Figura 2 (viii)), que já se encontram associadas à MC, dando origem ao brotamento de vesículas da célula hospedeira e promovendo a liberação de partículas virais para o meio extracelular (Figura 2 (ix)) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; SOURISSEAU et al., 2007).

Mais tardiamente, um outro tipo de vacúolo citopático, o CPV-II, é formado e são mantidos próximos à MC (Figura 2 (x)), o que sugere que estas correspondem a estruturas intermediárias das partículas virais que são liberadas para o meio extracelular assim que maduras (Figura 2 (xi)) (SOONSAWAD et al., 2010).

Figura 2 – Ciclo replicativo do vírus Chikungunya



O esquema mostra detalhadamente todos os processos realizados durante o ciclo de infecção viral em células de mamíferos. nsP, proteína não estrutural; E, proteína do envelope viral; 6K e TF, proteínas estruturais; CPV, vacúolo citoplasmático. Fonte: Adaptado de SILVA; DERMODY, 2017.

Tem sido demonstrado que os eventos celulares de autofagia e apoptose são fundamentais ao processo de replicação do CHIKV, não só pelo fato de ser por meio destes que novas progênes virais são liberadas para o meio extracelular, correspondendo a um elemento importante para a propagação do vírus e à sua manutenção em células sentinelas do sistema imunológico de seu organismo hospedeiro, por exemplo, mas também porque atuam como fatores de promoção à replicação viral. Portanto, o sucesso da infecção pelo CHIKV é influenciado pela maquinaria autofágica e apoptótica da célula hospedeira (KREJBICH-TROTOT et al., 2011a,b). Estudos recentes demonstraram que o balanço entre esses processos podem ser os principais responsáveis pela capacidade de disseminação do CHIKV em estágios iniciais da doença (JOUBERT et al., 2012).

2.1.2 Ciclo biológico e as interações entre reservatórios e vetores

O ciclo biológico do CHIKV é compreendido em dois diferentes ciclos de transmissão, o silvestre e o urbano. O ciclo silvestre acontece quando primatas não humanos como, por exemplo, as espécies *Chlorocebus sabaues*, *Mandrillus sphins*, *Papio papio*, *Galago senegalensis*, *Erythrocebus patas*, *C. ascanius schimidti*, *Cercopithecus aethiops* e *P. ursinus*, ou outros vertebrados são infectados pelo vírus através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* spp., como das espécies já relatadas *A. africanus* (POWERS et al., 2000), *A. neoafricanus*, *A. luteocephalus*, *A. furcifer*, *A. vittatus*, *A. dalzieli*, *A. vigilax*, *A. camptorhynchites* que habitam florestas da África Subsaariana, uma das regiões endêmicas do vírus (ALTHOUSE et al., 2018; CAGLIOTI et al., 2013; CHEVILLON et al., 2008; DIALLO et al., 1999; JUPP et al., 1981; KADING et al., 2013; MCCRAE et al., 1971; JUPP; MCINTOSH, 1990; PRUETZ; SOCHA; KANTE, 2010). Já o ciclo urbano ocorre entre humanos por meio da picada de mosquitos das espécies *A. aegypti* e/ou *A. albopictus* (WEAVER et al., 2012).

A proximidade de humanos às florestas africanas possibilitou a entrada do principal vetor do CHIKV, *A. albopictus*, nos vilarejos locais, o que, provavelmente, desencadeou a disseminação do ciclo silvestre entre primatas não-humanos e humanos durante os pequenos surtos ocorridos naquelas localidades (DIALLO et al., 1999; PEYREFITTE et al., 2007, 2008). Já o ciclo urbano se deu a partir da introdução do CHIKV no continente asiático nos anos de 1950 e em 2005, quando este reemergiu, promovendo um ciclo de transmissão entre humano-mosquito-humano por meio dos vetores *A. aegypti* e/ou *A. albopictus*. A exposição de um grande número de humanos aos mosquitos infectados permitiu a amplificação do número de casos de humanos infectados servindo, então, como reservatório viral (WEAVER et al., 2012).

O comportamento e a ecologia do *A. aegypti* representam uma ótima oportunidade para o desenvolvimento de epidemias de CHIKV, pois suas fêmeas adultas realizam, preferencialmente, o repasto sanguíneo em humanos, descansando nos domicílios ou em ambientes peridomiciliares, que permitem seu fácil acesso aos humanos, bem como realizam a deposição de seus ovos em locais que apresentam condições ótimas ao desenvolvimento de seu estágio larval (WEAVER et al., 2012). Além disso, *A. aegypti* pode ser o responsável por transmitir outras arboviroses, como aquelas resultantes da infecção pelos vírus Dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Infecções simultâneas entre esses vírus já foram descritas (CARRILLO-HERNÁNDEZ et al., 2018), revelando que tal evento não compromete o desempenho vetorial dos mosquitos desta espécie (LE COUPANEC et al., 2007; RÜCKERT et al., 2017).

O *A. albopictus* é caracterizado por apresentar vida ativa ao longo de todo o dia e tem expandido, cada vez mais, seus territórios de atuação. Essa expansão territorial tem sido influenciada pelas mudanças climáticas e favorecida pelo descarte incorreto de recipientes plásticos nos mais variados ambientes. As variações no clima afetam seriamente a biologia desses vetores. Por exemplo, com o aumento de temperatura a taxa de sobrevivência dos mosquitos em locais de altas altitudes e latitudes é facilitada. Além disso, como consequência dessa alteração, o aumento na umidade relativa do ar favorece maiores índices pluviométricos, que dão origem a novos *habitats* para o desenvolvimento do estágio larval, aumentando, assim, as taxas de crescimento populacional desses mosquitos e, por fim, aumentando sua sazonalidade. Da mesma forma, os recipientes plásticos, amplamente utilizados nos dias atuais, tornam-se microambientes a partir do acúmulo de água em seu interior que, quando expostos à incidência solar, transformam-se nichos ecológicos com condições ideais de temperatura e umidade para a eclosão dos ovos que neles são depositados (CHARREL; DE LAMBALLERIE; RAOULT, 2007; WOLFE et al., 2001).

Entre ambas as espécies de *Aedes*, a transmissão horizontal do vírus é caracterizada por manter os diferentes ciclos da infecção na natureza (MAVALE et al., 2010), enquanto a transmissão vertical já foi observada em condições naturais e experimentais, sendo apontada como uma das razões do vírus permanecer viável mesmo em condições desfavoráveis (AGARWAL et al., 2014; CHOMPOOSRI et al., 2016; JAIN et al., 2016). Assim que infectados, entre 7 e 10 dias, o CHIKV se replica no organismo dos mosquitos e alcança suas glândulas salivares, tornando-se aptos a infectar humanos (LIM et al., 2018). Estes, por sua vez, apresentam como tempo de incubação do vírus entre 1 e 12 dias, após serem picados por um inseto infectado, apresentando uma viremia de até 10 dias (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; KAM et al., 2009; SIMON et al., 2011).

Um dos principais reservatórios virais durante períodos de epidemia do CHIKV são os humanos, enquanto em outros períodos, esse papel é representado por diferentes animais, além dos macacos, como búfalos (KADING et al., 2013), morcegos, roedores e aves, mantendo, assim, a circulação do vírus no ambiente silvestre. Quando a imunidade de rebanho (também conhecida como imunidade coletiva) de macacos apresenta-se baixa, a infecção entre eles é facilitada. Entretanto, apesar de apresentarem elevada viremia, estes animais não manifestam nenhum sintoma da infecção pelo vírus (HARRISON; BINN; RANDALL, 1967; DIALLO et al., 1999; INOUE et al., 2003; POWERS; LOGUE, 2007; WOLFE et al., 2001).

A infecção por CHIKV em humanos pode acontecer de diferentes maneiras, sendo a mais comum ocorrer por meio de picada de mosquitos infectados (HORWOOD; BUCHY, 2015). Assim como nos vetores, humanos também podem ser coinfectados por diferentes arboviroses, tais como entre CHIKV e DENV (FURUYA-KANAMORI et al., 2016) e CHIKV, DENV, ZIKV, febre amarela (YFV, do inglês *Yellow Fever virus*) e vírus do Oeste do Nilo (WNV, do inglês *West Nile virus*) (BOGA et al., 2019). São poucos os relatos de casos onde indivíduos foram infectados a partir do transplante de órgãos (GASPERINA et al., 2015; GIRÃO et al., 2017; KEE; YANG; TAMBYAH, 2010) e ainda não existem estudos que comprovem a transmissão do vírus através de transfusão sanguínea (APPASSAKIJ et al., 2013) ou por meio da amamentação (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Entretanto, o vírus já foi detectado no sêmen de homens que manifestaram sintomas iniciais da doença, o que indica que a transmissão por via sexual pode ocorrer (BANDEIRA et al., 2016).

2.2 Epidemiologia

Atualmente, são conhecidas quatro linhagens de CHIKV, as quais apresentam diferentes características genótípicas e antigênicas entre si. Desde sua descoberta, vários surtos do CHIKV foram registrados nos continentes africano e asiático e estudos filogenéticos indicam que as primeiras linhagens a surgir foram oriundas da África. São provenientes de lá as duas maiores linhagens circulantes, a da África ocidental, responsável pela maioria dos casos desencadeados pela transmissão silvestre e por pequenos surtos da doença, em humanos, ocorridos no oeste africano; e a da África Oriental/Central/Meridional, mais conhecida como ECSA, sigla derivada do inglês *Eastern/Central/Southern Africa*, responsável pela transmissão urbana do vírus. Esta última, por sua vez, ao ser disseminada para a Ásia, deu origem à linhagem Asiática (POWERS et al., 2000; POWERS; LOGUE, 2007; VOLK et al., 2010).

Entre os anos 1960 e 1990, foram registrados casos em diferentes localidades da Índia, como em Calcutá (1963); Chennai, Pondichery e Vellore (1964); Visakhpatnam, Rajahmundry, Kakinada e Nagpur (1965); Barsi (1973) (ARANKALLE et al., 2007); República Democrática do Congo, na África; e na Indonésia (1999-2000) (BOUTIN et al., 2007; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012).

Em 2004, o genótipo ECSA reemergiu como consequência de um grande surto ocorrido no Quênia, o que possibilitou a disseminação desta em direção ao Oceano Índico, alcançando a ilha La Réunion, território francês, em 2005 (PIALOUX et al., 2007), e estendendo-se até a

Índia (MAVALANKAR; SHASTRI; RAMAN, 2007). Concomitantemente ao surto ocorrido em La Réunion, a linhagem Asiática reemergiu no Sul do Pacífico (THIBERVILLE et al., 2013).

A reemergência da cepa ECSA desencadeou o surgimento da linhagem do Oceano Índico, também conhecida como IOL, do inglês *Indian Ocean lineage*, a qual foi favorecida pelo aprimoramento do *fitness* viral, conceito que descreve capacidade de um vírus em gerar uma progênie infecciosa em determinado ambiente (DOMINGO; HOLLAND, 1997). Neste caso, o *fitness* da cepa IOL permitiu a infecção de mosquitos da espécie *A. albopictus*, devido a uma maior eficiência nos estágios iniciais da infecção de células epiteliais do sistema digestivo dos indivíduos desta espécie, chegando a ser, aproximadamente, 40 vezes mais infecciosa do que em *A. aegypti* (TSETSARKIN et al., 2007, 2009; VAZEILLE et al., 2007).

Essa vantagem foi promovida por conta da proximidade apresentada pelo resíduo de aminoácido localizado na posição 226 da glicoproteína de envelope E1, denominada A226V, ao peptídeo de fusão, responsável pela liberação dos vírions no endossoma, resultando na substituição de uma alanina (A) por uma valina (V) (DE LAMBALLERIE et al., 2008; SCHUFFENECKER et al., 2006) e facilitando a transmissão intraespécie dessa linhagem viral. Diferentemente do observado em *A. albopictus*, essa mutação não influenciou o perfil infectivo em mosquitos da espécie *A. aegypti* (TSETSARKIN et al., 2007; VAZEILLE et al., 2007).

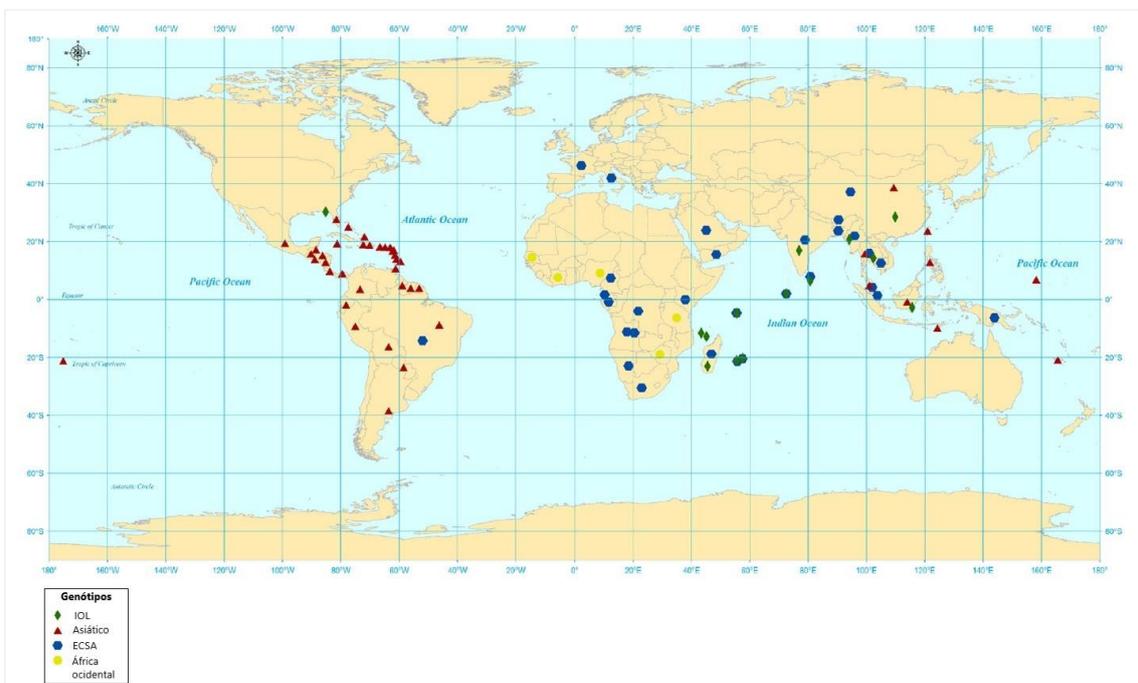
Mesmo A226V sendo considerada uma mutação importante, mutações epistáticas ocorridas na glicoproteína E2, podem ser capazes de modular o processo infeccioso e explicar a incapacidade adaptativa da linhagem Asiática aos mosquitos da espécie *A. albopictus*.

Sendo assim, a reemergência desta linhagem não foi causada por uma mutação adaptativa, mas sim por conta da transmissão viral entre as espécies vetoriais *A. aegypti* e *A. albopictus*, possibilitando um aumento na disseminação do CHIKV para diversas regiões habitadas por estas espécies (TSETSARKIN et al., 2011; VEGA-RUA et al., 2014).

Vários países asiáticos, como Sri Lanka, Tailândia e Malásia, também foram atingidos por surtos do CHIKV, o qual alcançou território italiano, no ano de 2007, com a chegada de um viajante infectado vindo da Índia (CHARREL et al., 2008; REZZA et al., 2007). Já em 2009, La Réunion foi novamente o foco de um novo surto que favoreceu a reintrodução do vírus no continente europeu, em 2010 (D'ORTENZIO et al., 2011). De 2011 a 2013, Oceania, África central, sul, sudeste, leste e oeste asiático, Europa e ilhas ocidentais do Oceano Índico registraram casos de CHIKV (CAGLIOTI et al., 2013).

A partir do final de 2013, foram relatados episódios de infecção por CHIKV principalmente nas Américas central e do sul, como os ocorridos na ilha Saint Martin, no Caribe (LEPARC-GOFFART et al., 2014) e, ao longo de 2014, em Guiana Francesa (VAN BORTEL et al., 2014), El Salvador, Flórida, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Guatemala, Colômbia, Brasil, Nicarágua, Paraguai, México, Belize e Honduras. Esses casos foram relacionados à disseminação da linhagem Asiática pelo continente americano (NUNES et al., 2015; PAHO, 2014a-e).

Figura 3 – Mapa da localização e distribuição mundial dos genótipos do vírus Chikungunya



Os símbolos distribuídos no mapa correspondem à ocorrência das diferentes linhagens do vírus nos mais diversos países. IOL, linhagem do oceano Índico. Fonte: Adaptado de HIGUERA; RAMÍREZ, 2019.

Os primeiros casos autóctones de CHIK registrados no Brasil são datados de setembro de 2014. Estes ocorreram na região norte do país, no Oiapoque, Amapá, pela cepa Asiática do vírus oriunda do Caribe. No mesmo mês desses registros, novos casos da doença foram relatados em Feira de Santana, na Bahia (NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2015). Diferentemente do ocorrido ao norte do país, a cepa circulante identificada no soro de pacientes do estado apresentou o genótipo ECSA como causador da enfermidade. Suspeita-se que este genótipo tenha sido trazido de Angola por um indivíduo infectado que chegou a Feira de Santana, em junho de 2014, por conta da similaridade do genoma viral isolado deste paciente com o genoma de CHIKV de isolados em Angola no ano de 1962 (NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2015; TSETSARKIN et al., 2011). Desde então, o genótipo ECSA tem sido

detectado em diferentes estados das regiões norte, nordeste e sudeste do país, representando uma ameaça à saúde pública, já que esta linhagem está associada a uma maior taxa de casos sintomáticos quando comparada à linhagem Asiática (BUSTOS CARRILLO et al., 2019; CHARLYS et al., 2017; LESSA-AQUINO et al., 2018; NAVECA et al., 2019).

Recentemente, a CHIK tornou-se uma doença de notificação compulsória pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (CDC, 2018), sendo registrado na República do Congo o último surto em fevereiro de 2018 (WHO, 2019).

Os numerosos registros da epidemia global causada pelo CHIKV foram desencadeados por diferentes fatores demográficos e sociais que influenciaram o ciclo de transmissão do vírus por meio de interações entre o vírus, seus vetores, seus hospedeiros e o ambiente favorável à sua manutenção. Dentre estes fatores podem ser citados: a expansão populacional, a qual leva a um processo desordenado de urbanização e promove um aumento no deslocamento de pessoas, animais e vetores portadores do vírus (REZZA et al., 2007; RUSSELL, 2009); a elevada incidência de viajantes, que servem como sentinelas para a disseminação viral, entre os diferentes continentes onde há registros de infecção pelo vírus; a ampla distribuição geográfica dos mosquitos vetores e a adaptação de linhagens endêmicas a uma das espécies vetoriais, o *A. albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007). Pode-se dizer então que, talvez seja por conta desses fatores que o CHIKV, amplamente distribuído por diferentes países e continentes que apresentam essas características sociais e ambientais, ainda não tenha alcançado o continente Antártico (CDC, 2019) (Figura 3).

2.3 Patogênese

Através da picada de um mosquito infectado, o CHIKV é inoculado na intraderme do hospedeiro e, em seguida, invade capilares subcutâneos, o que lhe permite infectar células suscetíveis à infecção, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, fazendo delas seu local de replicação temporário (SOURISSEAU et al., 2007). A progênie viral é, então, carregada até os órgãos linfoides secundários onde infectam células migratórias e liberam novos vírions na circulação linfática e, conseqüentemente, na circulação sanguínea (CAGLIOTI et al., 2013), alcançando alta carga viral logo na primeira semana de infecção (PAROLA et al., 2006). Assim que presente no sangue, o vírus é capaz de alcançar qualquer órgão do hospedeiro (COUDERC; LECUIT, 2009), estando a infecção associada à infiltração de células mononucleares,

promovendo dores musculares e articulares, características da doença (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; OZDEN et al., 2007).

Em humanos, especificamente, a resposta imune inata é a primeira linha de defesa fortemente ativada para suprimir a propagação, replicação e disseminação viral. Sua ação leva à produção de $\text{INF-}\alpha/\beta$, assim como várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento celular, seguida da ativação da imunidade adaptativa por meio da ativação e proliferação de linfócitos T CD8^+ nos estágios iniciais da infecção (fase aguda) e, em estágios mais tardios (fase crônica) da doença, o *switch* de classe para linfócitos T CD4^+ com a produção de proteínas anti-inflamatórias (WAUQUIER et al., 2011).

A infecção por CHIKV também é capaz de induzir resposta imune celular, estando presentes nesse processo altos níveis de $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 e IL-7, por exemplo. Ensaios *in vitro* demonstraram que linhagens de células de mamíferos infectadas por CHIKV apresentam diversas modificações, podendo citar aquelas relacionadas à resposta anti e pró-virais, como apoptose, granulação induzida por estresse e produção de IFN; autofagia e desligamento de determinados genes da célula hospedeira, respectivamente (FROS; PIJLMAN, 2016). Também tem sido sugerido que células NK (do inglês, *natural killer*) tenham um papel fundamental na depuração de células infectadas no organismo do hospedeiro, bem como na manifestação de artralgia durante a infecção (NG et al., 2009).

Quanto aos anticorpos produzidos em resposta à infecção, sabe-se que elevados níveis de imunoglobulina (Ig) do tipo G (IgG) são detectados logo na primeira semana de infecção, o que indica uma rápida soroconversão dos indivíduos infectados por CHIKV, sendo mantidos no soro de pacientes por vários anos. Já as IgMs específicas são detectadas do 2º ao 7º dia, persistindo até o 3º ou 4º mês pós-infecção (AOYAMA et al., 2010; CAVRINI et al., 2009; KAM et al., 2012b; SAM; ABUBAKAR, 2006).

A CHIK é considerada uma doença autolimitante caracterizada por quadros de incapacidade aguda e crônica que impactam a qualidade de vida daqueles que por ela são acometidos, levando a consequências econômicas e sociais (COUTURIER et al., 2012; GÉRARDIN et al., 2008; SCHILTE et al., 2013). A maioria dos indivíduos acometidos pela CHIK desenvolvem um quadro de febre alta, poliartralgia, artrite, rash cutâneo, mialgia e dor de cabeça (ROBINSON, 1955; THIBERVILLE et al., 2013), que apresenta uma baixa taxa de fatalidade de, aproximadamente, 0,1% (RENAULT; JOSSERAN; PIERRE, 2008). Pelo fato de, em sua fase aguda, apresentar sintomas semelhantes aos manifestados pela doença causada

por DENV, sugere-se que casos relatados e imprecisamente atribuídos à infecção por este vírus tenham sido causados por CHIKV já em 1770 (CAREY, 1971; HALSTEAD, 2015).

Seu período de incubação é de cerca de dois a quatro dias, podendo variar entre um e 12 dias, e ser uma infecção assintomática em um percentual de 15% dos casos (APPASSAKIJ et al., 2013). Apesar de apresentar um bom prognóstico e os sintomas agudos da doença desaparecerem, normalmente, em menos de duas semanas, o quadro de artralgia crônica incapacitante característico da doença, que permite distingui-la da infecção por DENV, por exemplo, pode se manifestar por anos (GÉRARDIN et al., 2011; SCHILTE et al., 2013), sendo pessoas com idade superior a 45 anos as mais propensas a desenvolver manifestações musculares e reumáticas da doença (GÉRARDIN et al., 2013). Sugere-se que este quadro esteja relacionado à depuração incompleta realizada pelo sistema imunológico, permitindo assim a persistência do vírus em macrófagos presentes nas articulações, o que estimula a continuidade da inflamação local (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

Além disso, casos severos, fatais e incomuns de encefalopatia, encefalite, miocardite, hepatite, falha múltipla de órgãos e síndrome de Guillain-Barré já foram descritos e estão diretamente relacionados com pacientes que manifestam outras comorbidades (LEBRUN et al., 2009; WEAVER; LECUIT, 2015; PAHO, 2011; WIELANEK et al., 2007). Neonatos nascidos de mães infectadas ou que foram expostos ao vírus durante o parto apresentam taxas de infecção severa que podem alcançar 50%, podendo resultar em sequelas neurológicas e morte (GÉRARDIN et al., 2014).

Dados obtidos a partir de ensaios *in vitro*, demonstraram que CHIKV é facilmente cultivado em linhagens celulares de mamíferos, como Vero, HeLa e HepG2, porém, em células de insetos, como C6/36, por exemplo, esse perfil apresenta-se dependente da cepa viral (WIKAN et al., 2012). Cepas virais submetidas a passagens seriadas em um único hospedeiro ou em uma única linhagem celular tornam-se mais adaptáveis. Quando transferidas para outras linhagens celulares, essas cepas apresentam um maior *fitness* viral, demonstrando um aumento na capacidade de escapar da ação de agentes neutralizantes do sistema imunológico do hospedeiro, bem como apresentam resistência a componentes antivirais. Essas modificações estão diretamente relacionadas com o aumento da diversidade genética do vírus, sugerindo que somente mutações favoráveis ou neutras sejam mantidas nas linhagens utilizadas para a propagação viral e que essas variações genéticas conservem o *fitness* desse vírus em ciclos alternados (COFFEY; VIGNUZZI, 2011).

2.4 Prevenção, controle viral e tratamento

Uma das formas mais amplamente utilizadas como prevenção de doenças infecciosas é a vacinação, porém, no caso de CHIK, ainda não existe nenhuma vacina licenciada disponível para atender a população de regiões endêmicas, por exemplo, o que pode ser relacionado aos recorrentes surtos, de certa forma, limitados a determinada localidade. Por conta disso, maiores esforços são necessários para prevenir a doença e impedir a disseminação viral (CHANG et al., 2014; RUDD et al., 2015; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012).

Atualmente, existem diversos estudos de prospecção sobre candidatos vacinais e antivirais contra o CHIKV. Além disso, várias abordagens vacinais encontram-se em desenvolvimento e têm sido testadas em animais e humanos (revisado em POWERS, 2018; REYES-SANDOVAL, 2019). Portanto, enquanto nenhum tratamento ou vacina são licenciados, a forma mais adequada de prevenção da doença é o uso de repelentes e roupas fechadas, impedindo a picada de mosquitos transmissores do vírus. Também é recomendado o uso de mosquiteiros, inseticidas e a vigilância de ambientes contendo água parada que podem servir como locais de deposição e eclosão dos ovos desses vetores (REITER; FONTENILLE; PAUPY, 2006). Apesar dessas recomendações, tem se tornado cada vez mais difícil o combate contra o CHIKV, assim como outras doenças que têm vetor em comum, devido ao desenvolvimento de resistência, por parte desses, para os inseticidas amplamente utilizados (WILKE; MARRELLI, 2012).

Uma alternativa que tem sido investigada e empregada como promissora ao controle biológico do vírus é a transfecção da bactéria *Wolbachia* nos mosquitos vetores de CHIKV. Esta bactéria atua em simbiose com esses vetores, sendo responsável por promover mudanças reprodutivas em seus hospedeiros, reduzindo o tempo de vida desses insetos e, conseqüentemente, nas populações de mosquitos nas áreas onde os insetos portadores da bactéria são liberados. Portanto, além de favorecer a redução da incidência da CHIK, essa abordagem também permite a redução da incidência de outras doenças que são transmitidas pelos mesmos vetores (ITURBE-ORMAETXE; WALKER; O'NEILL, 2011). Já foi demonstrado que algumas cepas de *Wolbachia* inibem o processo replicativo de diferentes patógenos, incluindo vírus e protozoários (BLAGROVE et al., 2013; MOREIRA et al., 2009; VAN DEN HURK et al., 2012). Outra alternativa de controle biológico consiste na liberação de mosquitos macho geneticamente modificados, portadores de um gene letal dominante ou qualquer outra modificação hereditária que interrompa o aumento populacional desses vetores (WILKE et al., 2009).

Também não existe nenhum medicamento específico para o tratamento da doença. Enquanto isso, os pacientes são paleativamente tratados para os sintomas manifestados a partir do uso de anti-inflamatórios, fluídos e antitérmicos (TAUBITZ et al., 2007). Uma abordagem alternativa para o tratamento de pacientes acometidos pela doença é o uso de anticorpos monoclonais (AcMo) humanos. Por meio de ensaios *in vitro*, já foram demonstrados dois AcMo para as glicoproteínas E1 e E2 do CHIKV, isolados de um paciente com histórico de infecção, capazes de neutralizar fortemente diferentes isolados do vírus e de reduzir sua disseminação entre células infectadas e não infectadas (WARTER et al., 2011).

2.5 Vacinas em desenvolvimento para o vírus Chikungunya

Em janeiro de 2017, após discussões na *Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint*, da Organização Mundial da Saúde (OMS), a CHIK entrou para a lista das doenças prioritárias e patógenos com maior potencial de causar epidemias (WHO, 2017). Diversos foram os fatores que contribuíram para esta classificação, dos quais podem ser citados as inadequadas medidas de controle do vetor viral, os baixos índices de imunidade coletiva nas populações, o rápido processo de globalização, os esporádicos e episódicos surtos ocorridos ao redor do mundo e a elevada morbidade associada à doença (GOYAL et al., 2018).

Frente a esse contexto, aumenta a necessidade de incentivos constantes para pesquisa e desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes que atuem contra essa doença negligenciada, as quais apresentem importantes implicações nas áreas da saúde, da economia e da ética, sendo capazes de reduzir o número de casos ao redor do mundo e, conseqüentemente, os custos com cuidados e hospitalizações, de gerar benefícios à economia através da redução do absenteísmo, de impedir a eventual disseminação do vírus para regiões que apresentem vetores urbanos competentes, e de proteger turistas e militares em regiões endêmicas e/ou epidêmicas (revisado em GOYAL et al., 2018; REZZA; WEAVER, 2019).

As vacinas consistem em produtos biológicos capazes de conferir proteção contra uma infecção e/ou uma doença após a exposição a determinado patógeno, a partir da indução de resposta imune aos indivíduos vacinados contra os antígenos derivados diretamente do patógeno ou produzidos sinteticamente com o objetivo de mimetizá-los (POLLARD; BIJKER, 2020).

O histórico de desenvolvimento de vacinas para CHIKV foi iniciado na década de 1960, impulsionado pelo primeiro surto da doença, pouco tempo após o isolamento do vírus (GAO; SONG; ZHANG, 2019; POWERS, 2018). Diferentemente do que acontece para outras arboviroses, como a dengue, por exemplo, o CHIKV apresenta como vantagem uma baixa variabilidade antigênica, possuindo um elevado percentual de similaridade de aminoácidos entre todas as cepas já descritas (revisado em GOYAL et al., 2018; POWERS et al., 2000). Combinado a isso, está a sua reatividade cruzada comprovada com cepas dos diferentes genótipos, o que torna o campo da vacinologia mais objetivo e permite o desenvolvimento de vacinas de boa qualidade (CHUA et al., 2016; GOO et al., 2016; POWERS, 2011).

Ao longo das últimas décadas, vários candidatos vacinais foram desenvolvidos a partir das diversas estratégias vacinais disponíveis, desde as mais tradicionais, como as vacinas inativadas, atenuadas e de subunidades, até as mais recentemente desenvolvidas, como as de VLPs (do inglês, *virus like particles*), de vetores virais e de ácidos nucleicos (REYES-SANDOVAL, 2019; SCHRAUF et al., 2020). Cada uma delas apresenta diferentes vantagens e desvantagens com relação à produção, dosagem, segurança, eficácia, escalonamento e custo durante as etapas pré-clínicas e clínicas de desenvolvimento (revisado em GOYAL et al., 2018). O quadro 1 contém a relação das vacinas que se encontram em fase de estudos clínicos.

2.5.1 Vacina inativada

Vacinas inativadas correspondem a uma abordagem vacinal bastante segura e eficaz, pois são constituídas por partes de um patógeno ou pelo patógeno inteiro, porém morto, o que o torna incapaz de se replicar no organismo do indivíduo vacinado. Em contrapartida, apresentam antigenicidade reduzida, já que, durante os processos de inativação e purificação, a conformação dos epítomos nativos do vírus podem ser danificados e, devido à sua baixa imunogenicidade, normalmente, necessitam conter adjuvantes que estimulem o processo de resposta imune e o aumento do processamento e entrega dos componentes da vacina, bem como de doses de reforço (DEFILIPPIS, 2019; POLLARD; BIJKER, 2020). Além disso, vacinas inativadas apresentam um elevado custo para sua produção, o que se torna um empecilho na sua acessibilidade em comparação com outras abordagens vacinais, pois demandam uma grande estrutura para sua produção, e apresentam riscos associados às grandes quantidades de vírus que são manipuladas antes do processo de inativação (revisado em GAO; SONG; ZHANG, 2019; REZZA; WEAVER, 2019).

Os primeiros testes para o desenvolvimento de vacina para CHIKV foram realizados com base no vírus inteiro inativado por meio de tratamentos químicos ou físicos, dos quais foram observados resultados satisfatórios, demonstrando sua capacidade em promover resposta imune sem potencial risco de infecção e garantindo seu elevado nível de segurança (revisado em GAO; SONG; ZHANG, 2019; POWERS, 2018). Dentre os diferentes métodos de inativação viral empregados podem ser citados os tratamentos com formalina, radiação ultravioleta (UV) (NAKAO; HOTTA, 1973; TIWARI et al., 2009), β -propiolactona (KUMAR; SUDEEP; ARANKALLE, 2012), etilenoimina binária (GARDNER et al., 2010), e Tween 80/éter (ECKELS; HARRISON; HETRICK, 1970).

O estudo dessa abordagem vacinal que mais se destacou foi o realizado pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR), nos Estados Unidos da América, no qual foi utilizada uma produção viral inativada por formalina da cepa africana 168, a mesma isolada na província de Tanganyika, proveniente de diferentes tipos celulares, como embriões de galinha, cérebro de camundongos neonatos e células de rim de macaco verde africano (GMKC, do inglês *green monkey kidney cells*), para ensaios de potência em camundongos e primatas não humanos (BINN; HARRISON; RANDALL, 1967; MASON; HADDOW, 1957; revisado em POWERS, 2018). Com base nos resultados obtidos, os pesquisadores avaliaram a capacidade de proteção homóloga e heteróloga de uma vacina inativada entre as seguintes cepas: 168 africana; E.103 – isolada de mosquitos *A. africanus* capturados na Floresta de Zika, em Uganda (WEINBREN; HADDOW; WILLIAMS, 1958); BaH-306, isolada de pacientes tailandeses (HALSTEAD; BUESCHER, 1961); e a indiana C-226, isolada em Calcutá (SHAH; GIBBS; BANERJEE, 1964).

Para o primeiro estudo clínico de vacinas para CHIKV, realizado em 1971, foi utilizado o vírus semente da cepa 15561, isolada do soro de um paciente tailandês, proveniente do *United State Army Medical Component SEATO*, em Bangkok. Este estudo clínico demonstrou que a vacina administrada induziu a produção de anticorpos neutralizantes dentro de duas semanas após a segunda dose vacinal nos indivíduos que foram vacinados, sem apresentar efeitos adversos nos mesmos (HARRISON et al., 1971). Entretanto, apesar da excelente imunogenicidade obtida por essa vacina, o estudo foi parado por conta do seu elevado custo de produção (revisado em GOYAL et al., 2018).

2.5.2 Vacina atenuada

Assim como para as vacinas inativadas, os estudos envolvendo vírus vivo atenuado são realizados há bastante tempo. Inicialmente, a produção tradicional de vacinas atenuadas baseava-se, basicamente, na realização de passagens seriadas do vírus selvagem em culturas de células com o objetivo enfraquecê-lo, reduzir sua virulência, porém manter sua capacidade replicativa no organismo vacinado. Para isso, o desenvolvimento de vacinas atenuadas deve consistir no balanço entre uma capacidade de replicação suficiente que seja capaz de induzir uma forte resposta imune e uma atenuação do patógeno que evite a manifestação da sintomatologia da doença (POLLARD; BIJKER, 2020; POWERS, 2018).

A partir de passagens seriadas da cepa 15561 selvagem em culturas celulares de GMKC e MRC-5, a cepa CHIK 181/Clone 25 foi selecionada como o vírus semente para o desenvolvimento da primeira vacina atenuada (LEVITT et al., 1986), denominada TSI-GSD-218, a qual revelou resultados promissores obtidos nos ensaios das fases I e II (EDELMAN et al., 2000; MCCLAIN et al., 1998). Apesar de ser uma alternativa segura e altamente imunogênica, seu desenvolvimento foi interrompido ainda nos estudos de fase II. Porém, o ressurgimento de casos de CHIK nas ilhas do Caribe e do oceano Índico despertou o interesse de empresas farmacêuticas para dar continuidade aos estudos com base nesta cepa (HOKE et al., 2012).

A ocorrência de reversão na virulência das cepas utilizadas para o desenvolvimento de vacinas atenuadas pelas técnicas tradicionais de produção deve ser monitorada constantemente e, por conta disso, a segurança vacinal dessa abordagem deve ser avaliada de maneira cautelosa ao longo dos ensaios não clínicos e clínicos (revisado em GAO; SONG; ZHANG, 2019; GOYAL et al., 2018; POWERS, 2018). A resolução desse problema tem sido possível a partir da implementação dos avanços na área de genética reversa que permitem, a partir da aplicação de técnicas mais avançadas, a realização de mutações específicas e estáveis nos vírus estudados, as quais possibilitam a manutenção de seu elevado potencial imunogênico, sendo capazes de estimular uma resposta imune forte e duradoura (PLANTE et al., 2015; POWERS, 2018).

Com base nesses avanços, diferentes alvos virais puderam ser modificados e utilizados como estratégia nos estudos de desenvolvimento de vacinas atenuadas para CHIKV, dos quais podem ser citados: as nsPs, proteínas responsáveis pela ativação da resposta imune inicial logo após a entrada do vírus na célula hospedeira (CHAN et al., 2019); o capsídeo viral (ZHANG et al., 2019b); a sequência de localização nuclear (NoLs, do inglês *nuclear localization sequence*) da região N-terminal da proteína do capsídeo, a qual é importante para o evento de replicação

viral (ABEYRATNE et al., 2019; TAYLOR et al., 2017); sítio interno de entrada no ribossomo (IRES, do inglês *internal ribosome entry site*) (revisado em POWERS, 2018), e também as múltiplas substituições de códons sinônimos, capazes de reduzir a habilidade de mutação do vírus a partir de códons de parada, direcionando-os à um processo de deleção evolutiva (CARRAU et al., 2019).

Atualmente, nos estudos clínicos mais avançados de uma vacina para CHIKV é empregada a tecnologia de vírus atenuado. Em fase 3 desses estudos, a denominada VLA 1533 é uma vacina de dose única baseada na cepa La Reunion (genótipo ECSA), clone CHIKV LR2006-OPY1, e produzida em células Vero. Essa é constituída por uma deleção de 60 aminoácidos do gene codificante para a nsP3, mais precisamente entre os resíduos de aminoácidos 1656 ao 1717 da poliproteína P1234, desencadeando a atenuação do vírus *in vivo*.

Os estudos de fase 1 demonstraram-na como uma vacina segura, onde os indivíduos vacinados apresentaram 100% de soroconversão em apenas 14 dias após a imunização. Além disso, foram obtidos elevados títulos de anticorpos neutralizantes no soro dos indivíduos vacinados no período de 12 meses após a vacinação (MURA; TOURNIER, 2020; WRESSNIGG et al., 2020). Em maio de 2020, a empresa farmacêutica francesa Valneva SE e o Instituto Butantan assinaram um acordo para o desenvolvimento, produção e comercialização dessa vacina, o que poderá ocorrer somente após a finalização dos estudos clínicos de fase 3 e a transferência de tecnologia da Valneva SE para o Instituto Butantan (INSTITUTO BUTANTAN, 2020; PRECISION VACCINATIONS, 2021).

2.5.3 Vacinas de subunidade

Altamente seguras, de fácil desenvolvimento e de produção escalável em diferentes sistemas de expressão, as vacinas de subunidades correspondem a uma abordagem atrativa já que, assim como as VLPs, não contêm ácidos nucleicos ou partículas virais infecciosas em sua composição (POWERS, 2018), além de ser uma plataforma adaptável em casos de surgimento de variantes do vírus de interesse. Contudo, corresponde a uma abordagem vacinal pouco imunogênica quando administradas somente as subunidades virais, sendo necessário o emprego de adjuvante no formulado vacinal com o intuito de obter uma resposta imune mais forte, o que tende a elevar seu custo de produção (DEFILIPPIS, 2019; SCHRAUF et al., 2020).

Já utilizada contra diferentes patógenos, como bactérias e protozoários (revisado em WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019), essa abordagem também tem sido base para o

desenvolvimento de vacinas contra o CHIKV. Diferentes grupos de pesquisa têm investigado a imunogenicidade promovida a partir de vacinas contendo sPs E1 e E2 recombinantes, associados ou não a outras sPs do CHIKV. Os estudos realizados já demonstraram, por exemplo, que as proteínas produzidas apresentam perfil de glicosilação apropriado e que os anticorpos gerados contra a sP E2 recombinante, em camundongos, são capazes de neutralizar o CHIKV, além de apresentar uma variação no potencial neutralizante de acordo com o adjuvante utilizado na formulação vacinal (KHAN et al., 2012; KUMAR; SUDEEP; ARANKALLE, 2012; METZ et al., 2011).

2.5.4 Vacina de *virus-like particles* (VLPs)

Produzidas a partir da expressão das sPs do vírus de interesse, as VLPs são estruturas que apresentam a capacidade de automontagem, tendo como principal finalidade mimetizar a estrutura viral original, apresentando características estruturais e imunoquímicas similares ou idênticas ao vírus nativo, o que possibilita a indução de elevados títulos de anticorpos neutralizantes nos indivíduos vacinados. Sua vantagem é que, por não conter o genoma viral em seu interior, as VLPs são incapazes de infectar e de se replicar nas células hospedeiras e isso reflete na produção de vacinas altamente seguras (DEZURE et al., 2016; DING et al., 2018). Por conta disso, em geral, representam uma potencial alternativa às vacinas atenuadas, já que têm se demonstrado capazes de gerar uma forte resposta imune mesmo na ausência de adjuvantes (ZHANG et al., 2000).

Sua constituição mais simples favorece o desenvolvimento de vacinas para patógenos altamente mutantes, pois é uma abordagem de produção fácil e mais rápida do que as abordagens tradicionais (BUONAGURO; L. TORNESELLO; M. BUONAGURO, 2010; ROLDÃO et al., 2010; WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019), além de permitir a geração de grandes estoques de maneira rápida (revisado em GOYAL et al., 2018).

A produção de elevados títulos de VLPs apresentando conformação correta é dependente da adequação ao sistema de expressão, já que os diferentes sistemas apresentam distintas vantagens e desvantagens que abrangem desde a capacidade do sistema em realizar modificações pós-traducionais nas proteínas constituintes da partícula até mesmo problemas relacionados ao custo de sua produção e à sua segurança de uso em humanos. Até o momento, os sistemas de expressão utilizados para a produção de vacinas de VLPs empregados contra

diferentes patógenos são bactérias, leveduras, células de insetos, de mamíferos e de aves, assim como plantas (revisado em DING et al., 2018).

As vacinas de VLPs para CHIKV que encontram-se nas etapas de testes não clínicos e clínicos têm apresentado resultados satisfatórios, tanto com relação à confirmação da identidade morfológica das VLPs geradas por um dos sistemas de expressão citados anteriormente quanto à sua capacidade de induzir consideráveis níveis de anticorpos neutralizantes nos indivíduos vacinados (AKAHATA et al., 2010; ARÉVALO et al., 2019; CHANG et al., 2014; GOO et al., 2016; METZ et al., 2013; SARASWAT et al., 2016). Apesar desses resultados, a possibilidade de as VLPs sofrerem alterações conformacionais durante o transporte através do microambiente tecidual ou até mesmo do microambiente celular, levando a sua perda de função, é bastante significativa, o que reforça a necessidade de estudos aprofundados para desvendar como o organismo responde às infecções virais. Somente a partir da compreensão desses fenômenos será possível desenvolver melhores estratégias de *design* das VLPs que resistam às possíveis dificuldades durante sua entrega e processamento (DING et al., 2018).

2.5.5 Vacinas de vetor viral

Outra plataforma vacinal que tem sido bastante empregada para o desenvolvimento de vacinas para diversos vírus é a de vetor viral. Esta é assim denominada porque utiliza um vírus capaz de incorporar, por meio da engenharia genética, o genoma ou parte do genoma de o vírus de interesse, passando a codificar e expressar os antígenos desse patógeno e, conseqüentemente, resultando em uma forte resposta antigênica nos indivíduos vacinados (revisado em GAO; SONG; ZHANG, 2019; POWERS, 2018).

Baseadas em um vírus recombinante, replicante ou não, são capazes de induzir resposta imune celular e humoral robusta e, na maioria das vezes, um elevado grau de segurança por conta da utilização de vetores virais não virulentos (POLLARD; BIJKER, 2020; POWERS, 2018). Por conta dessa característica, a adição de substâncias adjuvantes, utilizadas para estimular a resposta imune, não é necessária.

Além disso, os vetores virais utilizados podem ser produzidos em grandes quantidades, apresentando um custo de produção relativamente baixo (SCHRAUF et al., 2020). Apesar disso ser um facilitador de sua implementação em países que apresentam baixa renda (GOYAL et al., 2018), essa plataforma demanda condições específicas de fabricação, transporte e armazenamento que nem sempre são viváveis nesses países (revisado em DEFILIPPIS, 2019).

Ademais, um outro ponto que pode ser considerado como desvantagem dessa abordagem é uma possível imunidade preexistente ao vetor viral utilizado, devido a uma exposição prévia do indivíduo vacinado ao vírus que atua como vetor, o que pode desencadear uma fraca resposta imune pós-vacinação (POWERS, 2018).

Diferentes plataformas vetoriais têm sido utilizadas para o desenvolvimento de vacinas para CHIKV, podendo citar as baseadas nos seguintes vetores virais: sarampo (BRANDLER et al., 2013); alguns alfavírus, como o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV, do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*) (PAESSLER et al., 2003); uma variante brasileira do vírus Madariaga (AGUILAR et al., 2008), o vírus Sindbis (SINV) (WANG et al., 2008), e o vírus Eilat (EILV), exclusivo de insetos (JOON YAU LEONG, AMIR S. PATEL, 2017); vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA, do inglês *modified vaccinia virus Ankara*) (GARCIA-ARRIAZA et al., 2014); adenovírus (EWER et al., 2017; WANG et al., 2011) e vírus da estomatite vesicular (VSV, do inglês *vesicular stomatitis virus*) (CHATTOPADHYAY et al., 2013). Até o momento, todos os ensaios não clínicos realizados com essas empregando as plataformas citadas foram capazes de induzir a produção de anticorpos contra CHIKV pouco tempo após a vacinação (revisado em POWERS, 2018).

2.5.6 Vacinas de ácidos nucleicos

Considerada como a mais recente plataforma vacinal desenvolvida, as vacinas de ácidos nucleicos utilizam o próprio organismo dos indivíduos vacinados como sistema de síntese e expressão de antígenos codificados pelas sequências de DNA ou RNA do patógeno que compõem a vacina. Assim, os antígenos sintetizados serão identificados pelo sistema imune do hospedeiro e induzirão uma resposta imune a partir da geração de anticorpos específicos contra o patógeno de interesse (revisado em GAO; SONG; ZHANG, 2019; POLLARD; BIJKER, 2020).

O desenvolvimento de vacinas de DNA contra CHIKV foi iniciado com a utilização de plasmídeos vetoriais contendo sequências consenso das sPs C, E1 e E2 do vírus (MUTHUMANI et al., 2008), evoluindo para uma segunda geração dessas vacinas, nas quais esses plasmídeos são utilizados como vetores do DNAc completo de cepas atenuadas (HALLENGARD et al., 2014). A estratégia mais recente emprega plasmídeos carreadores da sequência codificante de AcMo anti-CHIKV específica para as proteínas de envelope do vírus,

os quais permitem a geração de anticorpos ativos, servindo como uma abordagem tanto terapêutica como preventiva (MUTHUMANI et al., 2016).

Vacinas de DNA apresentam como maior vantagem a capacidade de serem produzidas de maneira simples e rápida, já que esta é realizada de maneira sintética, além de permanecer estável, permitindo, assim, seu armazenamento e transporte por longas distâncias. Essa abordagem também é capaz de induzir imunidade tanto humoral quanto celular, representando um progresso no âmbito das vacinas, quando comparada às abordagens vacinais tradicionais, e sendo de grande utilidade quando a via de proteção ao patógeno ainda não foi caracterizada. Entretanto, a possibilidade do DNA exógeno se integrar ao material genético do indivíduo vacinado, desencadeando uma resposta autoimune, assim como a deficiência no processo de captação do DNA administrado, a necessidade de doses de reforço e do uso de adjuvantes na formulação vacinal devido à baixa imunogenicidade gerada por essa abordagem em humanos são algumas das desvantagens que podem ser citadas para essa abordagem (FERRARO et al., 2011; revisado em POWERS, 2018).

As vacinas baseadas em RNA desenvolvidas para a prevenção de patógenos infecciosos, como os vírus, podem ser classificadas como não replicantes e autoamplificantes. As vacinas autoamplificantes utilizam vetores que carregam sequências de RNA de fita simples positiva capazes de codificar tanto o antígeno quanto as nsPs responsáveis pela maquinaria de replicação viral, permitindo a amplificação intracelular do RNA. Assim, teoricamente, ocorre um único ciclo de replicação, porém sem o risco de gerar uma progênie viral infecciosa após a aplicação da vacina, já que o vetor não carrega sequências dos genes codificantes das sPs. A partir dessa abordagem, então, é possível obter uma grande quantidade de antígenos mesmo quando administrada uma pequena dose de vacina. Enquanto isso, as vacinas não replicantes são constituídas somente pela sequência do gene que codifica o antígeno de interesse flanqueada pelas regiões 5' e 3' não traduzíveis. Essa alternativa apresenta uma produção mais simples e mais barata, apesar de ser limitada quanto à duração e ao nível de expressão capaz de alcançar (PARDI et al., 2018; WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019).

Estudos não clínicos de vacinas de RNA contra CHIKV demonstraram que essa abordagem foi capaz de proteger todos os camundongos utilizados no estudo contra o vírus após única dose e de gerar uma forte resposta imune mediada por anticorpos em primatas não humanos (revisado em GOYAL et al., 2018). Além disso, resultados preliminares de estudos clínicos de fase I demonstraram a capacidade dessa plataforma vacinal em gerar anticorpos neutralizantes nos humanos vacinados (SHAW et al., 2019).

Quando comparada às vacinas de DNA, a plataforma vacinal baseada em RNA é mais suscetível à degradação, o que demanda mais rigor durante as etapas de formulação e de processamento e entrega de seus componentes vacinais no organismo dos indivíduos vacinados, sendo necessário o emprego de alternativas protetivas que permitam que as moléculas de RNA alcancem o citoplasma das células hospedeiras em sua forma íntegra (DEFILIPPIS, 2019). Além disso, para ser bem preservadas, essas vacinas necessitam de uma cadeia de frio muito bem estruturada de armazenamento e transporte. Apesar dessas desvantagens, as vacinas de RNA são muito mais seguras do que as de DNA, pois as moléculas de RNA não são capazes de gerar partículas virais infecciosas nem de se integrar ao material genético da célula hospedeira, já que seu processamento e degradação ocorrem, naturalmente, no citoplasma celular. Por conta disso, essa pode ser considerada uma abordagem promissora para o desenvolvimento de vacinas virais. (ZHANG et al., 2019).

Quadro 1 – Relação das vacinas para o vírus Chikungunya em fase de estudo clínico

Abordagem/ Plataforma	Nome	Descrição	Fase do estudo clínico	Estudo clínico	Referência(s)
Inativada	FIV 15562	CHIKV inteiro inativado por formalina	I	NCT04603131	HARRISON et al., 1971
Atenuada	181/25 (TSI-GSD-218)	CHIKV atenuado por passagens seriadas em cultura de células MRC-5	II (interrompida)	NCT03101111	EDELMAN et al., 2000; LEVITT et al., 1986; MCCLAIN et al., 1998
	VLA 1553	CHIKV atenuado por mutações nas proteínas nsP3 e 6K	III	NCT03382964, NCT04546724, NCT04786444	WRESSNIGG et al., 2020
VLP	VRC-CHKVLP059-00-VP	VLP de CHIKV produzidas em cultura de células HEK293	II	NCT02562482	CHANG et al., 2014; GOO et al., 2016; KAM et al., 2012a, 2012b; SUN et al., 2013
	PXVX0317	VLP de CHIKV produzidas em cultura de células Sf21 usando baculovírus	II	NCT03483961	METZ et al., 2013
Vetor viral	MV-CHIKV	Vírus do sarampo codificando sPs de CHIKV	II	NCT03635086	RAMSAUER et al., 2015
	MV-CHIKV-202		II	NCT02861586	BRANDLER et al., 2013; ROSSI et al., 2019; REISINGER et al., 2019

	ChAdOx1 CHIK	Adenovírus de chimpanzé expressando sPs de CHIKV	I	NCT0359039 2	EWER et al., 2017
Ácido nucleico	mRNA-1388 (VAL-181388)	mRNA não replicante encapsulado em lipossomas codificando sPs de CHIKV	I	NCT0332507 5	SHAW et al., 2019

Continuação Quadro 1

CHIKV, *Chikungunya virus*; FIV, *formalin inactivated vaccine* (vacina inativada por formalina); MRC-5, linhagem celular de fibroblasto de pulmão humano; nsP3 e 6K, *non-structural proteins* (proteínas não estruturais); VLP, *virus-like particle* (partícula semelhante a vírus); sPs, *structural proteins* (proteínas estruturais); mRNA, *messenger RNA* (RNA mensageiro). Fonte: Própria autoria.

2.6 Detecção viral e diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de infecção por CHIKV é feito, basicamente, através de critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A detecção viral por meio de exames laboratoriais é crucial para que a infecção não seja confundida com outras doenças que apresentam manifestações clínicas similares à da CHIK, sendo interpretada com base na resposta do sistema imune do hospedeiro por meio da produção de anticorpos específicos para o vírus. Esses anticorpos podem ser detectados por meio de métodos sorológicos, após a fase aguda da infecção, e na cinética de viremia, onde é feita a detecção das partículas infecciosas presentes nos estágios iniciais (fase aguda) da infecção, normalmente, entre o 5º e o 10º dia pós-infecção e/ou do material genético do vírus (CAGLIOTI et al., 2013).

A detecção de anticorpos específicos para CHIKV baseia-se em diferentes métodos sorológicos, podendo ser citados como os mais empregados: ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), inibição da hemaglutinação (HI) e ensaio de neutralização (Nt). Os ensaios de ELISA e IFA correspondem a técnicas rápidas e sensíveis, capazes de detectar anticorpos específicos (IgM e IgG) para determinada doença (CHO et al., 2008; LITZBA et al., 2008; SAM; ABUBAKAR, 2006), enquanto os ensaios de HI e Nt são alternativas para confirmação do resultado obtido por outros métodos, porém são incapazes de distinguir os anticorpos entre IgM e IgG. O ensaio de Nt é bastante empregado por meio do teste de neutralização por redução de plaques (PRNT, do inglês *plaque-reduction neutralization test*), o qual é capaz de detectar e quantificar anticorpos neutralizantes (monoclonais e policlonais), determinando o percentual de redução da atividade viral (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016; BLACKBURN; BESSELAAR; GIBSON, 1995).

A habilidade de invadir a célula hospedeira e se replicar é a propriedade mais importante de um vírus. A quantificação da replicação viral é um meio essencial para caracterizar o

comportamento de diferentes vírus *in vitro* (GRIGOROV et al., 2011; ZANG et al., 2014). Conhecer o perfil replicativo de um agente infeccioso em particular é extremamente relevante para o desenvolvimento de imunobiológicos ou abordagens terapêuticas. Por isso, para quantificar a carga viral de partículas infecciosas são empregadas diversas técnicas já estabelecidas e outras ainda em desenvolvimento.

Os dois métodos mais comuns para quantificar a infectividade de vírus que promovem a lise celular são o ensaio de plaque e o ensaio de dose infectante em 50% da cultura de tecidos (TCID₅₀, do inglês *fifty-percent-tissue-culture-infective-dose*) (CANNON et al., 2006; FARKAS et al., 2008; WOBUS; THACKRAY; VIRGIN, 2006). Ambos se baseiam na ocorrência de efeitos citopáticos (CPE, do inglês *cytopathic effects*) em culturas celulares. O ensaio de plaque é responsável por quantificar as unidades formadoras de plaque (PFU, do inglês *plaque forming units*) geradas a partir de uma partícula viral. Já TCID₅₀ corresponde a um ensaio de diluição *endpoint*, que quantifica a concentração viral necessária para causar CPE ou matar 50% das células em culturas inoculadas com o vírus estudado (SHAN et al., 2016). Apesar de ensaios para a quantificação viral baseados em células serem os métodos mais comuns, estes apresentam algumas limitações como a necessidade de um laboratório com cultivo celular bem estabelecido, demora na sua realização, além de serem de difícil reprodução em diferentes ambientes.

Abordagens moleculares, como as metodologias baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), têm sido desenvolvidas e exploradas como métodos alternativos para identificar a presença de diferentes vírus, já que correspondem a técnicas rápidas, sensíveis e reprodutíveis ao diagnóstico de doenças em seus estágios iniciais. Como pacientes infectados por CHIKV apresentam uma elevada carga viral no soro, a detecção de material genético do vírus é facilitada por meio dessas metodologias (PAROLA et al., 2006), sendo consideradas cruciais para estudos de virologia.

A PCR quantitativa (qPCR) e a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR, do inglês *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*) são os métodos de biologia molecular mais comumente utilizados para detecção viral. Atualmente, esses métodos somente identificam a presença de fragmentos do genoma do patógeno específico, o que sugere a infecção viral, porém não asseguram que a detecção do segmento gênico alvo foi realmente derivada de uma partícula infecciosa. Além disso, genomas virais são normalmente produzidos em excesso e muitos deles nunca se tornam vírions (SMITHER et al., 2013). Entretanto, testes de biologia molecular oferecem várias vantagens,

incluindo: resultados rápidos que auxiliam na detecção viral durante surtos e na emergência de novas cepas; alta sensibilidade e especificidade; identificação de organismos resistentes e correlações mensuráveis para revelar a severidade de uma doença. Tudo isso contribui para decisões clínicas terapêuticas oportunas e intervenções precoces de controle de infecções (EMMADI et al., 2011; ESPY et al., 2006).

Além do mais, a realização de ensaio de plaque com soro descongelado, por exemplo, pode gerar resultado falso negativo para alguns vírus por conta do decréscimo de título viral após seu descongelamento. Portanto, conhecer a correlação entre ensaios baseados em culturas de células e PCR garante a confiabilidade dos dados de viremia em estudos não clínicos e clínicos, especialmente quando não é possível realizar as análises com amostras frescas (BORGES et al., 2019).

2.7 Princípios básicos da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Desenvolvida na década 1980 (VALASEK; REPA, 2005), a PCR é uma técnica realizada *in vitro* que permite a síntese de cópias de ácidos nucleicos com base em um DNA molde, também chamado de sequência alvo, a partir do emprego da enzima DNA polimerase (DNApol), a qual encarrega-se de sintetizar uma sequência de DNA complementar (DNAc) à sequência alvo, promovendo, assim, a amplificação de uma região genômica específica de interesse (MULLIS, 1990). A PCR convencional baseia-se na análise “*endpoint*” dos produtos de PCR, também chamados de *amplicons*, obtidos numa reação, sendo considerada uma técnica relativamente laboriosa, pois necessita de passos adicionais, como, por exemplo, a realização de eletroforese em gel para a detecção do produto da PCR obtido (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

Com o avanço das técnicas em biologia molecular, a metodologia de PCR evoluiu bastante, ao ponto de possibilitar o acompanhamento em tempo real da amplificação do conteúdo de ácido nucleico desejado por meio da PCR em tempo real. O maior advento da PCR em tempo real foi alcançado com a qPCR, que consiste na relação quantitativa, exponencial e semiconservativa entre a concentração de sequência alvo presente no início da reação e a quantidade de produto de PCR acumulada em cada um de seus ciclos (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

Para que a reação de qPCR aconteça é necessária a ação da enzima Taq polimerase amplamente aplicada nesta técnica. Esta enzima corresponde a uma DNApol de ação

exonuclease, capaz de clivar o DNA molde a partir de sua extremidade 5', permitindo a amplificação de fragmentos de DNA específicos (DIDENKO, 2001). Além disso, a qPCR pode ser combinada com o processo de transcrição reversa, sendo mais conhecida como RT-qPCR, na qual está presente a enzima transcriptase reversa, indispensável em ensaios de detecção de patógenos que apresentam genoma RNA, por exemplo. Neste caso, a transcriptase reversa é a responsável por gerar um DNAc partir de uma fita simples de RNA molde. Esta variação da metodologia de qPCR pode ocorrer em um ou dois passos. Enquanto na RT-qPCR de um passo ou, do inglês, *one-step*, a síntese do DNAc e a amplificação da sequência alvo ocorrem em um único tubo, na RT-qPCR de dois passos ou, do inglês *two-step*, essas etapas ocorrem separadamente. Deve ser ressaltado que a RT-qPCR *one-step* é considerada mais eficiente, pois reduz o risco de contaminação da amostra, a ocorrência de possíveis variações entre ensaios e, também, a degradação do material em caso de repetidos ensaios com uma mesma amostra (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

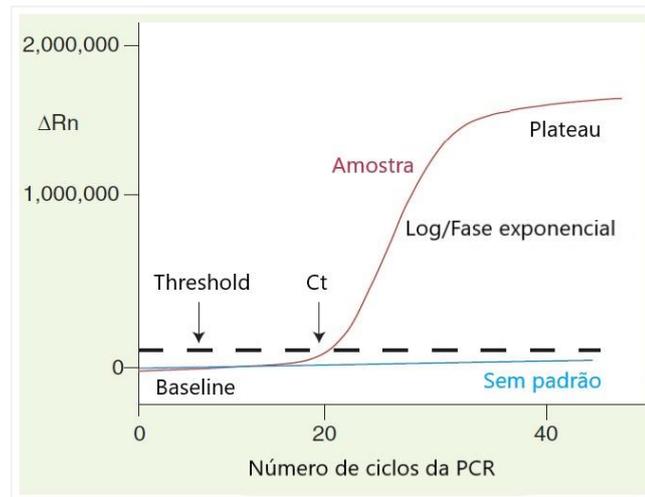
Nos ciclos iniciais da qPCR não é possível detectar as amplificações do DNA molde, pois suas concentrações ainda se encontram abaixo do *baseline* do sistema. Conforme a concentração de *amplicons* aumenta, pode ser, então, observada a fase logarítmica, onde ocorre o aumento exponencial do produto da PCR, seguida da fase *plateau*, onde os componentes da reação esgotam-se, impossibilitando novas amplificações (Figura 4).

A concentração de *amplicons* produzidos em cada ciclo da reação é inversamente proporcional ao número de ciclos em que este foi detectado (BURNS et al., 2005). Logo, quanto maior o número de *amplicons* presentes na amostra, menor é o número de ciclos necessários para sua detecção e quantificação (GIULIETTI et al., 2001).

Diferentemente do que acontece na PCR convencional, a qual revela somente a presença ou ausência de uma molécula alvo ao final da reação – o chamado “*endpoint*”, a qPCR permite a quantificação do número inicial de moléculas alvo presentes numa amostra, comparando o número de ciclos necessários para que a curva de amplificação alcance determinado limiar de fluorescência (*threshold*), sendo este número denominado pelos termos *threshold cycle* (C_t) ou *quantification cycle* (C_q), sendo este último o mais utilizado (KUBISTA et al., 2006).

O quadro 2 contém a definição de alguns termos e parâmetros utilizados na interpretação da RT-qPCR.

Figura 4 – Representação gráfica do evento de amplificação em uma corrida de RT-qPCR.



Na figura estão sendo apresentadas as fases e os termos adotados em RT-qPCR. C_t , *threshold cycle*; ΔRn , normalização de Rn . Fonte: Adaptado de ARYA et al., 2005.

Quadro 2 – Definição dos termos e parâmetros utilizados na RT-qPCR.

Termos e parâmetros importantes da RT-qPCR	
Parâmetro	Definição
<i>Baseline</i>	Corresponde à linha de corte ou base que define o que é considerado ruído da reação, sinal fluorescente que se acumula, porém está abaixo do limite de detecção (LD) do aparelho, e o que é amplificação real.
ΔRn	É a proporção da intensidade de emissão do sinal fluorescente emitido pelo produto da PCR em cada tempo da reação, obtido subtraindo Rn do <i>baseline</i> ($\Delta Rn = Rn - baseline$).
<i>Threshold</i>	Valor arbitrário limite estipulado pelo software de análise da reação de acordo com a variabilidade do <i>baseline</i> , que pode ser modificado manualmente para cada análise. O sinal fluorescente detectado acima do <i>threshold</i> é considerado real e pode ser utilizado para definir o <i>quantification cycle</i> (C_q) da reação.
<i>Quantification cycle</i> (C_q)	Corresponde ao ciclo onde o sinal fluorescente do <i>reporter</i> é maior do que a detecção do <i>threshold</i> durante a fase exponencial da amplificação.

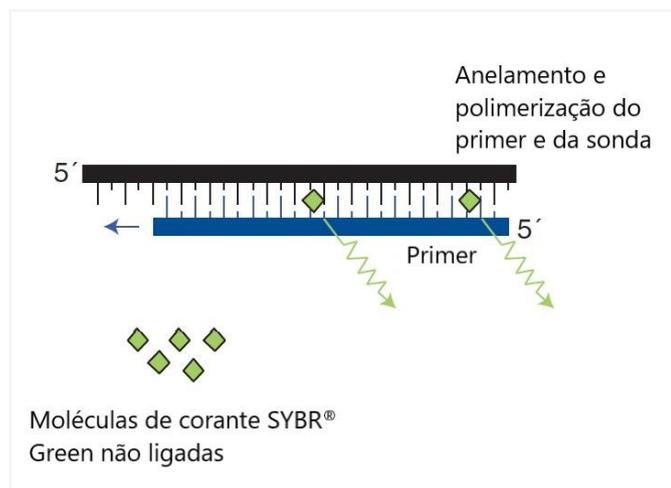
Fonte: ARYA et al., 2005

A mensuração da amplificação da sequência alvo é feita por meio de um oligonucleotídeo, contendo um fluoróforo em sua extremidade 5', desenhado de maneira que seja capaz de hibridizar com a sequência alvo a ser detectada, atuando como sonda da reação. A detecção do produto de PCR é normalmente realizada pelo emprego de agentes químicos

capazes de interagir com a sequência alvo a ser analisada. Assim, podem ser empregados corantes intercalantes de DNA de dupla fita (DNAdf) e sondas de hidrólise fluorescentes.

Os agentes intercalantes de DNAdf, por exemplo o SYBR *Green*®, como o próprio nome diz, só emitem sinal fluorescente quando intercalam ao material genético, sendo a intensidade da fluorescência dependente da quantidade de DNAdf presente na reação. Apesar de apresentar baixo custo, este é um método inespecífico e de seletividade limitada, pois o SYBR *Green*® é capaz de intercalar em qualquer tipo de DNAdf formado na reação, como, por exemplo, *amplicons* não específicos e com dímeros de *primers*, o que impede sua implementação no diagnóstico de diferentes alvos numa mesma reação (Figura 5) (ARYA et al., 2005; NAVARRO et al., 2015). Já com as sondas de hidrólise fluorescentes, como a *TaqMan*®, isto não ocorre, pois para que esta gere um sinal fluorescente é preciso que ocorra a hibridização específica entre a sonda e os *primers* senso e anti-senso complementares ao DNA molde (Figura 6). Além dessa vantagem, as sondas de hidrólise fluorescentes podem ser acopladas a diferentes corantes permitindo, assim, a detecção de mais de uma sequência alvo em uma única reação, como acontece na RT-PCR multiplex, onde diferentes sondas são desenhadas para diferentes alvos (ARYA et al., 2005).

Figura 5 – Anelamento de moléculas intercalantes de DNA e polimerização da fita dupla de DNA



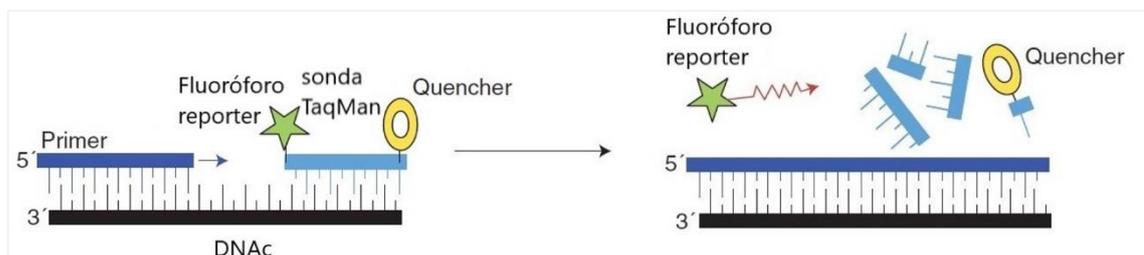
Fonte: Adaptado de ARYA et al., 2005.

O anelamento por complementariedade entre a sequência alvo e os *primers* permite que a enzima DNAPol acople-se a este segmento e exerça sua atividade de exonuclease, estendendo uma fita complementar por meio de polimerização utilizando os nucleotídeos livres componentes da reação (ARYA et al., 2005; HEID et al., 1996).

No sistema *TaqMan*®, o mais aplicado para ensaios de qPCR, a sonda é acoplada a dois diferentes marcadores fluorescentes, um na extremidade 5', conhecido como *reporter* ou *donor*, e outro na extremidade 3', chamado de *quencher* ou *acceptor*. Esta anela-se a uma sequência de nucleotídeos específica presente na molécula alvo logo após a do *primer* (CARDULLO et al., 1988). A integridade da sequência determina a inibição da fluorescência do *reporter* pelo *quencher*.

Durante a reação, a sonda hibridiza com a sequência alvo e, por ação da enzima Taq polimerase, esta é clivada no sentido 5'-3', separando o *reporter* do *quencher* e permitindo que a fluorescência do *reporter* seja restaurada e emitida (Figura 6) (DIDENKO, 2001). O comprimento de onda da fluorescência emitida pelo *reporter* é transferida e captada pelo *quencher* através do princípio conhecido como transferência de energia fluorescente por ressonância ou FRET, do inglês *fluorescence resonance energy transfer* (CARDULLO et al., 1988). Conforme ocorre a clivagem da sonda pela enzima Taq polimerase, a intensidade do sinal fluorescente aumenta exponencialmente e se acumula a cada ciclagem. Esse sinal fluorescente é detectado, em tempo real, por meio de uma foto sensor presente no termociclador, equipamento acoplado a um computador contendo software específico capaz de interpretar os sinais fluorescentes emitidos e construir gráficos durante a amplificação da PCR, como demonstrado na figura 4 (HEID et al., 1996).

Figura 6 – Estrutura e mecanismo de ação da sonda de hidrólise do tipo *TaqMan*.



DNAc, DNA complementar. Fonte: Adaptado e modificado de NAVARRO et al., 2015.

A quantificação absoluta de *amplicons* em uma amostra desconhecida é realizada por meio da mensuração do C_q e do uso de uma curva padrão para determinar o número de cópias iniciais existentes na reação de amplificação. O emprego de uma curva padrão é aplicado em casos nos quais a quantificação absoluta é crítica como, por exemplo, para ensaios de quantificação da carga viral em uma amostra desconhecida (BORG et al., 2003; CASTELAIN et al., 2004; LIN et al., 2004).

A forma mais comum empregada para a construção de uma curva padrão é por meio da utilização de um plasmídeo contendo a sequência alvo desejada, do qual é feita uma diluição seriada que servirá como base para a quantificação do número de cópias de material genético em uma amostra. Além desta, uma outra maneira de construção de curva padrão é por meio de oligonucleotídeos sintéticos, comercialmente adquiridos, na forma de fita simples correspondentes ao *amplicon* que se deseja quantificar (ARYA et al., 2005). Embora ambas as alternativas de curva padrão sejam eficazes, a utilização de uma curva plasmidial apresenta algumas vantagens, como fácil produção, estabilidade e baixo custo (KRALIK; RICCHI, 2017).

A capacidade de quantificar o produto resultante das diversas amplificações na qPCR está diretamente associado à sua capacidade qualitativa em identificar a positividade ou negatividade da sequência de interesse em determinada amostra. A complementariedade destas capacidades permite a obtenção de uma resposta adequada frente ao resultado obtido em um ensaio de qPCR dedicado à investigação de uma infecção viral, por exemplo.

Este método é importante para estudos epidemiológicos devido à sua capacidade de quantificar a presença de ácidos nucleicos de um patógeno em uma única reação, indicando uma infecção ativa (CHIAM et al., 2013) em uma ampla faixa de quantificação (KLEIN, 2002); por apresentar maior sensibilidade analítica em comparação a métodos tradicionais de avaliação da carga viral (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002); para o estabelecimento de protocolos terapêuticos adequados em casos de reativação ou persistência na progressão de uma doença (EMMADI et al., 2011); bem como método alternativo complementar aos métodos tradicionais para a avaliação da potência de vacinas (KUMAR et al., 2018).

A metodologia de qPCR apresenta-se como um método sensível, preciso, reprodutível, de rápida análise e com baixo risco de contaminação, capaz de detectar e mensurar, de maneira confiável, os produtos de PCR obtidos ao longo de cada ciclo da reação proporcionalmente à quantidade inicial de DNA molde adicionado à reação e obter resultados com maior rapidez, quando comparada à técnica de PCR convencional (KUBISTA et al., 2006; MORILLO et al., 2003; NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004). Além disso, é comumente utilizada para diferentes propósitos, como para a identificação de patógenos e para a quantificação da carga viral em uma amostra (CHIAM et al., 2013; WAGGONER et al., 2018), seja ela proveniente de um indivíduo infectado ou até mesmo de um formulado vacinal.

A aplicação da metodologia de qPCR para o acompanhamento da carga viral em vacinas é uma alternativa rápida, precisa e reprodutível (KUMAR et al., 2018), permitida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), desde que sejam cumpridos todos os parâmetros

exigidos no processo de validação do método (ANVISA, 2019) para que os resultados obtidos sejam considerados seguros.

A produção de vacinas é uma atividade rigorosamente monitorada quanto à sua esterilidade, pureza e potência, devendo passar por uma série de critérios em cada uma das etapas do ciclo produtivo até seu licenciamento e liberação para o público. Por isso, diversos ensaios analíticos são utilizados para o monitoramento e caracterização das etapas de desenvolvimento, produção e vigilância, de acordo com a abordagem vacinal empregada (WOLF; WANG; WANG, 2007).

Métodos baseados em PCR têm sido cada vez mais utilizados no desenvolvimento de vacinas, na liberação e caracterização de suprimentos vacinais, em estudos de avaliação de segurança em estudos não clínicos e na análise de amostras em ensaios clínicos. Portanto, para que uma vacina seja disponibilizada ao público esta deve atender parâmetros estabelecidos por órgãos regulamentadores de produtos biofarmacêuticos, que devem ser avaliados por uma série de ensaios compreendidos no processo de validação (WOLF; WANG; WANG, 2007).

A partir do aumento da disponibilidade de métodos de diagnóstico molecular de elevada complexidade, a validação destes tem apresentado desafios significativos (WOLF; WANG; WANG, 2007). Para os ensaios de PCR, alguns aspectos críticos como seleção de controles positivo e negativo, controles internos e de inibição, o número aceitável e o tipo de amostra devem ser avaliados (ESPY et al., 2006).

2.8 Validação da metodologia de RT-qPCR

Com o objetivo de garantir que um método analítico obtenha resultados confiáveis sobre uma determinada amostra em estudo, este deve ser submetido à avaliação de desempenho através de diferentes estudos contemplados num processo denominado validação, o qual tem como objetivo demonstrar que o método aplicado é adequado para o propósito pretendido, seja ele uma determinação qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa de um determinado analito (ANVISA, 2017).

O processo de validação da metodologia de PCR é uma etapa essencial e indispensável para sua implementação. Seu estabelecimento visa garantir a qualidade dos resultados atingidos, os quais devem se apresentar dentro dos parâmetros analíticos exigidos pelas agências regulamentadoras para que seja comprovada a conformidade tanto do objetivo quanto do desempenho do ensaio realizado (BURD, 2010; BUSTIN et al., 2009).

Duas são as agências brasileiras responsáveis pela regulamentação da validação de ensaios laboratoriais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Apesar de ambas ditarem os parâmetros de aceitação para cada método específico, estas não utilizam nomenclaturas universais para os parâmetros avaliados, apresentando variações nas expressões empregadas e, quando comparadas aos diversos guias de métodos de validação disponíveis e estabelecidos em outros países, demonstram diferenças quanto aos parâmetros que devem ser avaliados.

Atualmente, a ANVISA apresenta dois documentos complementares, as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC) nº 27 e nº 166, que ditam os parâmetros que devem ser atendidos para a validação de métodos laboratoriais. A RDC nº 27, estabelecida em 2012, contempla as exigências para validações bioanalíticas que utilizam matrizes complexas de origem biológica, ou seja, matrizes compostas por um número indefinido de substâncias variadas, com a finalidade de estabelecer os requisitos mínimos a serem empregados em estudos para registro e pós-registro de medicamentos no país. No entanto, em seus artigos 3º e 5º, respectivamente, fica explícito que esta dedica-se a métodos cromatográficos e que os ensaios aplicados podem ser ajustados ou modificados, atendendo aos fundamentos desta Resolução, quanto à validação de metodologias alternativas (ANVISA, 2012). Já a RDC nº 166, de 2017, abrange métodos analíticos utilizados em todas as fases de produção de insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, como ensaios biológicos e imunobiológicos, com exceção dos métodos microbiológicos (ANVISA, 2017).

A falta de consenso acerca da melhor maneira de executar e interpretar os resultados de experimentos de qPCR e de detalhes experimentais, impede a avaliação crítica sobre a qualidade desses resultados. Exemplos desse impasse é o fato de que, enquanto a ANVISA preconiza os parâmetros de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade no processo de validação analítica (ANVISA, 2012), o INMETRO por meio de seu documento DOQ-CGCRE-008, que dita os parâmetros que devem ser aplicados na validação de métodos analíticos, inclui também a realização de ensaios de limite de detecção (INMETRO, 2020).

Por conta das diversas divergências encontradas em artigos sobre validação de métodos de qPCR, em 2009, foi realizada a publicação de um guia abordando o conjunto de diretrizes que descrevem o mínimo de informações necessárias para a avaliação de experimentos de qPCR, o *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) (BUSTIN et al., 2009).

Nos últimos anos, alguns guias abordando tópicos importantes para a avaliação do desempenho a ser considerado ao longo do processo de validação de métodos que empreguem técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos foram publicados por agências internacionais, podendo ser citadas as publicações realizadas pela *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) e pela *European Medicine Agency* (EMA) (EMA, 2015; EPA, 2016; FDA, 2019).

Portanto, com o intuito de atender às particularidades acerca dos parâmetros analíticos exigidos para a metodologia de qPCR que não são abordadas nos documentos ofertados pelas agências regulamentadoras brasileiras, decidiu-se por incluir no estudo de validação alguns parâmetros contemplados em documentos internacionais que permitam a obtenção de resultados mais consistentes para o desenvolvimento, produção e acompanhamento de projetos de vacinas contra o CHIKV.

Assim sendo, os parâmetros aplicados no estudo serão:

- Eficiência de extração;
- Curva de calibração;
- Eficiência de amplificação;
- Faixa linear;
- Limite de quantificação (LQ);
- Precisão;
- Exatidão;
- Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD 95%);
- Especificidade analítica ou Seletividade.

2.8.1 Eficiência de extração

A eficiência de extração corresponde ao parâmetro que demonstra se o processo de extração aplicado no método é satisfatório e reprodutível, levando em consideração a matriz utilizada. Além disso, nesta etapa também devem ser testadas amostras negativas, ou controles, para o alvo desejado na intenção de garantir a não ocorrência de contaminação cruzada durante a execução do ensaio (FDA, 2019).

Os controles de extração de ensaios que incluem o procedimento de extração de ácidos nucleicos devem ser capazes de detectar erros decorrentes do processo. A preparação desses controles consiste em amostras contendo o analito de interesse, em baixa concentração, na

matriz apropriada ao método. Estas amostras são submetidas a corridas em paralelo com as amostras que se deseja analisar (BURD, 2010).

Em métodos moleculares, a inibição pode ser decorrente de diferentes fatores endógenos ou exógenos à amostra em análise, gerando resultados falso-negativos e sendo necessário o emprego de controles internos à reação. Esses controles servem como indicadores de inibição e devem ser ajustados em concordância com a menor concentração de analito capaz de ser detectado pelo método com o objetivo de evitar a redução de sua sensibilidade (BURD, 2010).

2.8.2 Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear

A curva de calibração estabelecida para um processo de validação deve ser constituída por diluições seriadas de concentrações conhecidas do produto de PCR ou de um plasmídeo purificado que apresente a sequência alvo de interesse (RUTLEDGE; CÔTÉ, 2003), a qual é responsável por relacionar a resposta obtida pelo instrumento de medição com a concentração conhecida do analito em investigação (ANVISA, 2012). A partir dela é possível realizar a avaliação de alguns parâmetros indispensáveis ao estabelecimento do método, como eficiência de amplificação (E) do método, faixa linear que este compreende e seus limites inferior e superior de quantificação do método (EPA, 2016; FDA, 2019).

A eficiência de amplificação (E) avalia a capacidade do método em amplificar a sequência alvo desejada, sendo estimada por meio do coeficiente angular (*slope*) obtido pela equação de regressão linear da curva de calibração. Este parâmetro compreende o intervalo entre 0 e 1 (0-100%), onde $E = 1$ indica que o número de cópias de DNA duplicou em cada ciclo da reação, revelando que o método é detentor de 100% de eficiência (BROEDERS et al., 2014; JOHNSON; NOLAN; BUSTIN, 2013).

Além disso, a determinação da eficiência de um ensaio de PCR utilizando uma curva padrão permite identificar a presença de inibidores da reação, a ocorrência de erros de execução da PCR como, por exemplo, erro de pipetagem, ou até mesmo indica que o ensaio deve ser otimizado. Essa análise torna-se possível através do coeficiente de determinação (R^2), o qual deve ser maior do que 0,98 indicando eficiência satisfatória da reação (BROEDERS et al., 2014; JOHNSON; NOLAN; BUSTIN, 2013; FDA, 2019).

A ANVISA determina que para métodos analíticos devem ser avaliadas, pelo menos, três curvas de calibração que apresentem, no mínimo, seis amostras de diferentes

concentrações, enquanto a EPA, mais específica, indica a necessidade de cinco a oito diluições, em fator 10, para o intervalo de concentrações utilizadas na PCR (ANVISA, 2012; EPA, 2016).

A faixa linear de um método compreende o intervalo entre o maior e o menor número de cópias de ácido nucleico quantificáveis (limites inferior e superior de linearidade, respectivamente), estabelecido pela curva de calibração empregada no método. O *MIQE* determina que esta deve compreender, pelo menos, três ordens de magnitude e alcançar concentrações de cinco ou seis \log_{10} (BUSTIN et al., 2009).

Também denominada como intervalo de quantificação, a faixa linear é definida pela EPA como o intervalo de concentrações de ácidos nucleicos alvo capazes de serem detectados e que apresentem um nível aceitável de precisão, exatidão e especificidade. Na qPCR a faixa linear é determinada pelo R^2 , medida estatística que indica o quanto a regressão linear se aproxima dos valores de C_q obtidos de repetidos testes da curva de calibração empregada no método, sendo $R^2 = 1$ (100%) o ajuste perfeito para a reta de regressão (EPA, 2016).

2.8.3 Precisão

A ANVISA considera precisão como o parâmetro capaz de avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por repetidas aferições de várias alíquotas de uma mesma amostra matriz, enquanto a FDA, além de considerar análises de uma mesma amostra, também admite a concordância de resultados com amostras semelhantes, sob condição específica (ANVISA, 2017; FDA, 2019).

A precisão é expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância nos resultados obtidos dentro de uma única corrida analítica, sendo o ensaio realizado por um único analista utilizando os mesmos instrumentos. A precisão intermediária corresponde à concordância dos resultados obtidos em um laboratório a partir da análise de resultados obtidos em, pelo menos, dois dias diferentes e por analistas e/ou equipamentos diferentes. Já a reprodutibilidade consiste na concordância entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios a partir de estudos colaborativos ou na padronização de determinada metodologia (ANVISA, 2017).

Conforme a RDC nº 27 da ANVISA, a precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (intracorrída) e em, pelo menos, três corridas diferentes (intercorrídas) em dias distintos, nas quais devem ser realizadas, no mínimo, cinco replicatas utilizando cinco ou mais concentrações do analito (ANVISA, 2012).

A precisão não apresenta como um valor numérico e é expressa qualitativamente como alta, média ou baixa, por meio do DPR ou CV%, medidas estatísticas de imprecisão, que correspondem à dispersão de resultados sob condições específicas de análise, utilizando a análise de variância (ANOVA) mais adequada para o método (BURD, 2010).

2.8.4 Exatidão

A exatidão é definida, tanto pela ANVISA quanto pelo FDA, como a concordância entre o resultado de um ensaio e um valor de referência (ANVISA, 2012; FDA, 2019). Mais especificamente para a metodologia de qPCR, a EPA a define como a capacidade do método em quantificar corretamente um número de alvos de DNA presentes em uma amostra, quando esta é comparada com uma amostra de referência apresentando uma quantidade conhecida de moléculas alvo (EPA, 2016).

Este parâmetro aplica-se a métodos que tem como objetivo, por exemplo, o diagnóstico de doenças, a confirmação de um diagnóstico sorológico e a avaliação do efeito de determinada terapia (BURD, 2010), o qual deve ser determinado em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em, pelo menos, três corridas diferentes (exatidão intercorrída) em dias distintos com base em um material de referência. Cada uma das corridas deve conter, no mínimo, cinco replicatas utilizando, pelo menos, cinco diferentes concentrações do analito de interesse (ANVISA, 2012).

2.8.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) compreende os limites inferior e superior de quantificação, que são definidos, respectivamente, como a menor e maior quantidade de um analito que pode ser medido e quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais do método (ANVISA, 2012, 2017; NCCLS, 2004).

Normalmente, o LQ é determinado como o limite de detecção (LD) por meio de replicatas de amostras diluídas e analisado na forma de coeficiente de variação (CV%), o qual, para qPCR, consideram-se valores menores do que 25% (KRALIK; RICCHI, 2017).

2.8.6 Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD)

A sensibilidade analítica é um parâmetro crítico nos ensaios de qPCR, a qual se refere ao menor número de moléculas de DNA alvo que podem ser detectadas e distintas de um

resultado negativo, porém, não necessariamente quantificadas, sendo calculado com base na curva de calibração do método, permitindo, assim, a definição da faixa limite do ensaio (BUSTIN; NOLAN, 2004; ANVISA, 2017).

A sensibilidade analítica é expressa como limite de detecção (LD) sendo, normalmente realizada de maneira empírica, por meio de diluições seriadas do alvo em uma matriz específica contendo uma concentração do alvo, que esteja dentro da faixa de linear, e definido como a diluição onde é possível detectar a presença do alvo em 95% das replicatas (BURD, 2010; BUSTIN et al., 2009; KRALIK; RICCHI, 2017).

A sensibilidade analítica é bastante relevante, pois determina um método como uma poderosa ferramenta utilizadas para o diagnóstico de doenças infecciosas e para a determinação do tratamento dessas doenças. Por conta da sua relevância, deve estar presente tanto em métodos quantitativos, quanto em métodos qualitativos por representar um parâmetro importante para a avaliação da performance da técnica que se aplica. Pelo fato de se basear na concentração do analito mensurado, quanto menor for a quantidade detectada de analito, maior é a sensibilidade analítica do ensaio utilizado. Na maioria das vezes, o LD corresponde a um valor abaixo da faixa de linearidade do ensaio e é menor do que o limite inferior de quantificação (LIQ), não podendo ser superior a este (BURD, 2010).

2.8.7 Especificidade analítica ou Seletividade

Assim como a sensibilidade analítica, a especificidade analítica de um método também é um parâmetro crítico nos ensaios de qPCR. Este refere-se à capacidade apresentada pelos *primers* utilizados nas reações de PCR de se anelarem somente ao alvo de interesse. Este baseia-se nos conceitos de inclusão, definida como a habilidade do método em detectar uma ampla variedade de alvos correlatos ou mesmo cepas ou isolados de um determinado alvo, e de exclusividade, que corresponde à capacidade do método de distinguir o alvo de interesse entre alvos similares capazes de gerar reação cruzada (KRALIK; RICCHI, 2017).

Apesar de ser denominada como seletividade pelas agências regulatórias brasileira e europeia, ANVISA e EMA, a especificidade analítica compartilha da mesma teoria também com a FDA, sendo descrita como a capacidade de um método de diferenciar ou quantificar o analito de interesse, de maneira inequívoca/exclusiva, mesmo na presença, por exemplo, de impurezas, diluentes e componentes da matriz contidos na amostra (ANVISA, 2012, 2017; EMA, 2015; FDA, 2019).

EMA e EPA incluem em seus guias definições do parâmetro específicas para o método de PCR. Segundo a EMA, a especificidade analítica é definida como a habilidade do método de PCR em discriminar o alvo de interesse entre diferentes sequências alvos (EMA, 2015). Além disso, a EPA, em seu documento base *Microbiological Methods of Analysis*, destaca diversos fatores que podem impactar na especificidade analítica do método de PCR, sendo citados, de modo geral, variações e interferências nos *primers* utilizados, na matriz empregada para os ensaios, na concentração da sequência de interesse, na etapa de extração, na composição e concentração dos insumos, e na temperatura de ciclagem adotada para o ensaio (EPA, 2016).

2.8.8 Cenário dos estudos de validação de qPCR para o desenvolvimento de vacinas virais

Com base no panorama atual relacionado ao desenvolvimento e estabelecimento de metodologias capazes de identificar e quantificar o CHIKV que possam ser empregadas no desenvolvimento de projetos de vacinas contra este vírus, muitas dificuldades ainda são enfrentadas devido à variabilidade de resultados apresentados pelos métodos amplamente utilizados para este fim. Aliado a este fato, também há a necessidade da implementação de métodos que apresentem elevada sensibilidade e especificidade para a obtenção de resultados confiáveis ao longo de todas as etapas de desenvolvimento, produção e monitoramento de vacinas virais.

Diante dessa necessidade, técnicas de biologia molecular, como a qPCR, têm sido cada vez mais aprimoradas e empregadas no estudo de vacinas virais nas últimas décadas, abrindo novos caminhos para mitigar essas questões. Entretanto, por não existir um documento dedicado ao esclarecimento e normatização dos parâmetros a serem avaliados nas etapas da qPCR para o estudo e desenvolvimento de vacinas virais, uma série de interpretações podem ocorrer, impedindo o consenso nos resultados apresentados em cada estudo e fazendo necessária validação do método aplicado.

Assim, neste trabalho, a técnica de RT-qPCR foi submetida ao estudo de validação que consistiu em um compilado de parâmetros, além daqueles exigidos pela ANVISA para os métodos bioanalíticos disponíveis, possibilitando, assim, um monitoramento mais robusto das diversas etapas de desenvolvimento e produção de uma vacina contra o CHIKV. Além disso, o estabelecimento de um ensaio de RT-qPCR devidamente validado para este vírus confere a Bio-Manguinhos a capacidade de atender de maneira rápida e eficiente as demandas de saúde

pública, mantendo seu elevado padrão de qualidade com relação aos produtos e serviços oferecidos à sociedade.

3 JUSTIFICATIVA

Como já foi abordado anteriormente, a emergência e reemergência de diversas arboviroses representam um grande desafio a ser enfrentado pelas agências de saúde pública ao redor do mundo. Há algumas décadas, o CHIKV vem causando grandes impactos em diferentes âmbitos da sociedade (HOSSAIN et al., 2018; KURI-MORALES et al., 2015; NAVA et al., 2017) por conta de seu comportamento debilitante em indivíduos infectados. Neste contexto, nos últimos anos, diversos esforços de pesquisadores e órgãos de saúde têm sido realizados em busca de alternativas que levem ao desenvolvimento de imunobiológicos para a prevenção e/ou tratamento dos indivíduos que por elas são acometidos (REYES-SANDOVAL, 2019; REZZA; WEAVER, 2019).

O antígeno viral é detectado basicamente por técnicas que envolvem a infecção viral em cultivo celular. Apesar de serem capazes de mensurar a quantidade de partículas infecciosas, as metodologias baseadas em cultivo celular demandam maior tempo para a obtenção de resultados, além de serem laboriosas e, muitas vezes, não apresentarem reprodutibilidade favorável devido às condições de cultivo de acordo com o patógeno em estudo. Com base nesses fatores, se faz importante a implementação de uma metodologia de RT-qPCR mais específica e sensível e que atenda a todos os parâmetros preconizados pela ANVISA. Esse método quantitativo visa contribuir em futuros projetos de desenvolvimento tecnológico em vacinas, pois, além de avaliar a replicação viral em ensaios não-clínicos, poderá também contribuir para o monitoramento das diferentes fases de produção de uma vacina para CHIKV.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Padronizar métodos de propagação e quantificação do vírus Chikungunya a fim de avaliar o potencial replicativo do vírus e a aplicação desses métodos em projetos de desenvolvimento de vacinas.

4.2 Específicos

- a) Identificar a linhagem viral de CHIKV empregada nos ensaios;
- b) Avaliar a proliferação do CHIKV por meio de cinética em culturas de células Vero;
- c) Titular CHIKV por meio da metodologia de ensaio de plaque;
- d) Quantificar CHIKV por meio da metodologia de RT-qPCR;
- e) Comparar as titulações obtidas por ensaio de plaque (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL);
- f) Avaliar a eficiência do método de RT-qPCR para a determinação da carga viral de CHIKV.
- g) Aprimorar o desempenho da metodologia visando validar o ensaio de quantificação viral por RT-qPCR para CHIKV.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Biossegurança

Todos os ensaios foram devidamente realizados de acordo com as normas de biossegurança, a partir do uso de equipamentos de proteção individual e coletiva em laboratório de nível de biossegurança 2 (NB2). Amostras de células e vírus foram manipuladas e processadas em cabines de segurança biológica previamente desinfetadas com etanol a 70% e submetidas à radiação ultravioleta por 15 min. Todos os procedimentos de biologia molecular foram realizados em salas separadas de fluxo unidirecional, destinadas a cada uma das etapas de extração do RNA viral, obtenção de DNAc e realização da RT-qPCR.

5.2 Linhagem celular

Células Vero, uma linhagem celular derivada de rim de macaco verde africano da espécie *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL-81), foram cultivadas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ em meio de cultura 199 Earle suplementado com 40 µg/mL de sulfato de gentamicina e 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, ajustado para 4 mM de L-glutamina (todos da Gibco®BRL, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, U.K.) para cultivo do vírus e ensaios de titulação viral.

5.3 Vírus

Para o estudo de padronização e validação da RT-qPCR foram necessários, além do vírus CHIKV, outros vírus para a avaliação de determinados parâmetros exigidos pelos órgãos regulamentadores. Assim, foram preparados bancos de trabalho desses vírus, demonstrados no quadro 3, cada um com seu respectivo título viral/concentração.

Quadro 3 – Vírus utilizados nos ensaios de cultivo, titulação viral e RT-qPCR executados pelo LATEV.

Vírus	Fonte	Título viral/Concentração
Vírus Chikungunya	SISGEN AF444 A7 (21/09/2018)	2,14 x 10 ⁶ cópias/µL
Vírus Zika	Isolado de paciente na Paraíba (ZIKV PB81 - Gene Bank KX280026)	1,60 x 10 ⁷ cópias/µL

Vírus Dengue (Sorotipos 1, 2, 3 e 4)	Fornecidos pela coleção do LATEV – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos/Fiocruz	Dengue 1 1,58 x 10 ⁷ cópias/reação
		Dengue 2 1,68 x 10 ⁷ cópias/reação
		Dengue 3 2,27 x 10 ⁷ cópias/reação
		Dengue 4 1,18 x 10 ⁷ cópias/reação
Vírus Febre Amarela vacinal 17DD		8,53 x 10 ⁷ cópias/μL
Vírus Caxumba vacinal cepa Jeryl Lynn	6,4 Log ₁₀ PFU/mL	
Vírus Sarampo vacinal cepa Schwartz	7,72 Log ₁₀ PFU/mL	
Vírus Rubéola vacinal cepa Wistar RA27/3	5,98 Log ₁₀ CCID50	

Continuação do Quadro 3

Relação dos vírus utilizados para os ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

5.4 Propagação viral

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi gentilmente cedido pelo Dr. Ricardo Lourenço (Laboratório de Mosquitos Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ) a partir do isolamento de uma amostra clínica. Para a construção de um banco de trabalho de CHIKV, este foi cultivado em células Vero em meio de cultura 199 Earle a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂, em condições assépticas, com multiplicidade de infecção (MOI, do inglês, *multiplicity of infection*) de 0,01 predeterminado. O banco de trabalho foi coletado no segundo dia pós-infecção (d.p.i.) e o volume total do sobrenadante das culturas foi ajustado para 8% de D-sorbitol (SigmaAldrich, Darmstadt, Germany). Em seguida, este foi submetido à esterilização por meio de filtros de 0,22 μm (Stericup® filter, Merk Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), alíquotado e armazenado a -80 °C até a realização dos ensaios.

Posteriormente, o vírus foi sequenciado e o título do banco de trabalho de CHIKV foi determinado por meio de ensaio de plaque. As alíquotas deste banco de trabalho foram

utilizadas no ensaio de cinética viral e, também, para a construção dos painéis de diluição utilizados para a quantificação e determinação das concentrações virais aplicadas nos ensaios de precisão, exatidão, sensibilidade analítica/limite de detecção e especificidade analítica/seletividade.

5.5 Determinação do título viral

Células Vero foram cultivadas em placas de seis poços na concentração de 6×10^4 células/cm² e mantidas por 24 h como descrito acima. No dia seguinte, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e diluições seriadas de suspensões virais obtidas a partir do banco de trabalho ou dos ensaios de cinética viral foram diluídas em meio de cultura livre de SFB e adicionadas às monocamadas celulares. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% CO₂ por 1h, sob suave agitação de 15-15 min, para a adsorção viral. Após o tempo de incubação, o inóculo foi removido e às monocamadas foi adicionado meio semissólido 199 Earle, contendo 2% de carboximetilcelulose (CMC) e suplementado com 5% SFB inativado, 40 µg/mL de sulfato de gentamicina e 0,4% de anfotericina B, e incubadas em 37 °C com 5% CO₂ por 2 dias. Após o período de incubação, as culturas foram fixadas com 5% de formaldeído por, pelo menos, 2h e, então, coradas com 0,04% de cristal violeta por 30 min para a visualização e contagem dos plaques obtidos.

5.6 Sequenciamento viral e alinhamento

O sequenciamento do CHIKV foi realizado em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), onde uma alíquota do vírus replicado em células Vero foi submetida à análise de sequenciamento genético com o objetivo de verificar a qual linhagem pertence o vírus empregado no estudo. Para isto, a suspensão viral foi submetida à extração do RNA viral e amplificação por meio do ensaio de RT-qPCR. Em posse do produto de PCR, este foi submetido à purificação e, em seguida, à reação de sequenciamento utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing, realizado no sequenciador automático 3500XL Genetic Analyzer (ambos da Thermo Fisher, Waltham, MA USA) e analisado através do software DNASTAR versão 5.05.

Após a análise e obtenção da sequência genética do vírus, esta foi submetida ao alinhamento pelo programa *online* da família *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) na

página do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) entre as sequências de DNA depositadas no banco de dados (GenBank), para identificação da linhagem viral utilizada nos ensaios.

5.7 Cinética de replicação viral

Células Vero foram semeadas em frascos estéreis na concentração de 6×10^4 células/cm² e cultivadas por 24 h em meio de cultura 199 Earle suplementado com 40 µg/mL de sulfato de gentamicina e 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado, ajustado para 4 mM de L-glutamina (todos da Gibco®BRL, Invitrogen, Life Technologies, Paisley, U.K) a 37 °C com 5% CO₂. Após 24 h, as culturas foram inoculadas com CHIKV utilizando MOI de 0,01 em volume reduzido de meio de cultura 199 Earle - 0% de soro fetal bovino durante 1 h com suave agitação para a adsorção viral.

Após o período de adsorção, o inóculo foi cuidadosamente aspirado e substituído por meio de cultura 199 Earle suplementado, conforme descrição acima, apenas com modificação no percentual de SFB, pois para o período de incubação final empregou-se 2% de SFB. Uma das garrafas não foi inoculada servindo como controle. O efeito citopático (CPE) das culturas foi monitorado por meio de microscópio óptico com o intuito de demonstrar a extensão da infecção. Ao longo de 76 h de infecção, amostras do sobrenadante das culturas foram coletadas em sete tempos pós-infecção (4, 21, 28, 45, 52, 69 e 76 horas pós-infecção (h.p.i.)) e armazenadas à -80 °C até o momento de processamento. A quantificação de CHIKV nas amostras de sobrenadante foi realizada por meio de ensaio de plaque e reação da cadeia da polimerase quantitativa.

5.8 Padronização da RT-qPCR para o vírus Chikungunya

5.8.1 Estoques virais

Para realizar a avaliação dos parâmetros exigidos pelo processo de validação da RT-qPCR, além do banco de trabalho de CHIKV, foram preparados bancos de trabalho de diferentes vírus (ZIKV, DENV-1, 2, 3 e 4, YFV, MuV, MeV e RuV) . As alíquotas referentes aos estoques virais foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento de uso. Todos os vírus foram submetidos à titulação e os títulos virais obtidos para cada um deles podem ser observados no quadro 3 (seção 5.3).

5.8.2 Controles de ensaio

5.8.2.1 Controles de extração

Como controle positivo da extração (PEC) foi utilizada uma das alíquotas do painel de concentrações previamente preparado no volume de 200 μL , apresentando 1×10^2 cópias/ μL de concentração final, com o objetivo de verificar a eficiência de extração. Para o controle negativo da extração (NEC), que verifica a presença de contaminação durante a extração de material genético, foi utilizada uma amostra de 200 μL ou 140 μL da matriz pura (sem a adição de CHIKV) utilizada para cada avaliação realizada e de acordo com a metodologia de extração de ácido nucleico empregada.

5.8.2.2 Controle negativo da RT-qPCR

Para a verificação de possível contaminação durante a realização da RT-qPCR, em cada ensaio foi adicionada 5 μL de água livre de nuclease como controle negativo da reação (NTC, do inglês *no template control*), juntamente com a mistura de reagentes.

5.8.3 Extração semiautomática de ácido nucleico (método de partículas magnéticas)

A extração do RNA de CHIKV foi realizada no sistema KingFisher 96/Flex (Thermo Fisher, Waltham, MA USA), o qual foi extraído de 200 μL de cada uma das alíquotas dos painéis de concentrações previamente preparados utilizando o kit comercial de extração MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Applied Biosystems, Hammon, NJ, USA) seguindo as recomendações do fornecedor. O princípio desse método de extração consiste na utilização plataforma automatizada composta por um braço robótico constituído por 96 hastes de ímã que, com o auxílio de partículas (*beads*) magnéticas diluídas na amostra, retêm os ácidos nucleicos nela contidos. Por ser realizada por um equipamento, a extração do RNA viral por essa metodologia se torna muito mais prática e rápida, pois realiza a extração simultânea de várias amostras.

As etapas realizadas pelo equipamento são: coleta, liberação, lavagens e incubação das partículas magnéticas diluídas em cada amostra, seguidas da concentração/eluição do RNA viral, sendo cada uma delas correspondente a uma placa contendo cada um dos reagentes, os quais devem ser previamente aliquotados e/ou preparados, de acordo com as instruções do

fornecedor. Ao todo são utilizadas cinco placas, tendo cada uma delas os poços preenchidos com os seguintes reagentes e colocadas no equipamento na seguinte ordem: 1ª placa – servindo de suporte para a *tip comb*, placa que reveste as hastes de ímã do braço magnético; 2ª placa – 90 µL do tampão de eluição; 3ª placa – 500 µL do tampão de lavagem 2; 4ª placa – 500 µL do tampão de lavagem 1; 5ª placa – 30 µL da mistura das partículas magnéticas (20 µL) com a proteinase K (10 µL). Todas as placas são colocadas no equipamento, com exceção da 5ª placa à qual são adicionados 200 µL de amostra. A placa é vedada com um plástico selante e levada ao agitador por 2 min, à temperatura ambiente, para que as partículas magnéticas se misturem homogeneamente à amostra.

Ao término da agitação, cada poço contendo a mistura de amostra-partículas magnéticas-proteinase K recebe 700 µL da mistura do tampão de lise (350 µL) com o tampão de ligação (350 µL). Após essa adição, a 5ª placa é levada ao equipamento e, seguindo os comandos programados, o processo de extração do RNA viral é iniciado. Todas as etapas, com exceção da alíquotagem, preparo e aplicação dos reagentes nos poços das placas, são realizadas pelo equipamento. Ao término do processo de extração, foi obtido um volume final de 90 µL de RNA viral para cada amostra extraída.

5.8.4 Extração manual de ácido nucleico (método de coluna de sílica)

A extração do RNA de CHIKV foi realizada pelo método manual com o objetivo de comparar seu desempenho com aquele obtido pelo método de extração semiautomática. Para isso, o RNA viral foi extraído de 140 µL de cada uma das alíquotas dos painéis de concentrações previamente preparados, utilizando o kit comercial de extração QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, USA). O princípio desse método de extração consiste, basicamente, nas seguintes etapas: lise da amostra, estabilização e adsorção do RNA viral à membrana da coluna de sílica.

Em um microtubo, foram adicionados 560 µL do tampão de lise seguido de 140 µL da amostra. A mistura foi submetida a agitação por 15 s e incubada por 10 min, a temperatura ambiente. Por apresentar condição desnaturante, o tampão de lise, capaz de inativar RNases, enzimas que degradam RNA, presentes na amostra, garante a integridade do RNA viral. Uma rápida centrifugação da mistura amostra-tampão de lise foi realizada para remover gotas aderidas à tampa do microtubo e a ela foram adicionados 560 µL de etanol (96-100%).

Em seguida, a mistura foi novamente submetida a agitação por 15 s e rapidamente centrifugada. Cuidadosamente, 630 µL dessa mistura foi transferida para uma coluna sustentada por um tubo coletor e, em seguida, a coluna foi submetida à centrifugação (6000 x g ou 8000

rpm por 1 min), sendo os lisados da amostra carregados através dos poros da membrana permeável de sílica da coluna para o tubo coletor, enquanto o RNA viral se manteve ligado à membrana da coluna. O tubo coletor contendo o filtrado foi descartado e a coluna recolocada em um novo tubo. O passo anterior foi repetido com o restante do volume da mistura.

Duas etapas subsequentes de lavagem da amostra foram realizadas com 500 µL de os tampões de lavagem 1 e 2 por meio de centrifugação (6000 x g ou 8000 rpm por 1 min e 20000 x g ou 14000 rpm por 3 min, respectivamente), para a completa remoção das impurezas contidas na amostra. Mais uma vez a coluna foi recolocada em um novo tubo e submetida a uma nova centrifugação (20000 x g ou 14000 rpm por 3 min). Ao término das lavagens, o tubo coletor contendo o filtrado foi descartado, a coluna foi transferida para um novo microtubo e nela adicionados 60 µL de tampão de eluição. Por fim, essa foi incubada por 1 min a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugada (6000 x g ou 8000 rpm por 1 min) para a obtenção do RNA viral puro contido na amostra. Todas as etapas dessa metodologia foram realizadas para cada uma das amostras analisadas seguindo as recomendações do fornecedor.

5.8.5 Diluição seriada do vírus Chikungunya

De posse do título viral de CHIKV do estoque viral foram feitas diluições seriadas do vírus em amostra de soro humano negativo (SigmaAldrich, Darmstadt, Germany), meio de cultura 199 Earle suplementado e não suplementado, e PBS para a obtenção dos painéis utilizados para avaliar os parâmetros de precisão, exatidão e sensibilidade analítica/limite de detecção. A partir de uma alíquota do estoque viral foram realizadas duas diluições seriadas distintas em cada uma das matrizes citadas para a composição dos painéis dos parâmetros citados.

O painel dedicado à avaliação dos parâmetros de precisão e exatidão constituído por amostras de soro humano inoculados com CHIKV, diluídas em série em fator 10, continha as concentrações 1×10^5 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 , 1×10^2 cópias/uL, e os painéis constituídos por meio de cultura 199 Earle suplementado e por PBS inoculados com CHIKV, também diluídos seriadamente em fator 10, continham as concentrações 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 cópias/uL.

Para a avaliação em matriz soro humano negativo (SigmaAldrich, Darmstadt, Germany), foi realizada uma diluição ajustada 1:5 do CHIKV nessa matriz para posterior geração dos painéis de diluições seriadas empregados nos diversos ensaios realizados. Para a constituição dos painéis de diluições seriadas empregando as matrizes meio de cultura 199 Earle

suplementado (conforme descrito na seção 5.4) e tampão fosfato (PBS), o vírus não foi previamente diluído.

Já o painel referente à avaliação da sensibilidade analítica/limite de detecção foi composto por seis níveis compreendendo a faixa de concentração de 3,125 a 100 cópias/uL. As alíquotas de ambos os painéis foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento de uso. Na data dedicada aos respectivos ensaios, estes painéis foram extraídos e quantificados por RT-qPCR para a avaliação do desempenho do método.

5.8.6 Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR)

Para os ensaios de RT-qPCR foi utilizado o kit PCR 1x *TaqMan*® Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Hammonon, NJ, USA). O volume total da mistura reacional foi de 20 µL, sendo constituída de 1 µL de cada *primer* (500 nM/reacção de cada, senso e anti-senso), 0,5 µL de sonda (250 nM/reacção), 5 µL de *TaqMan*® Fast Virus 1-Step Master Mix, 7,5 µL de água livre de nucleases e 5 µL da amostra. As condições de ciclagem térmica estão descritas no quadro 4. Os ensaios foram realizados em equipamentos do sistema PCR Real Time 7500, previamente qualificados, e os dados obtidos foram analisados por meio do software 7500 System SDS 21 CFR Part 11 Module (ambos da Applied Biosystems, Hammonon, NJ, USA).

Para os ensaios de quantificação viral de amostras obtidas dos sobrenadantes das culturas, o RNA viral foi purificado a partir de 200 µL. Cada alíquota foi quantificada em duplicata e os resultados foram alcançados levando em consideração o fator de diluição das amostras. As concentrações desconhecidas das amostras foram calculadas com base no sinal fluorescente da curva padrão.

Quadro 4 – Etapas da ciclagem térmica da RT-qPCR para CHIKV com seus respectivos tempos e temperaturas.

Ciclagem térmica			
Temperatura	Nº de ciclos	Tempo	Etapa
50 °C	1	5 minutos	Transcrição reversa
95 °C	1	20 segundos	Desnaturação
95 °C	40	3 segundos	Amplificação
60 °C		33 segundos	

Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

5.8.6.1 Critérios de aceitação do ensaio

Com base em experiências obtidas de ensaios previamente realizados no laboratório, os parâmetros e valores aceitáveis dos ensaios levados em consideração para sua validade estão demonstrados no quadro 5.

Quadro 5 – Critérios de aceitação dos ensaios de RT-qPCR.

Parâmetro	Valores/Condição
r (Coeficiente de correlação)	$\geq 0,990^1$
R^2 (Coeficiente de determinação)	$\geq 0,990^1$
<i>Slope</i> (Coeficiente angular)	-3,6 a -3,1 ²
<i>Intercept</i> (Coeficiente linear)	$\leq 40,0^2$
NTC	Não detectado
NEC	Não detectado
PEC	Valor de C_q detectável
<i>Threshold</i>	0,01 ³
<i>Baseline</i>	Automático

NTC, *non template control* (controle negativo da RT-qPCR); NEC, *negative extraction control* (controle negativo de extração); PEC, *positive extraction control* (controle positivo de extração); C_q , *quantification cycle*. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

5.8.6.2 Curva padrão

Para a quantificação das amostras, foi construída uma curva padrão a partir da sequência gênica da nsP1 (Quadro 6) em um plasmídeo comercial recombinante (pIDTSMART-AMP) contendo 2163 pares de base (pb), o qual foi transformado em bactérias *Escherichia coli* e, em seguida, purificado e quantificado.

¹ Mais rigoroso do que o critério definido de acordo com o *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetic and Veterinary Products* (FDA, 2019).

² Critério definido de acordo com o *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetic and Veterinary Products* (FDA, 2019).

³ Valor estabelecido com base na melhor adequação da curva padrão empregada nos ensaios.

Quadro 6 – Sequência gênica do inserto da proteína nsP1 de Chikungunya inserido no plasmídeo utilizado na curva padrão da RT-qPCR.

Tamanho (pb)	Inserto da nsP1
168	5'- GCT ACT TAA GAG CTG GCA CTT ACC ATC GGT GTT CCA TCT AAA GGG CAA ACT CAG CTT CAC ATG CCG CTG TGA TAC AGT GGT TTC GTG CGA GGG CTA CGT CGT TAA GAG AAT AAC GAT GAG CCC AGG CCT TTA TGG AAA AAC CAC AGG GTA TGC GGT AAC CCA CCA CGC -3'

Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

A etapa de purificação da curva padrão foi realizada pelo Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER). Para isto, foi utilizado o kit de Maxiprep *Plasmid Maxi Kits* (Qiagen®, Hilden, Germany) e, então, o DNA plasmidial purificado foi submetido à quantificação por meio de fluorescência medida pelo equipamento Qubit e de absorvância utilizando o equipamento Nanodrop (ambos da Thermo Fisher, Waltham, MA USA). Com base na quantificação da Maxiprep, foi possível calcular a concentração de DNA plasmidial obtida por cada um dos métodos aplicando a seguinte equação com base na constante de Avogadro:

$$\text{Concentração de DNA plasmidial} = \frac{\text{Quantificação da Maxiprep (ng/}\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}}{\text{Tamanho do clone} \times 660}$$

Onde: $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ é a constante de Avogadro; *tamanho do clone* corresponde ao número de pares de bases do plasmídeo submetido a transformação; e *660* é a massa molecular correspondente a 1 par de base.

A partir dos valores obtidos pelo cálculo da concentração de DNA plasmidial foram realizadas diluições seriadas de 1:100 no coprecipitante *Yeast tRNA* (Ambion, 10 mg/mL) para a obtenção de alíquotas nas concentrações entre 10^7 e 10^2 cópias/ μL de RNA viral.

Duas curvas em duplicata para cada um dos métodos de quantificação foram submetidas à reação de RT-qPCR com o objetivo de avaliar o desempenho das diluições seriadas realizadas e a curva que melhor se adequou aos critérios de aceitação do ensaio, como pode ser visto na seção 5.7.6.1, foi utilizada em todos os ensaios de RT-qPCR realizados neste trabalho. As alíquotas referentes à curva padrão foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento de uso.

Além disso, a curva padrão foi utilizada para o estudo de validação da técnica de RT-qPCR, da qual foram avaliados os parâmetros de eficiência de amplificação, a faixa linear e seus limites, e o seu limite de quantificação.

5.8.6.3 Sondas e *primers*

A sonda foi diluída em água ultrapura DNase/RNase Free (Ambion) para a obtenção de uma solução estoque na concentração de 100 μM (100 pmol/ μL) para, então, ser realizada a solução de trabalho. Para isso, a solução estoque foi diluída em fator 10, também em água ultrapura DNase/RNase Free (Ambion), na concentração de 10 μM (10 pmol/ μL). A concentração final da sonda da mistura reacional foi de 250 nM.

Para alcançar a concentração de 100 μM , os *primers* foram ressuspensos em água ultrapura DNase/RNase Free (Ambion) e, a partir desta, foi preparada a solução de trabalho na concentração de 10 μM . A concentração final dos *primers* da mistura reacional foi de 500 nM. As informações sobre os *primers* utilizados para a amplificação do genoma do CHIKV, descritos por LANCIOTTI et al., 2007, podem ser verificados no quadro 7.

Quadro 7 – Sequência de *primers* utilizados na RT-qPCR de CHIKV

Sequência de <i>primers</i>		Fluoróforo	Tamanho (pb)
Senso	5'-AAA GGG CAA RCT YAG CTT CAC-3'	N/A	21
Anti-senso	5'-GCC TGG GCT CAT CGT TAT TC- 3'	N/A	20
Sonda	5'-FAM- CGC TGT GAY ACA GTG GTT TT-3'	5'FAM-3'BHQ	20

Fonte: LANCIOTTI et al., 2007

5.9 Validação da metodologia de RT-qPCR

Os parâmetros analíticos empregados no estudo de validação da metodologia de RT-qPCR basearam-se nos critérios exigidos pela RDC nº 27 da ANVISA, regulamentação vigente no Brasil acerca de validação de métodos bioanalíticos (ANVISA, 2012). Entretanto, alguns parâmetros específicos e complementares foram realizados para os ensaios de PCR que, por ser um método molecular, apresenta características particulares que devem ser avaliadas. Então, os parâmetros analisados no estudo foram: (i) eficiência de extração; (ii) curva de calibração, eficiência de amplificação, faixa linear, limites de quantificação (LQ); (iii) precisão; (iv) exatidão; (v) sensibilidade analítica/limite de detecção (LD); e (vi) especificidade analítica/seletividade.

O parâmetro de robustez não foi avaliado para este estudo, pois as possíveis fontes de variação e a determinação das condições otimizadas para a realização das análises foram

previamente discutidas e estudadas nas etapas iniciais do desenvolvimento do ensaio pelo laboratório.

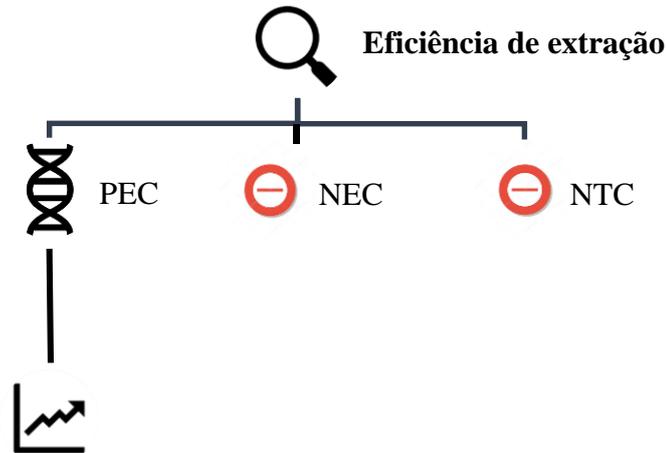
A análise de desempenho analítico foi realizada por três diferentes analistas (A, B e C), em dias diferentes, contemplando nove ensaios ao todo. Os cálculos e estatísticas dos dados obtidos foram realizados pelo Setor de Validação Analítica (SEVAN – Bio-Manguinhos) do Laboratório de Metrologia e Validação (LAMEV – Bio-Manguinhos) utilizando os softwares Microsoft® Office 365 Excel e R Studio® versão 1.2.5033.

5.9.1 Eficiência de extração

Com o objetivo de monitorar a adequabilidade e reprodutibilidade da etapa de extração do RNA viral foi realizada a avaliação da eficiência de extração, para a qual foram considerados os resultados obtidos para os controles da extração positivo e negativo (PEC e NEC, respectivamente) e para o controle negativo da reação (NTC) realizados em todos os ensaios ao longo do processo de validação. Sendo assim, foram avaliados os resultados de C_q dos controles de extração (PEC e NEC), testados em todas as placas processadas ao longo de todo o processo.

O desempenho do método de extração foi avaliado de acordo com sua capacidade em atender aos critérios de aceitação do ensaio (Quadro 5), avaliados pela capacidade de não amplificar as amostras de NEC e NTC, e de amplificar as amostras de PEC (Figura 7). A não amplificação dos controles negativos de extração e reação, NEC e NTC, respectivamente, comprovarão a não ocorrência de contaminações cruzadas durante as etapas realização dos ensaios. Os limites para aceitação e verificação da estabilidade do controle de qualidade da etapa de extração foram baseados nos resultados experimentais obtidos de PEC.

Figura 7 – Esquema da etapa de eficiência de extração da RT-qPCR



PEC, *positive extraction control* (controle positivo de extração); NEC, *negative extraction control* (controle negativo de extração); NTC, *non template control* (controle negativo da RT-qPCR). Fonte: SEVAN – Bio-Mnguinhos

5.9.2 Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear

A verificação da adequabilidade de uma curva de calibração, conforme determinada faixa de concentração viral, permite a determinação de parâmetros necessários ao estabelecimento do método, os quais correspondem à eficiência média de amplificação, à faixa linear de análise, aos limites inferior (LI) e superior (LS) de linearidade e o limite de quantificação (LQ). Então, com este propósito, foram analisadas as 12 curvas plasmidiais processadas ao longo dos ensaios de validação, compreendendo a faixa de concentração viral de $\text{Log } 10^7$ a 10^2 , respeitando o fator de diluição 10 (Figura 8).

Com o intuito de verificar a correlação dos valores de C_q obtidos para cada concentração viral em função das concentrações nominais da curva de calibração foi realizada a análise de regressão linear simples por meio da aplicação da seguinte função de regressão linear:

$$y = kx + c$$

Sendo: y o valor de C_q obtido, k o coeficiente angular ou *slope*, x a concentração/quantidade de alvos identificados na reação, na forma de $\text{Log}_{10}[\text{concentração } (x)]$, e c o coeficiente linear ou *intercept* da reta de regressão.

Deste modo, foram avaliados os coeficientes angular (*slope*) e linear (*intercept*) e os coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2), parâmetros obtidos a partir da aplicação da função de regressão linear da curva, para cada uma das curvas processadas e também para o compilado de curvas obtidas no processo de validação.

As curvas de calibração que atenderam aos critérios de aceitação do ensaio, demonstrados no quadro 5, foram consideradas em conformidade. Além disso, o compilado de curvas deveria apresentar desvio padrão (DP) menor ou igual a 25% em relação à concentração plasmidial nominal para todos os pontos da curva (FDA, 2019). Com base nos valores obtidos foi possível estimar a eficiência de amplificação do método.

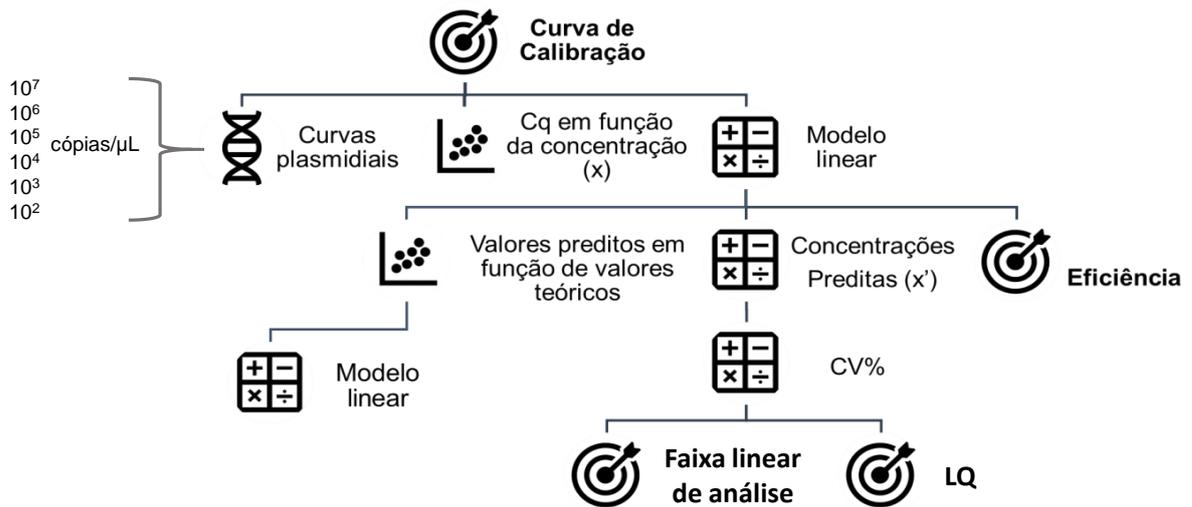
A eficiência de amplificação avaliou a capacidade do método em efetuar a amplificação dos produtos da PCR, sendo levado em consideração o valor do coeficiente angular (*slope*) obtido a partir da regressão das 12 curvas analisadas por meio da aplicação da equação de eficiência descrita abaixo, onde **E** corresponde à eficiência de extração e **k**, ao *slope*:

$$E = 10^{(-\frac{1}{k})} - 1$$

Sendo assim, a eficiência de amplificação de cada curva analisada foi considerada em conformidade caso apresentasse valores compreendidos no intervalo entre 90% e 110% (FDA, 2019).

A faixa linear, definida como o intervalo que capaz de apresentar precisão, exatidão e especificidade aceitáveis, levou em consideração como limites inferior (LI) e superior (LS) de linearidade os valores ajustados das concentrações preditas com base na substituição dos valores de C_q obtidos na função de regressão linear. Os valores de C_q ajustados foram, então, correlacionados com os valores nominais da curva de calibração por meio da aplicação do modelo de regressão linear simples. Também foram avaliados os coeficientes de variação (CV%) para cada um dos níveis de concentração da curva e, conseqüentemente, a determinação do limite de quantificação (LQ) do método (conforme descrito na seção 5.8.2).

Figura 8 – Esquema das etapas de curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear da RT-qPCR



C_q , *quantification cycle*; CV%, coeficiente de variação. Fonte: Modificado de SEVAN – Bio-Manguinhos

5.9.3 Precisão

O parâmetro de precisão de um ensaio avalia a variabilidade de erros aleatórios em um determinado intervalo de concentrações. Logo, este foi avaliado com base na variabilidade do método aplicado, sendo consideradas influências de variabilidade em reações individuais (repetibilidade) e entre reações realizadas em dias distintos e por analistas diferentes (precisão intermediária), através da análise de painéis de diluição. Esses painéis foram constituídos por diluições seriadas de fator 10, contendo cinco concentrações decrescentes de CHIKV, nas concentrações 1×10^5 , 1×10^4 , 5×10^3 , 1×10^3 e 1×10^2 cópias/ μL diluídas em soro humano negativo com o objetivo de simular diferentes níveis de cargas virais de amostras clínicas e em meio de cultura 199 Earle suplementado, não suplementado ou PBS, nas concentrações 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 e 1×10^2 cópias/ μL com o objetivo de simular diferentes níveis de produção viral. Então, foram analisadas oito réplicas para cada nível de concentração viral, totalizando 24 réplicas cada, em ensaios realizados por três analistas em três dias diferentes. Os resultados obtidos a partir dos painéis de diluição foram utilizados para realizar as devidas análises de precisão e exatidão do método estudado (Figura 9).

A precisão do método foi avaliada por meio da análise de variâncias (ANOVA) de fator único, da qual foram obtidos os coeficientes de variação (CV%) de repetibilidade e de precisão intermediária para cada um dos valores de concentração viral obtidos. A adequabilidade da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foi determinada quando obtido CV% menor

ou igual a 25% em relação à concentração nominal para todos os níveis de concentrações virais aplicados (FDA, 2019).

5.9.4 Exatidão

O parâmetro de exatidão dos ensaios baseia-se na habilidade do método em quantificar o número real de cópias virais presentes numa amostra em comparação com a concentração teórica de moléculas alvo determinadas por uma amostra de referência. Por conta de ainda não haver materiais de referência devidamente certificados para utilização em ensaios de qPCR para CHIKV, as referências utilizadas para esta avaliação corresponderam aos resultados obtidos dos painéis de amostras de soro humano e meio de cultura 199 Earle suplementado ou PBS inoculados com CHIKV, também utilizados nas análises de precisão, as quais foram submetidas à extração do RNA viral e à quantificação por RT-qPCR. Desta forma, foram analisadas oito réplicas para cada nível de concentração viral, totalizando 24 réplicas cada, em ensaios realizados por três analistas em três dias diferentes (Figura 9).

Sendo assim, foram calculadas as recuperações percentuais para cada uma das concentrações em comparação com os valores teóricos das concentrações das amostras de soro humano, meio de cultura 199 Earle suplementado ou PBS inoculadas com CHIKV conforme a equação abaixo:

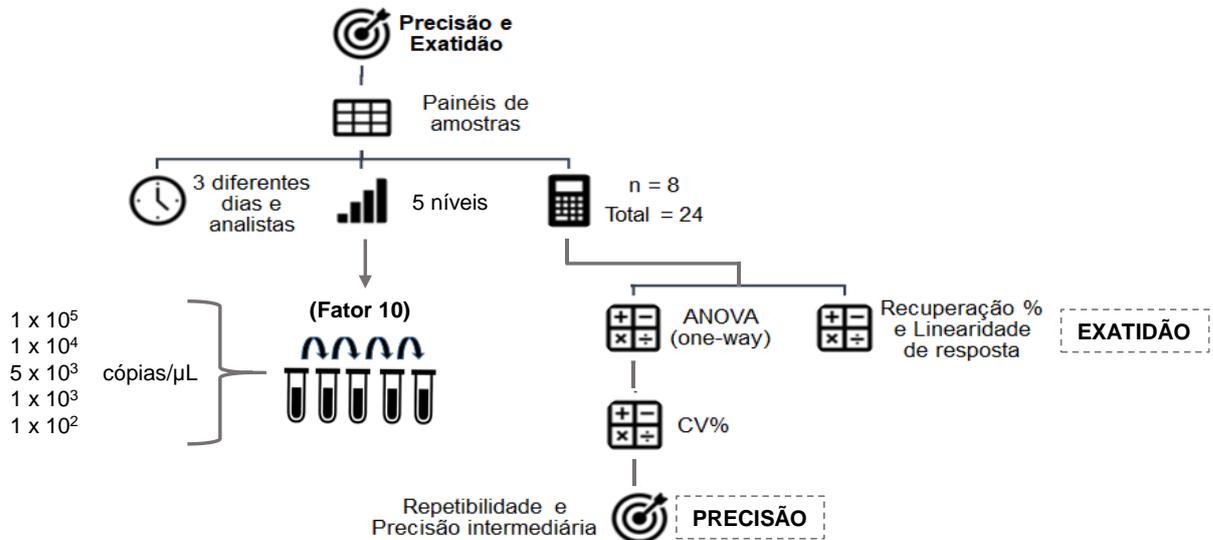
$$\text{Recuperação \%} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

O desempenho do método quanto ao parâmetro de exatidão foi baseado nas recuperações percentuais médias obtidas, sendo considerado em conformidade quando todos os níveis de concentração aplicados apresentassem recuperação percentual média compreendida na faixa entre 75% e 125% em relação à concentração nominal para todos os níveis de concentrações virais (FDA, 2019).

Além disso, foi realizada a avaliação da linearidade de resposta, por meio de análise gráfica e da aplicação do modelo de regressão linear, o que permitiu a correlação dos resultados obtidos em função dos valores nominais das concentrações virais, com base no coeficiente de correlação (r), conforme o respectivo critério de aceitação do ensaio descrito no quadro 5. Além

disso, foram considerados os coeficientes da nova curva ajustada e seu respectivo coeficiente de correlação (r).

Figura 9 – Esquema das etapas de precisão e exatidão da RT-qPCR



CV%, coeficiente de variação. Fonte: Modificado de SEVAN – Bio-Manguinhos

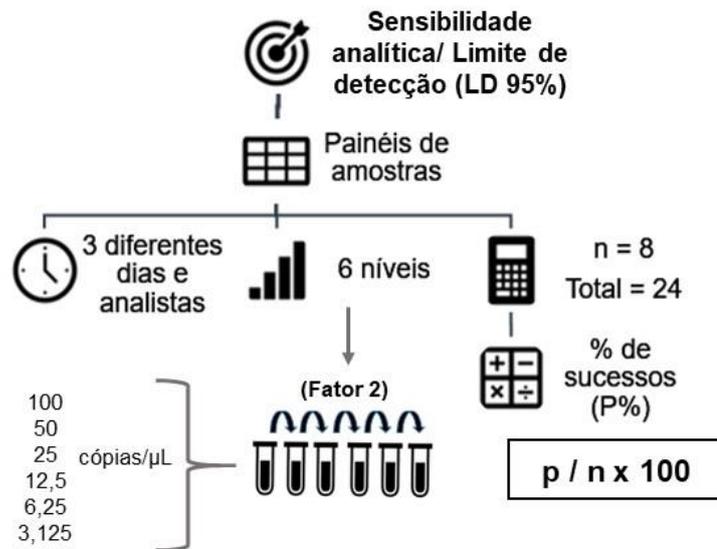
5.9.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi estimado como o menor ponto de concentração teórica de ácido nucleico alvo quantificado que atenda aos parâmetros de precisão e exatidão aceitáveis para o ensaio e apresente coeficiente de variação (CV%) menor que 25% (KRALIK; RICCHI, 2017) (Figura 8).

5.9.6 Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD 95%)

A sensibilidade analítica/limite de detecção (LD) dos ensaios foi realizada por três analistas em três dias diferentes, sendo avaliado com base em painéis de soro humano negativo inoculados com CHIKV e seriadamente diluídos em seis concentrações decrescentes (diluição 1:2), compreendendo a faixa de concentração viral de 100 a 3,125 cópias/ μL (Quadro 8). Cada painel foi composto por oito réplicas para cada um dos níveis de concentração viral pré-estabelecidos, totalizando 24 réplicas para cada. O parâmetro foi estimado como a menor concentração de ácido nucleico alvo apresentando resultados detectáveis em, pelo menos, 95% das amostras testadas (LD 95%) (FDA, 2019) (Figura 10).

Figura 10 – Esquema da etapa de sensibilidade analítica/limite de detecção (LD) da RT-qPCR



LD, limite de detecção; P%, percentual de sucessos; p, número de réplicas detectadas; n, número de réplicas testadas. Fonte: Modificado de SEVAN – Bio-Manguinhos

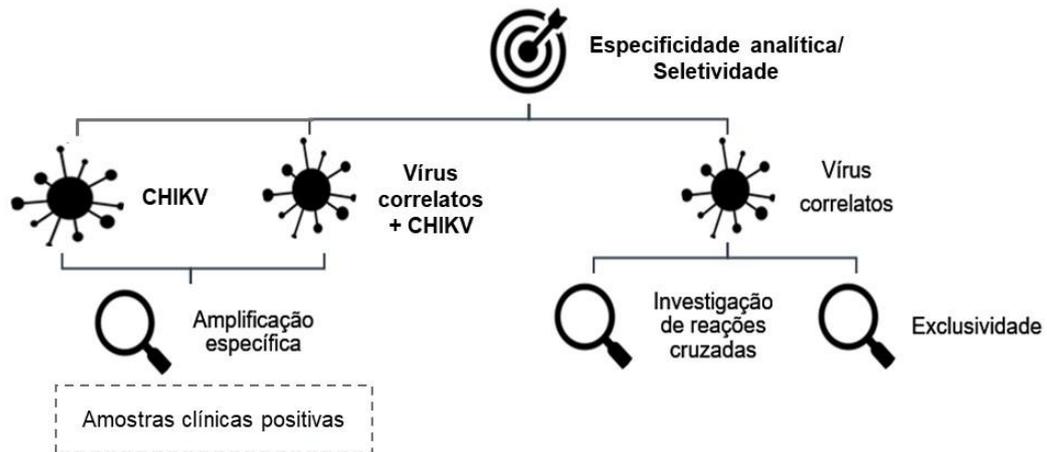
Quadro 8 – Faixas de concentrações e número de réplicas analisadas para LD 95%

Cópias do genoma (cópias/μL)	Nº de réplicas testadas por RT-qPCR			
	Dia 1 Operador 1	Dia 2 Operador 2	Dia 3 Operador 3	Total
100	8	8	8	24
50	8	8	8	24
25	8	8	8	24
12,5	8	8	8	24
6,25	8	8	8	24
3,125	8	8	8	24

Faixas de concentrações e número de réplicas analisadas para a estimativa do parâmetro de sensibilidade analítica/limite de detecção 95%. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

5.9.7 Especificidade analítica ou Seletividade

A análise da especificidade analítica/seletividade foi realizada por meio da detecção inequívoca/exclusiva do RNA dos vírus Chikungunya (CHIKV), Sarampo (MeV), Caxumba (MuV), Rubéola (RuV), Febre Amarela (YFV), Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4), Zika (ZIKV) em amostras individuais e em *pools* virais, obtidos dos bancos de trabalho da plataforma de produção viral do laboratório (Figura 11). Todas as amostras foram extraídas e tiveram o RNA viral quantificado, em triplicatas, como pode ser observado na figura 12, que ilustra a disposição das amostras na placa de reação utilizadas na RT-qPCR.

Figura 11 – Esquema da etapa de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR

CHIKV, vírus Chikungunya. Fonte: Modificado de SEVAN – Bio-Manguinhos

Figura 12 – Desenho de placa para a etapa de especificidade analítica/seletividade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁴	Curva 10 ⁴	Curva 10 ³	Curva 10 ³	Curva 10 ²	Curva 10 ²
B	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁴	Curva 10 ⁴	Curva 10 ³	Curva 10 ³	Curva 10 ²	Curva 10 ²
C	CHIKV	CHIKV	CHIKV	MuV	MuV	MuV	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
D	DENV 1	DENV 1	DENV 1	RuV	RuV	RuV	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
E	DENV 2	DENV 2	DENV 2	ZIKV	ZIKV	ZIKV	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
F	DENV 3	DENV 3	DENV 3	YFV	YFV	YFV	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
G	DENV 4	DENV 4	DENV 4	MeV	MeV	MeV	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	NTC	NTC
H	Pool viral	Pool viral	Pool viral	Poço vazio	PEC	NEC						

CHIKV, vírus Chikungunya; MuV, vírus da Caxumba; DENV, vírus da Dengue; RuV, vírus da Rubéola; ZIKV, vírus Zika; YFV, vírus da Febre Amarela; MeV, vírus do Sarampo; NTC, *non template control* (controle negativo da RT-qPCR); NEC, *negative extraction control* (controle negativo de extração); PEC, *positive extraction control* (controle positivo de extração). Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

A fim de avaliar se o método é capaz de detectar o alvo viral de interesse e de avaliar o desempenho da etapa de extração de RNA, em uma outra placa de reação, 30 amostras positivas de CHIKV, cedidas pelo Laboratório de Flavivírus/Instituto Oswaldo Cruz, foram submetidas à etapa de extração de ácidos nucleicos e à reação de RT-qPCR, em duplicata, como observado na figura 13 que ilustra o desenho da placa de reação.

Figura 13 – Desenho de placa das amostras clínicas para a etapa de especificidade analítica/seletividade

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁷	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁶	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁵	Curva 10 ⁴	Curva 10 ⁴	Curva 10 ³	Curva 10 ³	Curva 10 ²	Curva 10 ²
B	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12
C	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10	Amostra 11	Amostra 12
D	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 21	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 24
E	Amostra 13	Amostra 14	Amostra 15	Amostra 16	Amostra 17	Amostra 18	Amostra 19	Amostra 20	Amostra 21	Amostra 22	Amostra 23	Amostra 24
F	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 30	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
G	Amostra 25	Amostra 26	Amostra 27	Amostra 28	Amostra 29	Amostra 30	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio
H	<i>Pool</i> viral	<i>Pool</i> viral	<i>Pool</i> viral	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	NTC	PEC	NEC

NTC, *non template control* (controle negativo da RT-qPCR); NEC, *negative extraction control* (controle negativo de extração); PEC, *positive extraction control* (controle positivo de extração). Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

A especificidade analítica/seletividade foi avaliada de acordo com sua capacidade em atender aos critérios de aceitação do ensaio (Quadro 5), avaliados pela não amplificação do NEC, do NTC e das amostras de vírus correlatos, demonstrando que não houve contaminação cruzada durante o ensaio, e pela amplificação do PEC e das amostras individuais de CHIKV, demonstrando a capacidade do método em detectar o alvo correto.

5.9.8 Controle de qualidade da RT-qPCR

A curva padrão empregada nos ensaios da etapa de validação da RT-qPCR teve os resultados dos parâmetros críticos (*slope*, *intercept* e R^2) e dos C_q monitorados por meio de gráficos controle com o objetivo de averiguar a qualidade das análises realizadas e garantir, a longo prazo, a manutenção de valores aceitáveis de acordo com os limites pré-estabelecidos para a metodologia, como podem ser verificados na seção 5.7.6.1. Além disso, também foi feito o acompanhamento dos valores das amostras de PEC de cada um dos ensaios.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar alguns aspectos do processo de replicação do CHIKV em células Vero, bem como determinar uma comparação da capacidade quantitativa entre os ensaios de plaque e de RT-qPCR. Sendo assim, foi realizada uma cinética de replicação viral para avaliar o pico da replicação, possibilitando o estabelecimento de um tempo ótimo para a coleta de um *pool* viral contendo uma alta carga de vírus infecciosos. As culturas foram monitoradas ao longo de toda a cinética e a avaliação do momento ótimo para a coleta viral foi determinada por meio da comparação da quantificação viral obtida entre as técnicas de ensaio de plaque e RT-qPCR. Para isso, a metodologia de RT-qPCR foi submetida à padronização e à validação, onde diferentes parâmetros essenciais à geração de resultados confiáveis foram aplicados e analisados de acordo com critérios estabelecidos pelas agências regulamentadoras nacionais e internacionais.

6.1 Produção e determinação do título do banco de trabalho do vírus Chikungunya

Após realizada a propagação do vírus, o título viral do banco de trabalho de CHIKV foi determinado por meio de ensaio de plaque para a construção de um banco de trabalho, do qual foi obtido o título de 7,89 Log₁₀ PFU ou 7,76 x 10⁷ PFU/mL. A produção de um banco viral permite a manutenção da homogeneidade nos resultados obtidos nos ensaios, já que as amostras virais utilizadas apresentam o mesmo título, reduzindo possíveis os erros relacionados à quantidade de vírus inoculado nas culturas.

6.2 Sequenciamento viral e alinhamento

Após as etapas de extração do RNA viral, amplificação por RT-qPCR, purificação, reação de sequenciamento e alinhamento no BLAST, a análise do sequenciamento genético do CHIKV revelou que 99% da sequência gênica do vírus apresentou 99,97% de similaridade com as cepas encontradas no GenBank pelos códigos de acesso KP164568.1 e KP164569.1 (Figura 14), as quais pertencem à linhagem ECSA, conforme descrito por NUNES e colaboradores (2015).

Figura 14 – Alinhamento da sequência gênica do vírus Chikungunya

Dados obtidos a partir do alinhamento do vírus Chikungunya utilizado nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya. Fonte: BLASTN NCBI.

6.3 Cinética de replicação viral

Com o objetivo de acompanhar o processo de infecção viral por CHIKV, avaliar seu perfil replicativo em células Vero e verificar o potencial da metodologia de RT-qPCR para detecção de material genético viral em comparação e/ou substituição aos ensaios baseados em cultivo celular, como o ensaio de plaque, foi estabelecida a comparação da quantificação de partículas infecciosas e do genoma viral de CHIKV entre as técnicas de ensaio de plaque e de RT-qPCR, respectivamente.

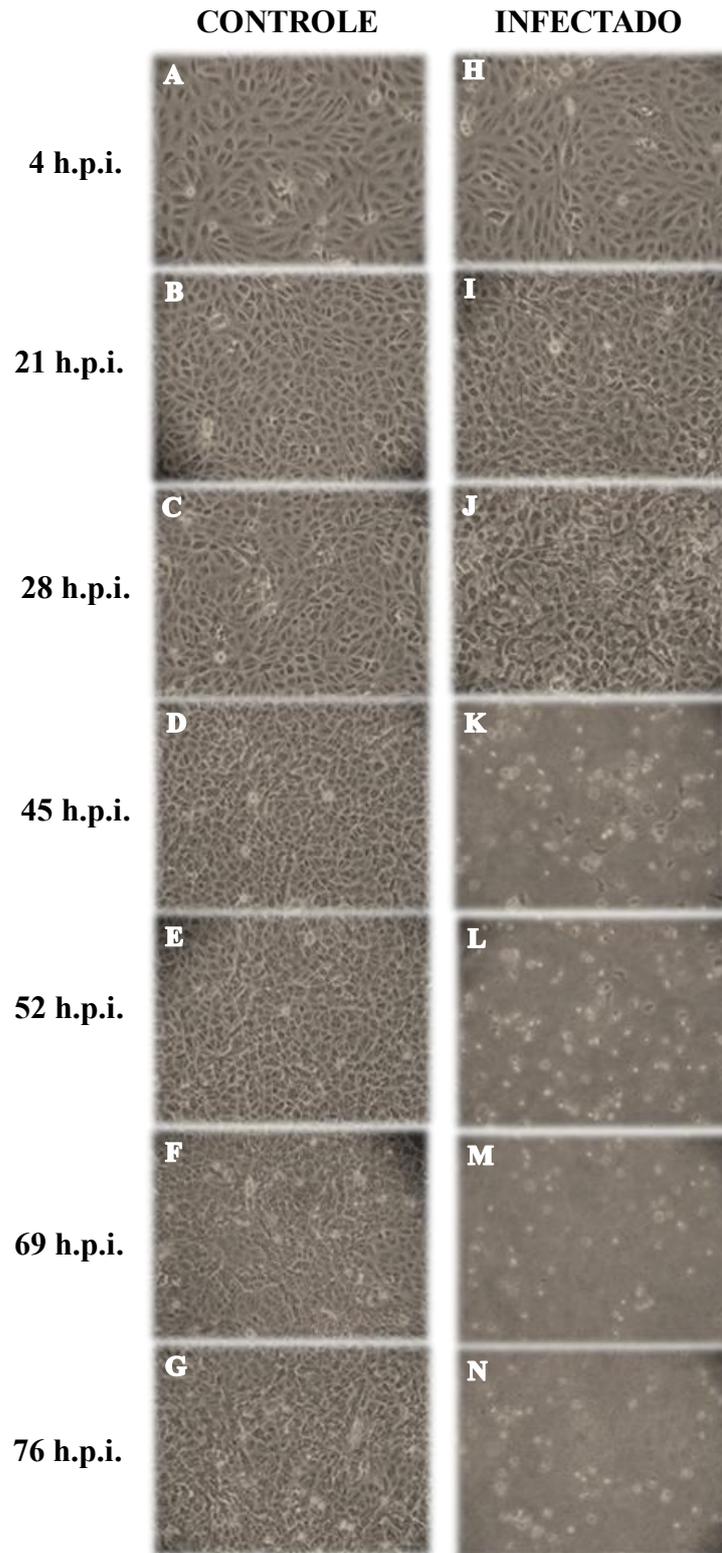
Sendo assim, nesse estudo, células Vero foram inoculadas com CHIKV utilizando MOI de 0,01 e o sobrenadante das culturas foram coletadas em sete tempos pós-infecção (4, 21, 28, 45, 52, 69 e 76 h.p.i.). Ao longo de toda a cinética as culturas celulares foram monitoradas para a verificação de efeitos citopáticos (CPE) em cada um dos tempos analisados.

Amplamente demonstrada como uma linhagem celular bem estabelecida e com elevado potencial às infecções virais, as células Vero apresentam um elevado percentual de células infectadas por CHIKV em um curto período de tempo, de acordo com o MOI empregado e com a cepa viral utilizada (HUSSAIN et al., 2016; SOURISSEAU et al., 2007). A habilidade de CHIKV em induzir rápido CPE nesta linhagem celular, em comparação à infecção por outros vírus, auxilia na compreensão de sua virulência e de seu ciclo viral (AN et al., 2017). A cinética viral realizada permitiu a observação de uma massiva infecção por CHIKV resultando em uma alta carga viral em um curto período de tempo e a partir do emprego de um baixo MOI.

O monitoramento das culturas permitiu a observação de uma significativa mudança morfológica nas culturas infectadas em comparação às culturas controle (não infectadas), como demonstrado na figura 15. No tempo de 28 h.p.i., as células das culturas infectadas apresentaram uma tendência de arredondamento, característica indicativa de CPE. Apesar dessa observação, as monocamadas ainda se apresentavam confluentes (Figura 15J). Com o avanço da cinética viral, a partir de 45 h.p.i. as culturas já apresentaram poucas células aderidas à superfície das garrafas, muitas células arredondadas e debris celulares em seus sobrenadantes como consequência do intenso processo de infecção viral, desencadeado pelo completo destacamento das células da superfície das garrafas de cultivo (Figura 15H-N).

A intensidade de CPE varia de acordo com a linhagem celular utilizada para a infecção e com a origem da linhagem. Os resultados aqui apresentados corroboram com os resultados de Li e colaboradores (2013), onde é demonstrado que células Vero apresentam intenso CPE durante a infecção por CHIKV e destaca como uma das razões sugestiva para o intenso CPE o processo de apoptose celular (LI et al., 2013). Por outro lado, linhagens celulares de artrópodes, como C6/36 e Lulo, respectivamente, apresentaram moderado ou indistinto CPE quando infectadas com CHIKV (GUERRERO; BELLO, 2019).

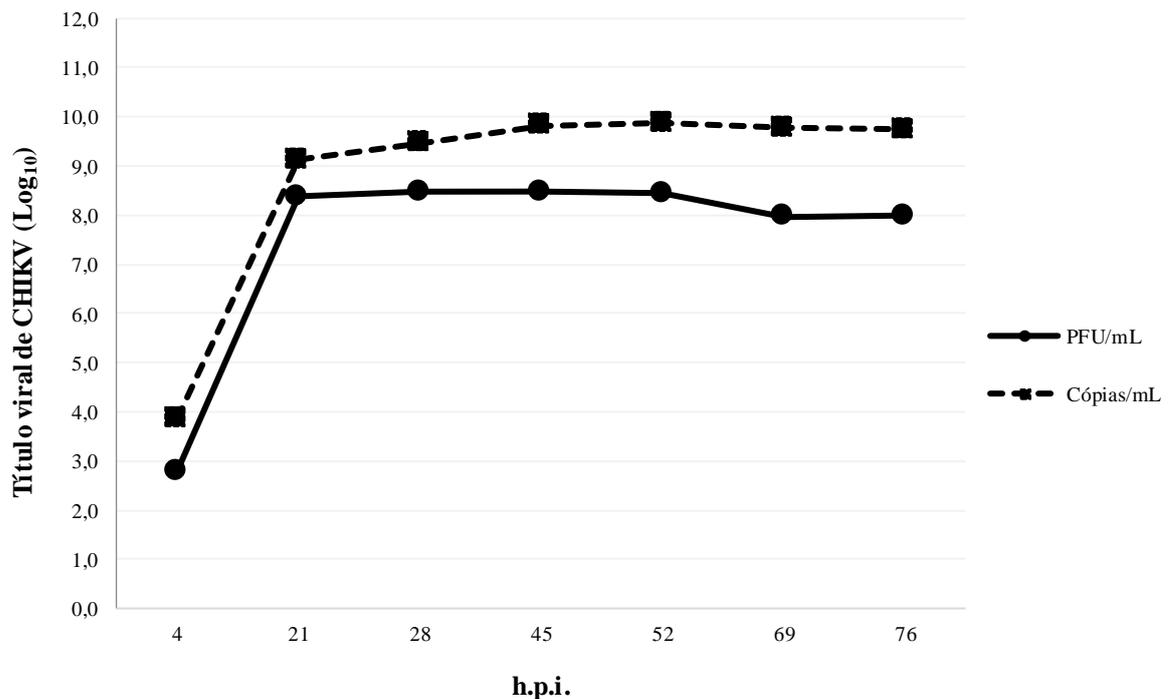
Figura 15 – Culturas de células Vero monitoradas ao longo da cinética de replicação do vírus Chikungunya



Células Vero foram infectadas com vírus Chikungunya empregando MOI de 0,01 e monitoradas por meio de microscópio óptico até 76 h.p.i. Nos tempos indicados, o sobrenadante das culturas controle (A-G) e infectadas (H-N) foram coletados para a realização de ensaio de plaque e RT-qPCR. A partir de 28 h.p.i., as culturas infectadas (H-N) indicaram o início de CPE, o qual se demonstrou intenso já em 45 h.p.i., apresentando células arredondadas no sobrenadante das culturas, assim como a presença de debris celulares e poucas células aderidas à superfície das garrafas de cultivo. Fonte: Própria autoria.

Os resultados obtidos através das titulações dos sobrenadantes das culturas inoculadas com CHIKV realizadas por ensaio de plaque e por RT-qPCR, revelaram um perfil replicativo similar, demonstrando um significativo aumento do número de PFU/mL e cópias/mL entre 4 e 21 h.p.i. (Gráfico 1). Por meio do ensaio de plaque, nos tempos de 28 e 45 h.p.i. foi observada uma replicação viral ótima, sendo obtido título viral máximo de 8,48 Log₁₀ PFU/mL, apresentando um decréscimo a partir de 52 h.p.i., como observado no gráfico 1. Enquanto isso, o ensaio de RT-qPCR revelou o maior título viral em 52 h.p.i. com 9,88 Log₁₀ cópias virais/mL, seguido de uma redução nos tempos posteriormente analisados.

Gráfico 1 – Perfil de replicação de vírus Chikungunya em células Vero



Células Vero foram infectadas com vírus Chikungunya com MOI 0,01 e amostras do sobrenadante foram coletadas nos tempos de 4, 21, 28, 45, 52, 69 e 76 h.p.i. Os títulos virais obtidos por ensaio de plaque (PFU/mL) e RT-qPCR (cópias/mL) estão demonstrados em Log₁₀. Fonte: Própria autoria.

As análises comparativas quantitativas dos títulos virais em cultura de células usando os métodos apresentados revelaram algumas percepções sobre a produção de partículas de CHIKV. Como descrito anteriormente, a quantificação das partículas virais e do RNA de CHIKV foi realizada a partir do sobrenadante de culturas celulares, que certamente continha, além das partículas virais potencialmente infecciosas, material genético das células lisadas, como resultado do acentuado processo de replicação viral, e partículas virais defectivas. De acordo com a literatura, sabe-se que a metodologia de RT-qPCR é uma ferramenta alternativa

para estimar a titulação de vacinas contra diversos patógenos, como, por exemplo, vírus que não apresentam CPE ou em ocasiões em que o aparecimento do CPE é tardio (PRABHU et al., 2012). Com base nisso, ao longo da cinética de replicação foram observadas algumas diferenças importantes na quantificação do genoma e das partículas infecciosas presente nas amostras de cada tempo analisado.

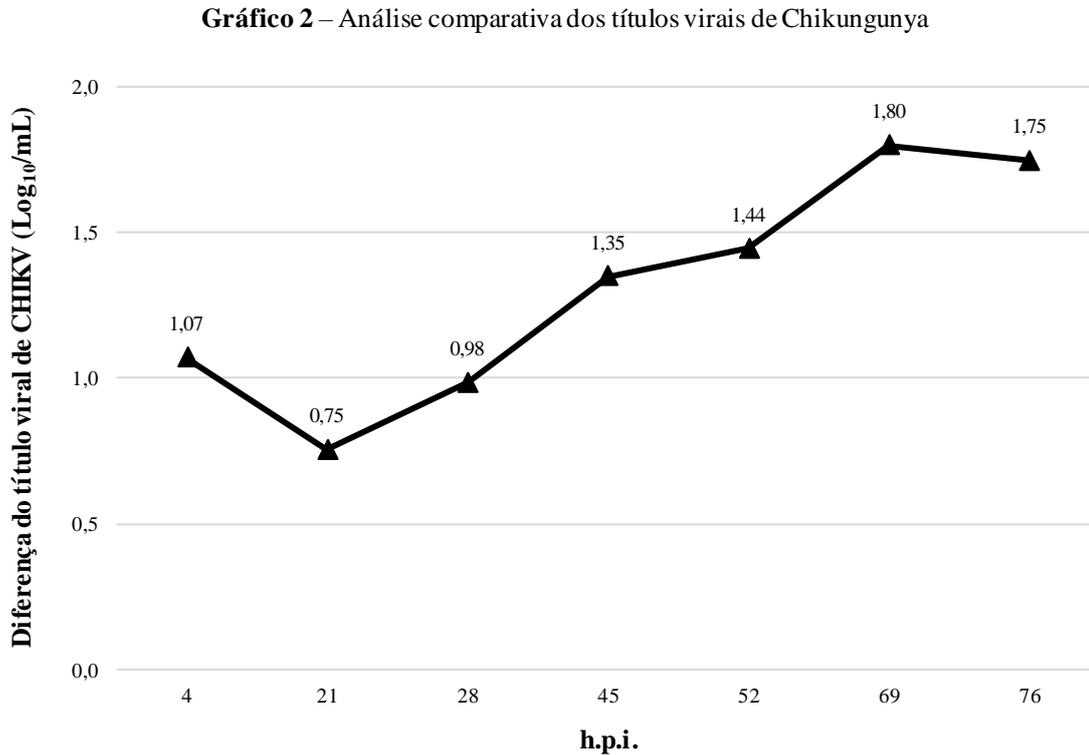
A infecção inicial pelo CHIKV resultou em uma ampla discrepância de títulos entre 4 e 21 h.p.i., sugerindo uma intensa replicação viral, como detectado por ambos os métodos empregados (Gráfico 1). Os dados obtidos por ensaio de plaque demonstraram que o título máximo viral foi obtido entre 28 e 45 h.p.i., revelando-se como o período mais adequado para a coleta do sobrenadante de culturas infectadas por CHIKV contendo partículas infecciosas.

Esse evento esteve associado com o intenso CPE observado nas culturas infectadas em 45 h.p.i., como pode ser visto na figura 15H-N. Na literatura já foi demonstrado que a partir do ensaio de TCID₅₀ utilizando células Vero E6 infectadas com MOI 10 de três cepas diferentes de CHIKV foi alcançado 8 Log₁₀ no 4º d.p.i., ou seja, em 96 h.p.i. (SUDEEP et al., 2019), enquanto nos resultados aqui demonstrados, esse título foi obtido a partir de 21 h.p.i. (Gráfico 1) seguido por um leve decréscimo do título viral. Assim, o tempo de 28 h.p.i. pode ser considerado como o momento mais apropriado para a obtenção de uma quantidade de partículas infecciosas considerável.

Os títulos virais obtidos através do ensaio de plaque foram comparados com seus respectivos títulos virais obtidos por RT-qPCR em cada tempo de infecção. Com esses dados é possível demonstrar que o perfil replicativo do CHIKV apresenta a mesma tendência de crescimento para ambas as metodologias aplicadas. Entretanto, os títulos virais obtidos por RT-qPCR foram maiores do que aqueles alcançados no ensaio de plaque, sabendo que a quantificação do genoma viral presente nas amostras de sobrenadante não incluem somente partículas infecciosas, mas também partículas defectivas (Gráfico 2).

Além disso, a análise comparativa entre as metodologias utilizadas revelou que os títulos virais obtidos mostraram uma relevante diferença a partir de 45 h.p.i. Quando comparado ao ensaio de plaque, a metodologia de RT-qPCR alcançou um aumento de 0,98 e 1,35 Log₁₀ cópias/mL em 28 e 45 h.p.i., respectivamente. Porém, a maior diferença de títulos ao longo de toda a cinética foi observada em 69 h.p.i. (Gráfico 2), onde a RT-qPCR apresentou uma diferença de 1,80 Log₁₀ cópias/mL no título viral em comparação com o ensaio de plaque. Essa observação pode ser explicada pela perda de infecciosidade das partículas virais presentes no sobrenadante das culturas nos períodos mais tardios da cinética já que, a partir de 45 h.p.i., o

número de células viáveis era bastante reduzido, impedindo a produção de novas partículas potencialmente infecciosas.



Diferença entre os títulos virais de Chikungunya obtidos por meio de ensaio de plaque e RT-qPCR. Em 69 h.p.i. foi observada a maior diferença de títulos, 1,80 Log₁₀/mL. Fonte: Própria autoria.

De acordo com os resultados preliminares obtidos, a metodologia de RT-qPCR demonstrou-se como uma abordagem promissora para o monitoramento ativo da replicação viral *in vitro*, possibilitando uma melhor compreensão da replicação de CHIKV em cultura de células em comparação com o ensaio de plaque, amplamente utilizado para avaliação de partículas virais infecciosas, como demonstrado em estudos de outras arboviroses (COELHO et al., 2017; FERNANDES-MONTEIRO et al., 2015).

Portanto, apesar de ser necessária a realização de experimentos futuros, os resultados aqui apresentados são favoráveis e extremamente relevantes para estudos de desenvolvimento de imunobiológicos para CHIKV.

6.4 Validação da RT-qPCR em matriz soro humano negativo

6.4.1 Eficiência de extração

A fim de avaliar as condições adequadas de extração do RNA viral desejado, assim como a reprodutibilidade desta etapa, a eficiência de extração do material genético de CHIKV foi verificada de acordo com a avaliação dos controles NEC, NTC e PEC, de acordo com os critérios predeterminados para aceitação dos ensaios, como pode ser visto na seção 5.7.6.1. Os resultados obtidos para os controles estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para os controles de extração (PEC e NEC) e de reação (NTC) da RT-qPCR

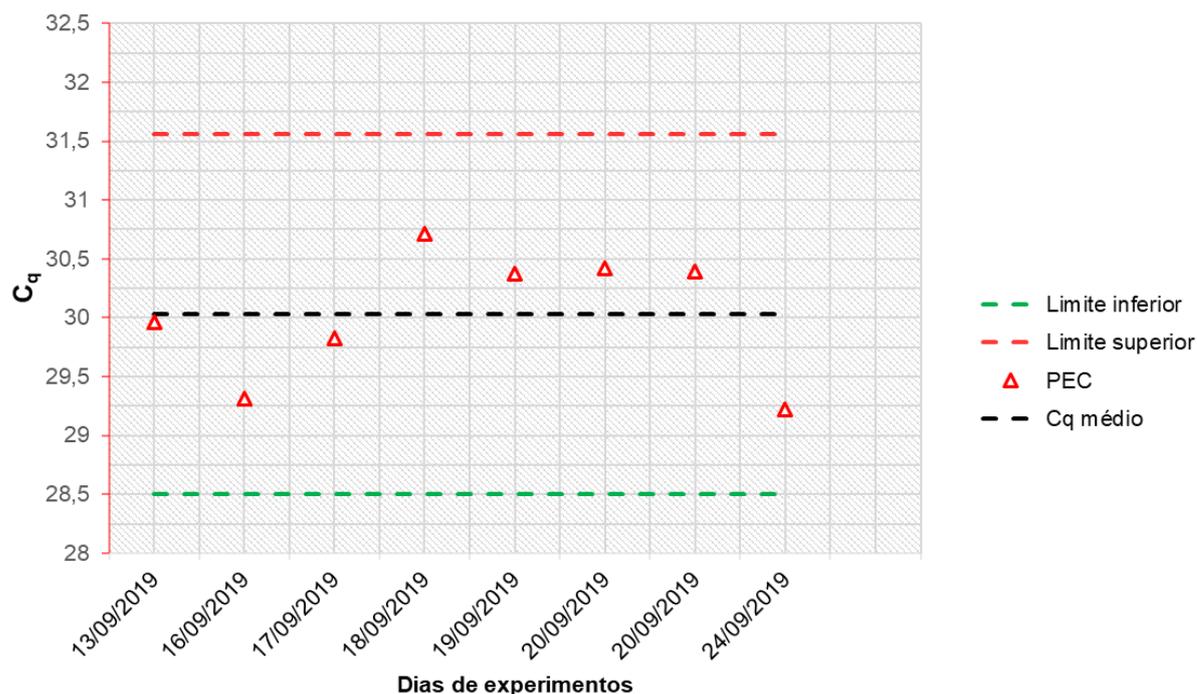
Placa	Data	C_q (NEC)	C_q (NTC)	C_q (PEC)
PCR-C-009-08	13/09/2019	Não detectado	Não detectado	29,9630
PCR-C-009-10	16/09/2019	Não detectado	Não detectado	29,3149
PCR-C-009-12	17/09/2019	Não detectado	Não detectado	29,8292
PCR-C-009-14	18/09/2019	Não detectado	Não detectado	30,7176
PCR-C-009-16	19/09/2019	Não detectado	Não detectado	30,3765
PCR-C-009-18	20/09/2019	Não detectado	Não detectado	30,4220
PCR-C-009-20	20/09/2019	Não detectado	Não detectado	30,3970
PCR-C-009-22	24/09/2019	Não detectado	Não detectado	29,2237

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Conforme demonstrado na tabela 1, nenhuma das amostras dos controles NEC e NTC apresentaram amplificação do genoma viral, revelando que os procedimentos realizados nestas etapas foram executados de maneira adequada e que não havia nenhum resíduo de RNA nas amostras analisadas, revelando a não ocorrência de contaminação cruzada entre as amostras, bem como a presença de resultados falso-positivos. Diferentemente, porém conforme o esperado, todas as amostras de controle PEC apresentaram C_q detectáveis, indicando a eficiência e reprodutibilidade do método de extração de ácidos nucleicos para CHIKV. Logo, os resultados obtidos na etapa de extração do RNA demonstraram-se em conformidade com os critérios de aceitação do ensaio pré-estabelecidos.

Devido à ausência de um histórico de valores de C_q para monitorar o desempenho do PEC, os resultados obtidos foram dispostos em um gráfico de controle representado pelo gráfico 3 abaixo:

Gráfico 3 – Gráfico de monitoramento de desempenho do controle PEC da RT-qPCR obtido de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo



Distribuição dos valores de C_q obtidos para as amostras de controle PEC extraídas de soro humano negativo inoculado com CHIKV em cada um dos ensaios de RT-qPCR realizados. PEC, *positive extraction control* (controle positivo de extração); C_q , *quantification cycle*. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Com base nos valores de C_q demonstrados no gráfico 3 foi possível verificar que todos os valores de C_q obtidos encontram-se dentro dos limites aceitáveis de variabilidade, porém, por serem dados iniciais, o monitoramento dos ensaios de rotina, executados no laboratório, deve ser contínuo.

6.4.2 Curva de calibração, eficiência de amplificação e faixa linear

A adequação da curva de calibração foi verificada levando em consideração todas as 12 curvas plasmidiais realizadas durante a validação, as quais compreenderam à faixa de concentração viral de $\text{Log } 10^7$ a 10^2 . Além disso, seus resultados também serviram para a determinação da eficiência de amplificação, da faixa linear de análise, dos limites de linearidade inferior (LI) e superior (LS) e do limite de quantificação (LQ) do método. Na tabela 2 são demonstrados os valores de C_q obtidos das curvas de calibração processadas.

Tabela 2 – Valores de C_q obtidos para os níveis de concentração negativo para a avaliação da curva de calibração da RT-qPCR

Curva	Placa	Log ₁₀ da concentração plasmidial (cópias/μL)					
		7,00	6,00	5,00	4,00	3,00	2,00
1	PCR-C-009-08	13,93	17,05	20,99	24,13	27,61	30,47
		13,79	16,97	21,26	23,79	27,24	30,37
2	PCR-C-009-10	13,90	17,18	21,36	24,26	27,41	30,34
		14,07	17,75	21,32	24,28	26,70	30,66
3	PCR-C-009-12	13,50	17,23	20,81	24,15	27,42	29,62
		13,96	17,05	21,02	23,73	27,22	29,98
4	PCR-C-009-14	13,86	17,36	21,00	24,13	27,35	30,42
		14,07	17,51	21,05	23,99	27,24	30,59
5	PCR-C-009-16	13,83	17,49	20,82	24,32	27,35	30,44
		13,86	17,42	21,22	23,86	27,10	30,33
6	PCR-C-009-18	13,61	16,93	20,90	24,28	27,23	30,55
		13,87	17,27	21,41	24,06	27,10	30,08
7	PCR-C-009-20	14,20	17,11	20,73	23,63	27,30	30,63
		13,89	17,27	21,05	23,72	27,41	30,85
8	PCR-C-009-22	14,24	17,64	21,23	24,46	27,28	30,46
		14,35	17,78	21,45	24,50	27,44	30,57
9	PCR-C-009-22	13,99	17,50	20,97	24,45	26,88	30,47
		14,02	17,65	21,18	24,24	27,33	30,60
10	PCR-C-009-23	13,69	17,36	21,06	24,52	27,37	30,49
		13,86	17,21	21,29	24,36	27,42	30,49
11	PCR-C-009-23	13,96	17,39	20,82	22,44	27,24	30,33
		14,03	17,18	21,16	24,20	27,30	30,83
12	PCR-C-009-23	13,93	17,30	20,92	24,22	27,27	30,49
		13,80	17,39	21,03	23,80	27,08	30,32

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

A partir dos valores de C_q obtidos, as curvas foram avaliadas, individualmente, quanto ao cumprimento dos parâmetros definidos previamente como critérios de aceitação para os ensaios, descritos na seção 5.7.6.1. Para isso, as curvas foram submetidas à regressão linear e os valores estimados para os parâmetros da curva de regressão (*slope* e *intercept*), os intervalos de confiança e os coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2) encontrados estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos para a avaliação dos parâmetros de regressão linear das curvas de calibração da RT-qPCR

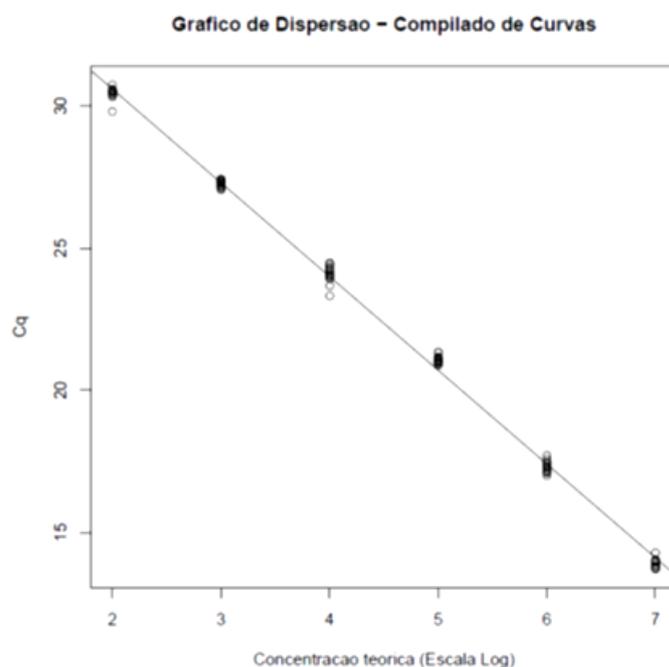
Curva	Coefficiente angular (<i>slope</i>)	Significância do coeficiente angular (p-valor)	Coefficiente linear (<i>Intercept</i>)	Coefficiente de correlação (<i>r</i>)	Coefficiente de determinação (<i>R</i> ²)	Eficiência de amplificação (%)
1	-3,3403	< 0,05	37,3305	0,9987	0,9974	99,24%
2	-3,2648	< 0,05	37,1264	0,9983	0,9966	102,44%
3	-3,2542	< 0,05	36,7860	0,9980	0,9960	102,90%
4	-3,2952	< 0,05	37,2098	0,9996	0,9991	101,13%
5	-3,2887	< 0,05	37,1367	0,9993	0,9985	101,41%
6	-3,3165	< 0,05	37,1979	0,9983	0,9967	100,23%
7	-3,3355	< 0,05	37,3257	0,9993	0,9986	99,44%
8	-3,2346	< 0,05	37,1732	0,9990	0,9981	103,78%
9	-3,2722	< 0,05	37,1649	0,9991	0,9982	102,12%
10	-3,3486	< 0,05	37,4956	0,9985	0,9969	98,90%
11	-3,2921	< 0,05	37,0545	0,9984	0,9968	101,26%
12	-3,2924	< 0,05	37,1105	0,9994	0,9989	101,25%

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Como pode ser observado, todas as curvas processadas apresentaram valores para os parâmetros de regressão linear aceitáveis, segundo os critérios de aceitação definidos para os ensaios. O modelo de regressão linear sugeriu uma forte significância do coeficiente angular (p-valor) de todas as curvas, o que permitiu estimar os valores de eficiência de amplificação com base na equação descrita na seção 5.8.2.

Os valores obtidos para eficiência de amplificação sugeriram um alto grau de reprodutibilidade e desempenho do procedimento nas etapas de preparo e processamento das curvas de calibração, já que atenderam valores compreendidos no intervalo esperado de 90% e 110% (FDA, 2019). A partir disso, então, foi construído um gráfico de dispersão (Gráfico 4) onde são apresentados todos os valores de C_q experimentais obtidos nas curvas processadas em função do logaritmo de base 10 da concentração plasmidial.

Gráfico 4 – Representação gráfica da dispersão dos valores de C_q obtidos a partir das curvas de calibração em função do logaritmo de base 10 das concentrações plasmidiais da RT-qPCR



Compilado dos valores de C_q experimentais obtidos para as curvas plasmidiais analisadas. C_q , *quantification cycle*. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

O gráfico de dispersão dos valores de C_q obtidos nas curvas de calibração sugeriu uma relação linear entre as variáveis analisadas. Os parâmetros de regressão foram estimados por meio do método dos mínimos quadrados, os quais podem ser verificados na tabela 4.

Tabela 4 – Compilado dos parâmetros de regressão obtidos das curvas de calibração da RT-qPCR

Coefficiente angular (slope)	Significância do coeficiente angular (p-valor)	Coefficiente linear (Intercept)	Coefficiente de correlação (r)	Coefficiente de determinação (R²)	Eficiência de amplificação (%)
-3,2946	< 0,05	37,1760	0,9988	0,9976	101,15%

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Como é possível observar, os parâmetros obtidos, apresentados na tabela 4, estão em concordância com os valores de C_q obtidos para as curvas individuais, onde o p-valor

$< 0,05$ revela um *slope* altamente significativa e em conformidade com o critério de aceitação predeterminado para o parâmetro (entre -3,6 e -3,1).

O valor 37,1760 estimado para o *intercept* respeitou o critério pretendido para o parâmetro ($< 40,0$). Além disso, com base na interpretação teórica do evento de amplificação que ocorre na metodologia de qPCR, este valor representa o C_q onde uma única cópia de RNA de CHIKV é capaz de ser detectada.

Já os valores 0,9988 e 0,9976 obtidos para r e R^2 , respectivamente, indicaram uma boa correlação linear entre os valores de C_q experimentais e as concentrações plasmidiais teóricas, de acordo com o modelo de regressão linear aplicado.

O valor 101,15% obtido para a eficiência de amplificação também obedeceu ao critério pré-estabelecido. Esses resultados indicaram uma baixa variabilidade na execução das diluições realizadas para cada concentração da curva de calibração.

Sendo assim, os resultados de R^2 , *slope* e eficiência de amplificação obtidos neste estudo demonstraram-se bastante similares àqueles demonstrados por PABBARAJU e colaboradores (2016) durante o desenvolvimento e validação de um RT-PCR multiplex tendo como alvo de CHIKV a proteína não estrutural 4 (nsP4). Diferentemente disso, em estudo de RT-PCR *one-step* multiplex empregando a mesma região gênica alvo de CHIKV utilizada em nossos ensaios, os valores de *slope* e *intercept*, -3,6304 e 42,709, respectivamente, excederam os critérios de aceitação para estes parâmetros (LIU et al., 2018).

Obtidos os parâmetros de regressão por meio do compilado das curvas de calibração, os valores das concentrações experimentais foram preditos a partir da substituição dos valores e determinação da equação de regressão da curva ajustada obtida por meio da aplicação do modelo de regressão linear. Na tabela 5 encontram-se os valores médios ajustados das concentrações plasmidiais de cada uma das curvas processadas.

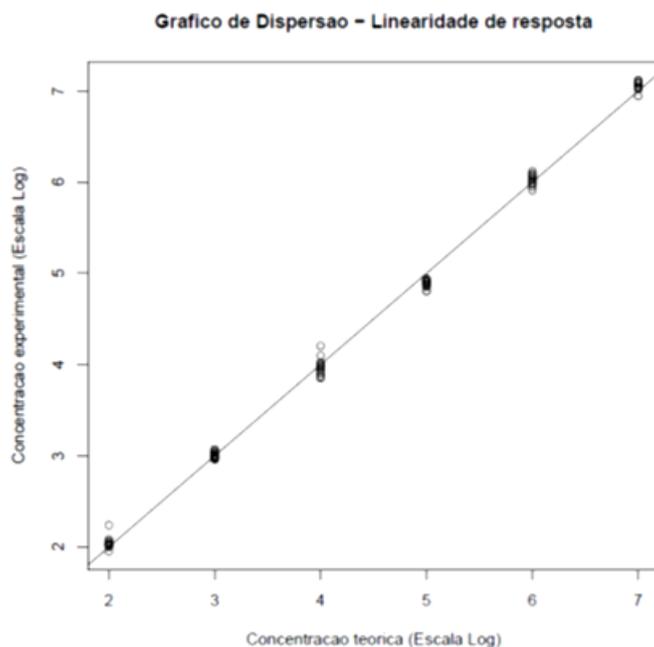
Com base nos valores apresentados na tabela 5, um novo gráfico de dispersão foi construído, correlacionando as concentrações experimentais obtidas com as concentrações nominais, como pode ser verificado no gráfico 5.

Tabela 5 – Valores de concentrações plasmidiais ajustadas obtidas a partir da equação de regressão linear Log_{10} da concentração plasmidial experimental da RT-qPCR

	Log_{10} da concentração plasmidial nominal (cópias/ μL)						
	Curva	7,00	6,00	5,00	4,00	3,00	2,00
Log_{10} da concentração plasmidial experimental (cópias/ μL)	1	7,0781	6,1215	4,8715	4,0119	2,9598	2,0500
	2	7,0390	5,9837	4,8075	3,9174	3,0713	2,0277
	3	7,1168	6,0801	4,9342	4,0176	2,9916	2,2390
	4	7,0451	5,9927	4,9017	3,9811	2,9984	2,0245
	5	7,0817	5,9854	4,9047	3,9709	3,0200	2,0603
	6	7,1132	6,0937	4,8631	3,948	3,0385	2,0829
	7	7,0213	6,0659	4,9425	4,0978	2,9810	1,9543
	8	6,9452	5,9084	4,8064	3,8536	2,9781	2,0215
	9	7,0333	5,9494	4,8876	3,8946	3,0560	2,0156
	10	7,1038	6,0370	4,8570	3,8654	2,9688	2,0283
	11	7,0372	6,0370	4,9131	4,2044	3,0061	2,0028
	12	7,0763	6,0196	4,9181	3,9958	3,0356	2,0558

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Gráfico 5 – Representação gráfica da dispersão correlacionando, em função do logaritmo de base 10, as concentrações plasmidiais experimentais obtidas com as concentrações plasmidiais nominais da RT-qPCR



Linearidade de resposta obtida, em Log_{10} , entre os valores de C_q experimentais obtidos para as concentrações plasmidiais analisadas e os valores de C_q das concentrações plasmidiais nominais. C_q , *quantification cycle*. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

A partir do perfil linear apresentado no gráfico de dispersão, a investigação da correlação entre os valores das concentrações plasmidiais experimentais e nominais foi verificada por meio da análise de regressão linear. Além disso, a partir da regressão linear também foram obtidos os parâmetros da curva de regressão (*slope* e *intercept*), os

intervalos de confiança e os coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2). Os parâmetros podem ser verificados na tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros e coeficientes para a curva ajustada via modelo linear correlacionando, em função do logaritmo de base 10, as concentrações plasmidiais experimentais ajustadas com as concentrações plasmidiais nominais da RT-qPCR

Coeficiente angular (<i>slope</i>)	Significância do coeficiente angular (p-valor)	Coeficiente linear (<i>Intercept</i>)	Coeficiente de correlação (r)	Coeficiente de determinação (R^2)	Desvio residual (QMR)
1	< 0,05	0	0,9988	0,9976	0,0072

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

De acordo com os valores dos coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2) obtidos para a curva ajustada, o modelo de regressão linear aplicado sugeriu uma boa correlação linear entre as variáveis, bem como um bom ajuste do modelo empregado. A significância do coeficiente angular, a um nível $\alpha = 0,05$, apresentando p-valor < 0,05, permite dizer que o parâmetro é significativamente diferente de 0. Além disso, os parâmetros de regressão obtidos, $slope = 1$ e $intercept = 0$, sugerem uma pequena diferença entre os valores experimentais ajustados e os nominais.

Com base nas concentrações plasmidiais em cópias absolutas como fator foi possível construir um resumo estatístico que permitiu a avaliação dos coeficientes de variação, conforme demonstrado na tabela 7 a seguir:

Tabela 7 – Resumo estatístico para avaliação da dispersão dos dados obtidos para curva de calibração da RT-qPCR

Concentração plasmidial nominal (cópias/ μ L)	Média global da concentração plasmidial experimental (cópias/ μ L)	Desvio padrão global	Variância global	CV% global
10^2	$1,128098 \times 10^2$	$2,062693 \times 10^1$	$4,254704 \times 10^2$	10,64
10^3	$1,023604 \times 10^3$	$8,513237 \times 10^1$	$7,247520 \times 10^3$	8,32
10^4	$9,793109 \times 10^3$	$2,469358 \times 10^3$	$6,097729 \times 10^6$	25,22
10^5	$7,691753 \times 10^4$	$7,68304 \times 10^3$	$5,902915 \times 10^7$	9,99
10^6	$1,064009 \times 10^6$	$1,507161 \times 10^5$	$2,271533 \times 10^{10}$	14,16
10^7	$1,148092 \times 10^7$	$1,220998 \times 10^6$	$1,490836 \times 10^{12}$	18,28

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Como pode ser verificado na tabela 7, o critério de dispersão dos dados preconizado foi obedecido para os níveis de concentração plasmidial analisados, com exceção da concentração de 10^4 cópias/ μL , a qual apresentou $\text{CV}\% > 25\%$. Apesar de o compilado de resultados não ter sido capaz de atender ao critério predeterminado para todas as concentrações plasmidiais empregadas no método, conforme estabelecido pelas agências regulamentadoras, observa-se que, quando analisadas individualmente, as curvas de calibração atendem todos os critérios estabelecidos para aceitação do ensaio, como pode ser verificado na tabela 3.

Diante disso, pode-se sugerir que a maneira mais adequada de realizar a análise das curvas de calibração para o método de qPCR seja por meio da análise de cada uma das curvas individualmente e não por meio do compilado de resultados, como obtido até este momento do estudo.

Entretanto, mesmo sabendo da necessidade de novas investigações para avaliar a melhor maneira de analisar este parâmetro, os resultados obtidos foram considerados para a realização da estimativa da faixa linear da metodologia estudada, a qual foi realizada mediante inclusão dos limites inferior (LI) e superior (LS) de linearidade, como mostrado na tabela 8 a seguir:

Tabela 8 – Cálculo do LI e LS para determinação da faixa linear da RT-qPCR

LI = $10^{(2 - (3 \cdot \sqrt{0,072}))}$	LS = $10^{(7 + (3 \cdot \sqrt{0,072}))}$
LI = 55,64 cópias/ μL	LS = 17.971.526 cópias/ μL

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Deste modo, a faixa linear foi estabelecida compreendendo as concentrações [1,7454 - 7,2546] cópias/ μL , em escala logarítmica, ou [55,64 – 17.971.526] cópias/ μL .

Análises futuras serão capazes de definir com maior assertividade se o critério de dispersão acima do valor pré-estabelecido representa uma influência negativa para os resultados obtidos pelo método de qPCR ou não. Além disso, poderá ser esclarecido se as análises por meio de compilados dos resultados são realmente adequadas para a metodologia.

6.4.3 Precisão

A variabilidade dos erros aleatórios ocorridos em reações individuais (repetibilidade) realizadas em diferentes dias e por analistas distintos (precisão intermediária) foi avaliada com base no intervalo de concentrações de RNA de CHIKV contemplado nos painéis de diluição previamente preparados utilizados tanto para os ensaios de precisão, quanto para os ensaios de exatidão. Os resultados de precisão obtidos para todas as réplicas das concentrações analisadas podem ser verificados na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária

Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Resultados (cópias/ μ L)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	$1,0 \times 10^5$	$3,75 \times 10^5$	$2,93 \times 10^5$	$1,49 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$	$2,16 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$	$3,47 \times 10^5$
	$1,0 \times 10^4$	$3,04 \times 10^4$	$1,65 \times 10^4$	$1,83 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	$3,07 \times 10^4$	$2,48 \times 10^4$	$2,62 \times 10^4$	$1,91 \times 10^4$
	$5,0 \times 10^3$	$7,93 \times 10^3$	$7,86 \times 10^3$	$6,53 \times 10^3$	$4,86 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4$	$5,96 \times 10^3$	$9,51 \times 10^3$	$6,47 \times 10^3$
	$1,0 \times 10^3$	$3,38 \times 10^3$	$1,47 \times 10^3$	$2,94 \times 10^3$	$2,65 \times 10^3$	$2,57 \times 10^3$	$1,95 \times 10^3$	$1,09 \times 10^3$	$1,43 \times 10^3$
	$1,0 \times 10^2$	$2,51 \times 10^2$	$2,32 \times 10^2$	$1,83 \times 10^2$	$2,40 \times 10^2$	$1,59 \times 10^2$	$2,37 \times 10^2$	$2,83 \times 10^2$	$2,68 \times 10^2$
B	$1,0 \times 10^5$	$1,24 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$	$1,11 \times 10^5$	$5,95 \times 10^4$	$9,20 \times 10^4$	$4,21 \times 10^4$	$3,99 \times 10^4$	$8,70 \times 10^4$
	$1,0 \times 10^4$	$9,35 \times 10^3$	$6,86 \times 10^3$	$9,64 \times 10^3$	$1,48 \times 10^4$	$6,83 \times 10^3$	$6,68 \times 10^3$	$6,19 \times 10^3$	$6,84 \times 10^3$
	$5,0 \times 10^3$	$5,73 \times 10^3$	$1,87 \times 10^3$	$3,73 \times 10^3$	$1,84 \times 10^3$	$1,92 \times 10^3$	$2,90 \times 10^3$	$1,12 \times 10^3$	$2,57 \times 10^3$
	$1,0 \times 10^3$	$6,29 \times 10^2$	$3,87 \times 10^2$	$7,06 \times 10^2$	$4,80 \times 10^2$	$3,20 \times 10^2$	$2,81 \times 10^2$	$5,20 \times 10^2$	$8,19 \times 10^2$
	$1,0 \times 10^2$	$7,05 \times 10^1$	$3,98 \times 10^1$	$6,59 \times 10^1$	$5,36 \times 10^1$	$1,38 \times 10^2$	$3,73 \times 10^1$	$2,79 \times 10^1$	$4,31 \times 10^1$
C	$1,0 \times 10^5$	$1,29 \times 10^5$	$1,60 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$	$1,26 \times 10^5$	$8,22 \times 10^4$	$8,17 \times 10^4$	$1,43 \times 10^5$
	$1,0 \times 10^4$	$2,28 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$	$1,26 \times 10^4$	$1,27 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$	$1,00 \times 10^4$	$6,31 \times 10^3$	$1,37 \times 10^4$
	$5,0 \times 10^3$	$6,97 \times 10^3$	$6,18 \times 10^3$	$5,72 \times 10^3$	$3,57 \times 10^3$	$4,81 \times 10^3$	$4,20 \times 10^3$	$3,01 \times 10^3$	$5,30 \times 10^3$
	$1,0 \times 10^3$	$1,26 \times 10^3$	$1,23 \times 10^3$	$1,39 \times 10^3$	$8,28 \times 10^2$	$8,89 \times 10^2$	$7,53 \times 10^2$	$5,81 \times 10^2$	$7,92 \times 10^2$
	$1,0 \times 10^2$	$3,11 \times 10^1$	$1,01 \times 10^2$	$1,14 \times 10^2$	$9,17 \times 10^1$	$1,02 \times 10^2$	$1,23 \times 10^2$	$1,07 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

De acordo com os dados apresentados, foi construído um sumário estatístico (Tabela 10) com o objetivo de avaliar o grau de dispersão dos resultados experimentais obtidos, no qual podem ser verificados os valores estimados para as medidas de localização e variabilidade.

Tabela 10 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo

Concentração teórica (cópias/ μ L)	Analista	Número de resultados (n)	Média	Desvio Padrão	CV% (repetibilidade)	CV% (precisão intermediária)
$1,0 \times 10^5$	A	8	223017,3	103492,48	46,41	60,35
	B	8	82167,29	31618,19	38,48	
	C	8	123695,1	27771,45	22,45	

1,0 x 10 ⁴	A	8	22327,56	6672,822	29,89	
	B	8	8393,731	2879,701	34,31	52,51
	C	8	12793,62	4673,54	36,53	
5,0 x 10 ³	A	8	7802,347	2636,415	33,79	
	B	8	2709,947	1457,242	53,77	54,25
	C	8	4968,818	1340,832	26,98	
1,0 x 10 ³	A	8	21849,88	8176,136	37,42	
	B	8	5177,256	1898,417	36,67	71,18
	C	8	9664,257	2903,324	30,04	
1,0 x 10 ²	A	8	23169,36	4148,226	17,9	
	B	8	5953,175	3491,098	58,64	63,77
	C	8	9756,254	2843,725	29,15	

Continuação Tabela 10

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Como é possível verificar, os dados apresentados na tabela acima revelam uma característica de dispersão aumentada para os resultados experimentais obtidos, representada pelos coeficientes de variação (CV%), demonstrando uma elevada variabilidade dos resultados em todos os níveis de concentrações analisados (valores em destaque na tabela 10). Por conta disso, os critérios estabelecidos para aceitação dos ensaios ($CV\% \leq 25\%$) não foram cumpridos, tanto para repetibilidade, quanto para precisão intermediária.

Como definição, a precisão está completamente relacionada com os erros causados por fatores que variam durante a realização dos ensaios. Dentre esses fatores podem ser citados temperatura, tempo de execução, os diferentes reagentes, instrumentos e equipamentos utilizados, além das diferenças intrínsecas aplicadas à técnica de acordo com o operador que a executa, como, por exemplo, erros de pipetagem, e variações estocásticas individuais (BURD, 2010; BUSTIN et al., 2009; ROZET et al., 2011).

Com relação às corridas, espera-se uma menor variabilidade entre os resultados de uma amostra processada em uma mesma corrida (repetibilidade) do que entre os resultados dessa mesma amostra obtidos em corridas distintas (precisão intermediária). Esse fato deve-se à variação das condições operacionais presente no momento de cada uma das análises (BURD, 2010). Entretanto, a repetibilidade de algumas corridas apresentou variabilidade próxima aos elevados resultados de precisão intermediária.

A execução dos ensaios para avaliar a precisão do método de RT-qPCR foi realizada de modo que nenhum dos possíveis fatores causadores de variações

significativas interferissem no desempenho desta etapa. Para isso, os ensaios foram executados em cabines e salas segregadas, predeterminadas para a realização de cada etapa do método (extração do RNA viral, obtenção de DNAc e realização da RT-qPCR), impedindo possíveis contaminações. Além disso, foram utilizados os mesmos reagentes, pipetas e equipamentos por todos os analistas, o que reduz a chance de erros inerentes a cada um dos materiais.

Apesar de tomadas todas as precauções, os resultados obtidos não permitiram dizer que o método é preciso. Logo, podem ser sugeridas, além dos fatores de variabilidade já citados, dois outros possíveis motivos causadores das significativas variabilidades aqui observadas, como: (1) erros na diluição das amostras que compuseram os painéis de concentrações destinados à realização das etapas de precisão e exatidão, e (2) intervalo inadequado de concentrações teóricas constituintes dos painéis de diluição, assim como o número de amostras analisadas.

O procedimento de diluição é uma potencial causa de irregularidade dos resultados de um ensaio. Neste estudo, o grau de dispersão dos resultados apresentou uma elevada variação não só entre os valores obtidos para as amostras processadas no mesmo dia, por um único operador e submetida à mesma corrida, como também para os valores obtidos entre os diferentes analistas em diferentes dias. Logo, é possível sugerir que a fonte raiz da variabilidade apresentada esteja na diluição incorretamente realizada na amostra de maior concentração, da qual foram diluídas as amostras de menores concentrações. Este erro pode ter sido decorrente de cálculos equivocados realizados com base no título viral da alíquota utilizada para a diluição da maior concentração viral ou até mesmo no cálculo do volume de suspensão viral a ser adicionado à matriz.

Conforme recomendado pelo documento EP5-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), a avaliação da precisão deve ser feita com base em amostras contempladas em três níveis de concentrações: alta, baixo e um que represente as concentrações utilizadas como referência para a tomada de decisões clínicas que, geralmente, são consideradas como o limite de detecção do método. Caso as estimativas de precisão, baseadas nesses níveis de concentrações, apresentem grandes diferenças, é sugerido que concentrações adicionais sejam testadas para descrever o total desempenho do ensaio (NCCLS, 2004).

Além disso, pode não ser possível estabelecer a precisão de um método sem que para isso seja empregado um grande número de amostras. O aumento no quantitativo de amostras analisadas promove uma melhor confiança nas estimativas estatísticas e permite

a influência de erros aleatórios relacionados à performance do teste para cada um dos níveis de concentração aplicados (BURD, 2010). Levando em consideração que nos ensaios de avaliação da precisão para a metodologia de RT-qPCR realizados foram empregadas 24 réplicas totais para cada uma das cinco concentrações de RNA viral analisadas, seria interessante a aplicação de ajustes com relação ao número de réplicas de níveis de concentração processados com o objetivo de verificar se o grau de dispersão da repetibilidade e da precisão intermediária adequam-se aos critérios predefinidos para o método.

6.4.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por meio do cálculo de recuperação percentual média das concentrações predeterminadas de cópias de RNA viral de CHIKV, que verifica a quantificação correta do número de cópias de RNA viral. Para esta avaliação foram utilizados os painéis de diluição previamente preparados, também utilizados para os ensaios de precisão, devido à falta de um material de referência estabelecido e certificado para CHIKV. Os resultados das recuperações percentuais médias obtidos de todas as réplicas analisadas estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo para a avaliação da exatidão da RT-qPCR

Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Recuperações %							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	$1,0 \times 10^5$	374,79	292,83	149,1	100,6	216,01	128,78	175	347,04
	$1,0 \times 10^4$	304,03	165,13	183,44	125,84	307,46	247,57	261,65	191,09
	$5,0 \times 10^3$	158,56	157,12	130,65	97,21	266,11	119,11	190,14	129,47
	$1,0 \times 10^3$	337,55	147,42	293,67	265,11	257,41	194,92	109,39	142,53
	$1,0 \times 10^2$	251,4	231,85	183,45	239,76	159	237,01	282,89	268,17
B	$1,0 \times 10^5$	124,22	101,98	110,64	59,49	91,99	42,12	39,88	87,02
	$1,0 \times 10^4$	93,52	68,6	96,4	147,62	68,32	66,78	61,89	68,37
	$5,0 \times 10^3$	114,68	37,33	74,58	36,82	38,44	57,98	22,34	51,42
	$1,0 \times 10^3$	62,9	38,72	70,63	47,96	31,97	28,13	51,98	81,89
	$1,0 \times 10^2$	70,48	39,78	65,95	53,6	138,15	37,26	27,94	43,09
C	$1,0 \times 10^5$	128,76	159,55	132,33	136,11	126,3	82,16	81,67	142,69
	$1,0 \times 10^4$	228,34	126,65	125,59	127,03	115,51	100,31	63,12	136,94
	$5,0 \times 10^3$	139,4	123,61	114,41	71,32	96,16	84,02	60,11	105,97
	$1,0 \times 10^3$	126,21	123,32	139,29	82,8	88,92	75,25	58,13	79,22

1,0 x 10² **31,15** 100,76 113,5 91,67 102,4 123,48 107,26 110,28

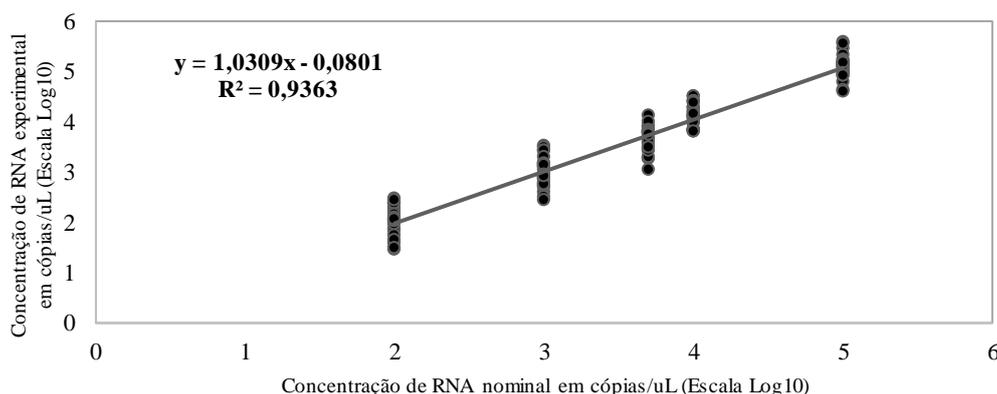
Continuação Tabela 11

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Conforme demonstrados na tabela 11, os resultados obtidos para as recuperações percentuais médias das réplicas processadas não atenderam ao critério proposto para o parâmetro de exatidão, que compreende a faixa entre 75% e 125% em relação à concentração nominal. Este intervalo é considerado ideal por conta da característica complexa da matriz biológica utilizada (soro humano) nos ensaios, bem como à variabilidade do método estudado (FDA, 2019). A diferença acentuada entre os resultados obtidos de recuperação percentual pode ser justificada pela elevada variabilidade ocorrida em todos os níveis de concentrações de cópias de RNA viral analisadas (valores em destaque na tabela 11).

Além disso, também foi avaliada a linearidade de resposta das recuperações percentuais médias por meio da aplicação do modelo de regressão linear que correlacionou os resultados das concentrações virais experimentais com as nominais. A curva obtida pode ser vista no gráfico 6 a seguir:

Gráfico 6 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo



Linearidade de resposta obtida, em Log10, entre os valores de RNA experimentais obtidos para as concentrações analisadas em amostras de CHIKV inoculadas em soro humano negativo e os valores de RNA nominais. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

De acordo com a curva de linearidade de resposta demonstrada no gráfico 6, a correlação dos resultados obtida entre os valores das concentrações virais experimentais e nominais, levando em consideração os coeficientes de correlação (r) ($r = 0,9677 < 0,990$) e de determinação (R^2) ($R^2 = 0,9363 < 0,990$) obtidos, demonstra que o parâmetro

de exatidão exigido para a metodologia não foi alcançado. Por conta disso, os coeficientes da curva ajustada e seus coeficientes de correlação não puderam ser considerados para o parâmetro analisado.

Além da avaliação da recuperação percentual média das réplicas processadas, cada uma das concentrações de RNA viral foi analisada levando em consideração as recuperações percentuais médias para cada um dos analistas, como demonstrado na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados de recuperação percentual média da RT-qPCR obtidos de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo por níveis de concentração e por analistas

Concentração teórica (cópias/ μ L)	Analista	Recuperação % média
1,0 x 10 ⁵	A	223,01725
	B	82,16729
	C	123,69509
1,0 x 10 ⁴	A	223,27561
	B	83,93731
	C	127,93619
5,0 x 10 ³	A	156,04694
	B	54,19894
	C	99,37635
1,0 x 10 ³	A	218,49878
	B	51,77255
	C	96,64257
1,0 x 10 ²	A	231,69359
	B	59,53175
	C	97,56254

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Conforme verificado na tabela anterior, as recuperações percentuais médias por analista obtidas também não atenderam ao critério de aceitação dos ensaios em todas as concentrações analisadas, apresentando diferenças significativas entre os analistas (valores em destaque na tabela 12). Sendo assim, esses resultados indicam que o método em estudo não está apto a fornecer resultados exatos, necessitando de aperfeiçoamento.

Os resultados, em cópias/ μ L, obtidos a partir do processamento do painel de diluição foram compartilhados entre as análises de precisão e exatidão. Por conta disso, da mesma maneira que para o parâmetro de precisão, os resultados analíticos para exatidão também não se apresentaram conforme desejado para o método.

Assim, além das possíveis causas discutidas na seção 6.4.2.3 para precisão, também pode-se sugerir a ocorrência de erro na etapa de extração do RNA viral.

Conforme descrito na literatura, a recuperação percentual obtida como resultado da exatidão pode ser representada pela eficiência de extração de ácidos nucleicos (HEDMAN et al., 2018), já que na reação de RT-qPCR serão quantificadas somente as moléculas do RNA viral que foram corretamente extraídas e encontram-se no volume de reação analisado.

Portanto, com base nos resultados insatisfatórios obtidos para precisão e exatidão, os ensaios para análise desses parâmetros deverão ser ajustados e repetidos após a tomada de decisões pertinentes à sua otimização.

6.4.5 Limite de quantificação (LQ)

A determinação do limite de quantificação do método é dependente dos parâmetros de precisão e exatidão, sendo assim, como esses não alcançaram o desempenho esperado para os critérios predefinidos de aceitação dos ensaios, não foi possível determinar de maneira confiável a estimativa do limite de quantificação.

6.4.6 Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD 95%)

A determinação do parâmetro de sensibilidade analítica/limite de detecção (LD) foi baseada na análise de painéis de amostras contendo diferentes concentrações decrescentes de cópias de RNA viral de CHIKV diluídas em série. Os resultados obtidos para o parâmetro de detecção estão dispostos na tabela 13 a seguir:

Tabela 13 – Percentuais de resultados de amostras positivas de CHIKV diluído em soro humano negativo para a estimativa do LD95% da RT-qPCR

Concentração (cópias/ μ L)	Nº de réplicas testadas (n)	Nº de réplicas detectadas (p)	% de detecção (p/n x 100)
100	24	24	100%
50	24	24	100%
25	24	24	100%

12,5	24	24	100%
6,25	24	23	95,83%
3,125	24	24	100%

Continuação Tabela 13

Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

A estimativa da sensibilidade analítica é baseada no critério que leva em consideração a menor concentração de material genético alvo do vírus estudado que apresente resultados detectáveis em, pelo menos, 95% das amostras analisadas. Desta forma, de acordo com os percentuais demonstrados na tabela 13, todas as concentrações obedeceram ao critério estabelecido para o parâmetro (LD 95%), revelando que a concentração viral estimada de maneira empírica se encontra em torno de 3,125 cópias/ μ L.

6.4.7 Especificidade analítica ou Seletividade

Com o objetivo de avaliar a especificidade analítica do método, foram obtidos os valores de C_q das amostras de vírus individuais e dos *pools* virais, observados na figura 16 de acordo com as posições já ilustradas na figura 7 da seção 5.8.7.

Figura 16 – Resultados experimentais, em C_q , das amostras virais testadas para o parâmetro de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR

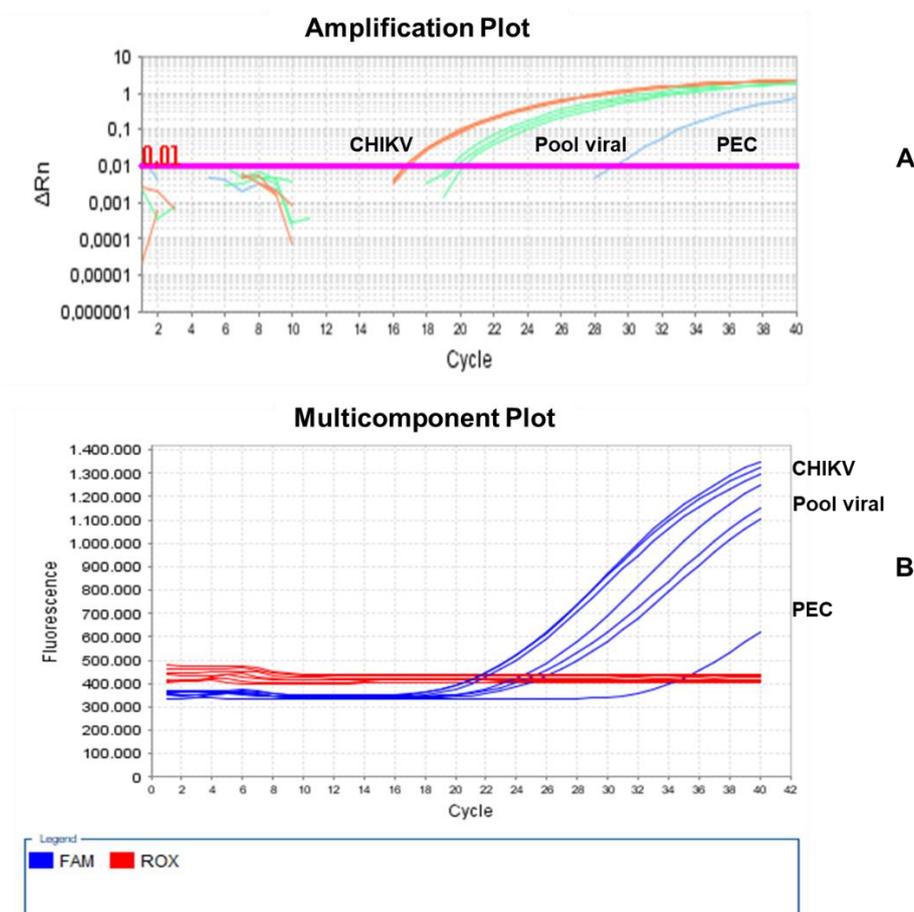
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	14,24	14,35	17,64	17,78	21,23	21,45	24,46	24,50	27,28	27,44	30,46	30,57
B	13,99	14,02	17,50	17,65	20,97	21,18	24,45	24,24	26,88	27,33	30,47	30,60
C	16,69	16,94	16,78	ND	ND	ND	Poço vazio					
D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Poço vazio					
E	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Poço vazio					
F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Poço vazio					
G	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	Poço vazio	ND	ND
H	19,35	19,79	20,28	Poço vazio	29,22	ND						

Esquema da placa contendo os resultados do parâmetro de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR para o vírus Chikungunya. ND, não detectado. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Os valores de C_q obtidos nesta análise revelaram que os resultados foram considerados adequados, pois as amplificações observadas foram condizentes à especificidade esperada para o ensaio. Como pode ser visto na figura 16, os poços C1, C2 e C3, que receberam amostras individuais de CHIKV, apresentaram C_q menores do que os poços H1, H2 e H3, inoculados com os *pools* virais. Este padrão era o desejado já que as amostras presentes nos últimos poços citados continham uma concentração inicial de genoma de CHIKV menor do que aqueles que receberam somente amostras do vírus alvo puro, devido à diluição do *pool* viral (padrão confirmado pela figura 17).

Além disso, como pode ser verificado, em nenhum outro poço contendo vírus passíveis de reatividade cruzada, foram detectados sinais fluorescentes, o que demonstra que a metodologia foi capaz de detectar exclusivamente o genoma de CHIKV. A partir destes resultados também foi possível demonstrar a ausência de contaminação cruzada na reação, bem como nos poços destinados ao NEC e NTC.

Figura 17 – Gráfico de amplificação (*Amplification Plot*) e gráfico de multicomponentes (*Multicomponent Plot*) para as amostras testadas na etapa de especificidade analítica/seletividade da RT-qPCR



Em A podem ser observadas as curvas de amplificação das amostras individuais puras de CHIKV (em laranja), dos *pools* virais testados (em verde) e do controle PEC (em azul), já em B estão demonstradas as

curvas de fluorescência das amostras puras individuais de CHIKV, dos *pools* virais e do controle PEC, todas em azul. *Amplification Plot*, Gráfico de amplificação, *Multicomponent Plot*, Gráfico de multicomponentes, FAM, fluoróforo de comprimento de onda de, aproximadamente, 494-515 nm, ROX, fluoróforo de comprimento de onda de, aproximadamente, 575-602 nm. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

A capacidade do método em detectar o alvo de interesse e o seu desempenho da etapa de extração do RNA viral foi corroborado com a realização da extração de ácidos nucleicos, seguida da reação de RT-qPCR de 30 amostras clínicas positivas para CHIKV, das quais os valores de C_q e cópias/volume obtidos encontram-se na tabela 14:

Tabela 14 – Resultados de RT-qPCR das amostras clínicas analisadas para especificidade analítica

Amostra	C_q médio	Concentração (cópias/ μ L)	Concentração (cópias/mL)
1	23,626	12804,725	5762126,294
2	24,243	8401,858	3780836,060
3	20,183	138647,758	63664786,751
4	23,622	12886,389	5798874,902
5	29,818	178,579	80360,620
6	27,740	749,127	337106,964
7	22,623	25650,177	11542579,541
8	29,045	303,809	136713,991
9	23,422	14738,209	7369104,492
10	23,480	14208,475	6393813,574
11	22,103	36889,738	16853179,925
12	25,077	4712,317	2174915,377
13	25,432	3679,353	1742851,318
14	23,660	12563,381	5653521,606
15	23,766	11651,731	5377722,206
16	23,448	14893,331	7446665,527
17	26,584	1662,593	787544,263
18	27,605	822,183	369982,507
19	30,678	99,271	45817,443
20	23,522	13899,362	6415090,294
21	27,788	725,080	326286,104
22	31,422	59,162	27305,715
23	22,685	24562,791	11336672,776
24	22,686	24505,035	11310016,226
25	22,684	24680,370	11390940,054
26	23,891	10754,979	4963836,689
27	31,594	52,326	23546,617
28	22,568	26786,889	12426907,116
29	23,317	15911,122	7160004,712
30	28,162	559,869	257082,629
NTC	ND	ND	ND

NEC	ND	ND	ND
PEC	30,397	119,473	53762,840

Continuação Tabela 14

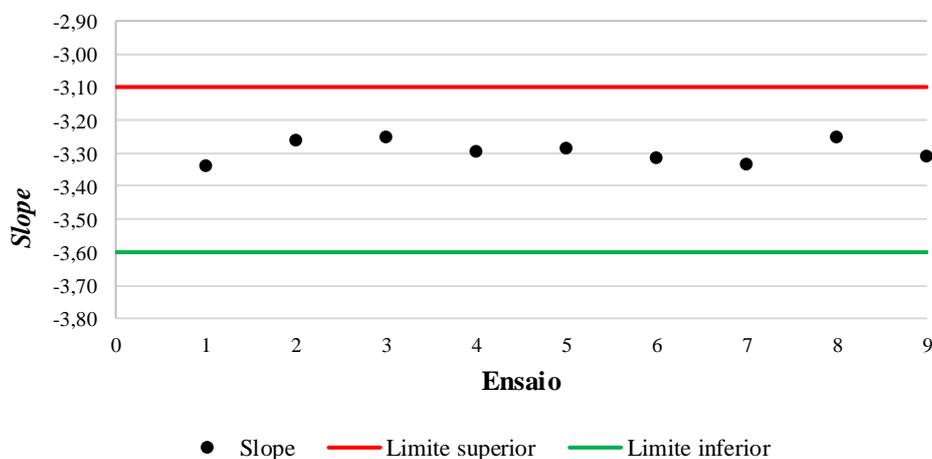
Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Apesar de nenhuma das amostras clínicas analisadas ter apresentado resultado negativo, o intervalo de valores de C_q variou de 20,183 a 31,594, indicando uma abrangente capacidade de detecção específica nas amostras contendo material genético alvo em concentrações relativamente variáveis. Diante destes resultados, foi possível verificar que o método permitiu a detecção do RNA viral desejado de maneira satisfatória e de acordo com o esperado, podendo, então, considerá-lo aceitável quanto à especificidade analítica para CHIKV quando comparados a outros vírus. Este resultado indica que, embora o método tenha sido desenvolvido para o monitoramento do título de estoques virais candidatos a vacinas, este também poderia ser aplicado à determinação da carga viral de amostras clínicas.

6.4.8 Controle de qualidade da RT-qPCR

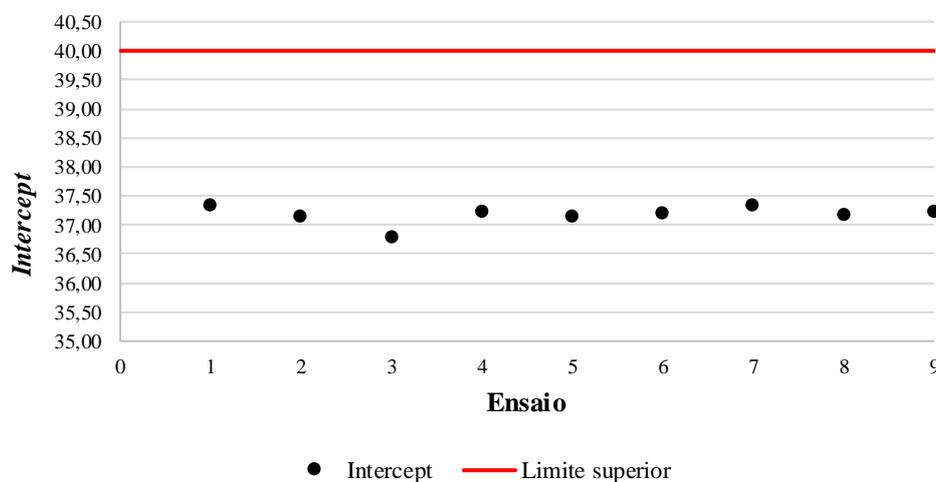
Com o objetivo de monitorar o desempenho da curva padrão obtido ao longo dos ensaios, a fim de garantir sua manutenção dentro dos limites previamente estabelecidos para a técnica de RT-qPCR foram realizados gráficos controle para os parâmetros críticos da curva padrão (*slope*, *intercept* e R^2), conforme demonstrado a seguir.

Gráfico 7 – Gráfico controle dos valores de *slope* obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya



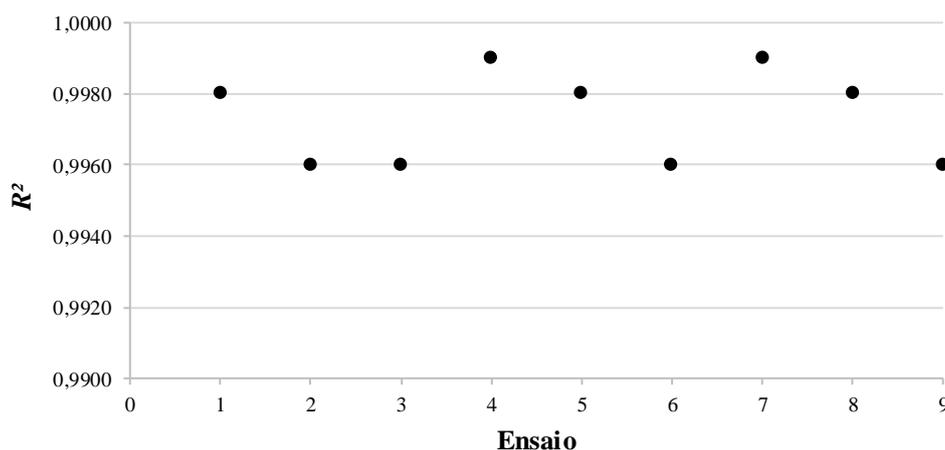
Distribuição dos valores de *slope* obtidos na curva padrão empregada em cada um dos ensaios de RT-qPCR realizados. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

Gráfico 8 – Gráfico controle dos valores de *intercept* obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya



Distribuição dos valores de *intercept* obtidos na curva padrão empregada em cada um dos ensaios de RT-qPCR realizados. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

Gráfico 9 – Gráfico controle dos valores de R^2 obtidos em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya

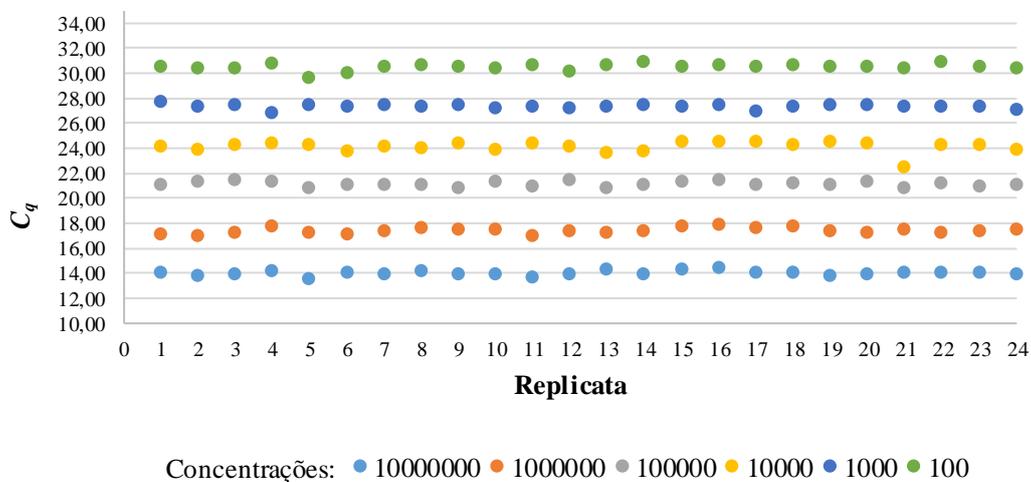


Distribuição dos valores de R^2 obtidos na curva padrão empregada em cada um dos ensaios de RT-qPCR realizados. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

Como observados nos gráficos 7, 8 e 9, os parâmetros críticos da curva de calibração mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis pré-estabelecidos para a metodologia estudada, demonstrando uma boa adequação aos critérios de aceitação dos ensaios. O acompanhamento dos valores de C_q de todas as curvas padrão aplicadas nos

ensaios da validação da RT-qPCR demonstraram que estes mantiveram um padrão sem apresentar grandes variações entre as replicatas de cada uma das concentrações analisadas, como pode ser visto no gráfico 10.

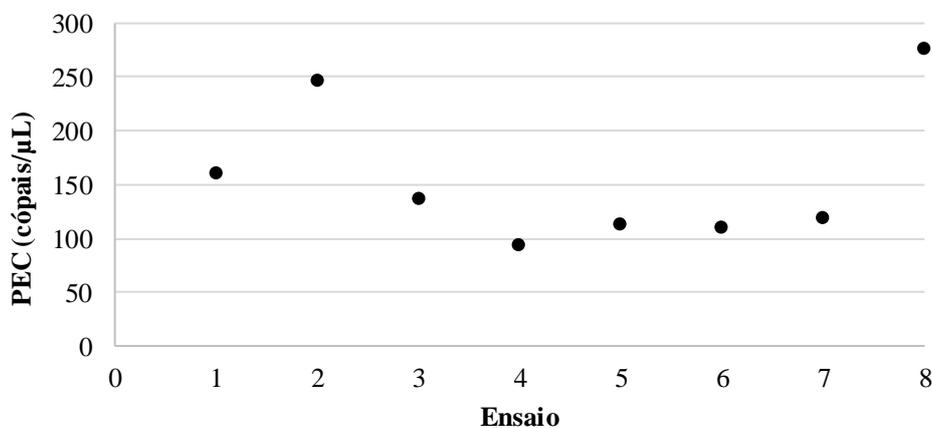
Gráfico 10 – Gráfico controle dos valores de C_q obtidos de todas as replicatas das curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya



Distribuição dos valores de C_q obtidos para todas as concentrações das curvas padrão empregadas nos ensaios de RT-qPCR realizados. C_q , *quantification cycle*. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

Além disso, o monitoramento dos valores obtidos para as amostras contendo 1×10^2 cópias/ μL de CHIKV diluído em soro humano negativo utilizadas como PEC demonstrou baixas concentrações conforme o esperado. Os valores estão demonstrados no gráfico 11 a seguir.

Gráfico 11 – Gráfico controle dos valores de PEC obtidos de amostras de CHIKV diluído em soro humano negativo em todas as curvas padrão empregadas nos ensaios de validação da RT-qPCR



Distribuição dos valores de PEC, em cópias/ μL , obtidos para as amostras de controle PEC extraídos de soro humano negativo inoculado com CHIKV em cada um dos ensaios de RT-qPCR realizados. PEC, *positive*

extraction control (controle positivo de extração); C_q , *quantification cycle*. Fonte: LATEV – Bio-Manguinhos

6.5 Avaliação da influência de diferentes matrizes na metodologia RT-qPCR

Após as análises de desempenho da metodologia de RT-qPCR em matriz soro humano negativo, decidiu-se avaliar como os parâmetros de precisão e exatidão em amostras de CHIKV diluídos na matriz utilizada para a incubação viral durante o processo de produção de bancos de trabalho, conforme descrito na seção 5.4, para verificar uma possível influência do soro nas etapas de extração do RNA viral e reação de qPCR.

Essa avaliação objetivou, ainda, melhor representar a realidade das demandas do laboratório, onde as análises de quantificação das produções virais são provenientes de vírus mantidos em meio de cultura 199 Earle suplementado. Assim, nessa avaliação foram realizadas análises com foco nesses dois parâmetros, que não alcançaram os critérios predeterminados para o método na avaliação realizada em matriz soro humano negativo. Deve ser ressaltado que os resultados obtidos e demonstrados nessa seção não foram submetidos às análises do SEVAN/LAMEV, pois a testagem de novas matrizes representou um estudo preliminar com o intuito de avaliar se alguma dessas matrizes seria capaz de revelar resultados favoráveis que permitissem a continuidade do estudo de validação da RT-qPCR.

Apesar de todas as possíveis causas sugeridas durante a discussão acerca da inadequação dos resultados aos critérios estabelecidos para esses parâmetros, optou-se por priorizar a avaliação do desempenho da metodologia para uma matriz capaz de melhor representar os processos realizados no laboratório ao invés de testar diferentes modificações no desenho experimental variando, por exemplo, número de replicatas e a faixa de concentração já estabelecida.

Para isso, foram gerados painéis constituídos por diluições seriadas de fator 10, contendo cinco concentrações decrescentes de meio de cultura 199 Earle suplementado inoculado com CHIKV, conforme descrito na seção 5.8.3. Diferentemente dos painéis constituídos em matriz soro humano negativo, nesses não foi realizada uma diluição ajustada de 1:5 do vírus previamente à diluição dos painéis justamente para averiguar se essa diluição pode ter interferido nas diluições seriadas posteriores, refletindo nos resultados insatisfatórios, verificados na seção 6.4, para os critérios de precisão e exatidão. Os critérios de execução e aceitação dos ensaios determinados para o estudo da RT-qPCR em matriz soro humano foram os mesmos aplicados para essa avaliação. Os

resultados de precisão obtidos para todas as réplicas das concentrações analisadas podem ser verificados na tabela 15.

Tabela 15 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária

Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Resultados (cópias/ μ L)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	$1,0 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$7,30 \times 10^5$	$7,24 \times 10^5$	$8,98 \times 10^5$	$3,87 \times 10^5$	$5,08 \times 10^5$	$5,54 \times 10^5$	$8,15 \times 10^5$
A	$1,0 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$	$6,21 \times 10^4$	$5,68 \times 10^4$	$5,70 \times 10^4$	$6,12 \times 10^4$	$3,62 \times 10^4$	$5,98 \times 10^4$	$6,59 \times 10^4$
A	$1,0 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$	$9,33 \times 10^3$	$6,29 \times 10^3$	$6,29 \times 10^3$	$4,56 \times 10^3$	$3,57 \times 10^3$	$2,99 \times 10^3$	$4,65 \times 10^3$
A	$1,0 \times 10^3$	$1,26 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$	$9,60 \times 10^2$	$9,02 \times 10^2$	$1,52 \times 10^3$	$1,36 \times 10^3$	$6,52 \times 10^2$	$1,07 \times 10^3$
A	$1,0 \times 10^2$	$1,08 \times 10^2$	$7,33 \times 10^1$	$8,95 \times 10^1$	$9,32 \times 10^1$	$7,03 \times 10^1$	$6,34 \times 10^1$	$8,80 \times 10^1$	$5,99 \times 10^1$
B	$1,0 \times 10^6$	$1,43 \times 10^6$	$1,42 \times 10^6$	$9,39 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$	$3,53 \times 10^5$	$2,24 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5$	$3,84 \times 10^5$
B	$1,0 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5$	$1,01 \times 10^5$	$5,04 \times 10^4$	$6,22 \times 10^4$	$2,72 \times 10^4$	$2,11 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$	$5,63 \times 10^4$
B	$1,0 \times 10^4$	$1,06 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$	$9,39 \times 10^3$	$6,34 \times 10^3$	$3,59 \times 10^3$	$2,50 \times 10^3$	$2,63 \times 10^3$	$2,13 \times 10^3$
B	$1,0 \times 10^3$	$9,09 \times 10^2$	$1,28 \times 10^3$	$8,10 \times 10^2$	$7,03 \times 10^2$	$4,53 \times 10^2$	$3,05 \times 10^2$	$1,82 \times 10^2$	$4,44 \times 10^2$
B	$1,0 \times 10^2$	$8,33 \times 10^1$	$8,71 \times 10^1$	$7,69 \times 10^1$	$7,66 \times 10^1$	$5,31 \times 10^1$	$2,63 \times 10^1$	$3,06 \times 10^1$	$2,74 \times 10^1$
C	$1,0 \times 10^6$	$7,95 \times 10^5$	$6,31 \times 10^5$	$4,80 \times 10^5$	$2,75 \times 10^5$	$9,41 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$	$2,29 \times 10^5$	$4,48 \times 10^5$
C	$1,0 \times 10^5$	$5,83 \times 10^4$	$6,12 \times 10^4$	$5,88 \times 10^4$	$5,91 \times 10^4$	$4,52 \times 10^4$	$4,30 \times 10^4$	$3,30 \times 10^4$	$2,81 \times 10^4$
C	$1,0 \times 10^4$	$5,38 \times 10^3$	$4,91 \times 10^3$	$2,73 \times 10^3$	$3,77 \times 10^3$	$3,74 \times 10^3$	$4,54 \times 10^3$	$3,46 \times 10^3$	$3,56 \times 10^3$
C	$1,0 \times 10^3$	$5,90 \times 10^2$	$5,93 \times 10^2$	$4,05 \times 10^2$	$4,45 \times 10^2$	$5,64 \times 10^2$	$5,05 \times 10^2$	$2,66 \times 10^2$	$4,87 \times 10^2$
C	$1,0 \times 10^2$	$4,97 \times 10^1$	$4,97 \times 10^1$	$3,96 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	$6,72 \times 10^1$	$3,44 \times 10^1$	$4,07 \times 10^1$	$5,19 \times 10^1$

Fonte: Própria autoria

De acordo com os dados apresentados, foi construído um sumário estatístico (Tabela 16) com o objetivo de avaliar o grau de dispersão dos resultados experimentais obtidos, no qual podem ser verificados os valores estimados para as medidas de localização e variabilidade.

Tabela 16 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado

Concentração teórica (cópias/ μ L)	Analista	Número de resultados (n)	Média	Desvio Padrão	CV% (repetibilidade)	CV% (precisão intermediária)
$1,0 \times 10^6$	A	8	714838,03	230064,89	32,18	56,94
	B	8	686392,50	508724,02	74,12	
	C	8	492453,47	281482,03	57,16	
$1,0 \times 10^5$	A	8	65478,66	25630,19	39,14	44,66
	B	8	59050,50	34339,87	58,15	
	C	8	48324,28	12953,77	26,81	
$1,0 \times 10^4$	A	8	6063,38	2705,59	44,62	52,96
	B	8	6097,49	3930,81	64,47	
	C	8	4011,24	865,68	21,58	

1,0 x 10 ³	A	8	1115,10	277,53	24,89	
	B	8	635,05	359,35	56,59	51,31
	C	8	481,79	110,56	22,95	
1,0 x 10 ²	A	8	80,66	16,52	20,48	
	B	8	57,67	26,46	45,89	41,12
	C	8	43,26	15,77	36,46	

Continuação Tabela 16

Fonte: Própria autoria

Como é possível verificar, os dados apresentados na tabela acima revelam uma característica de dispersão aumentada para os resultados experimentais obtidos, representada pelos coeficientes de variação (CV%), demonstrando uma elevada variabilidade dos resultados em todos os níveis de concentrações plasmidiais analisados (valores em destaque na tabela 16), assim como ocorreu para os resultados das análises em matriz soro humano negativo. Portanto, os critérios estabelecidos para aceitação dos ensaios ($CV\% \leq 25\%$) não foram cumpridos, tanto para repetibilidade, quanto para precisão intermediária.

Como já foi citado durante a discussão dos resultados de CHIKV diluído em matriz soro humano, é esperada uma menor variação entre os resultados obtidos para a repetibilidade do que para a precisão intermediária. Entretanto, não foi o que observamos para a análise individual das corridas, não sendo essa premissa comprovada com os resultados aqui apresentados.

Em comparação aos resultados das análises do parâmetro de precisão de CHIKV em matriz soro humano, apesar de a repetibilidade (CV% entre as replicatas) ter sido maior em matriz meio de cultura 199 Earle suplementado, a precisão intermediária entre os operadores foi, em geral, menor. Além disso, foi observado um decaimento nas quantificações das replicatas analisadas (resultados experimentais) com relação às concentrações teóricas esperadas.

As análises para o parâmetro de exatidão do método foram determinadas por meio do cálculo de recuperação percentual média das concentrações predeterminadas de cópias de RNA viral de CHIKV, sendo utilizados os resultados obtidos para o parâmetro de precisão como base para o cálculo dessas recuperações. Os resultados das recuperações percentuais médias obtidos de todas as réplicas analisadas estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado para a avaliação da exatidão da RT-qPCR

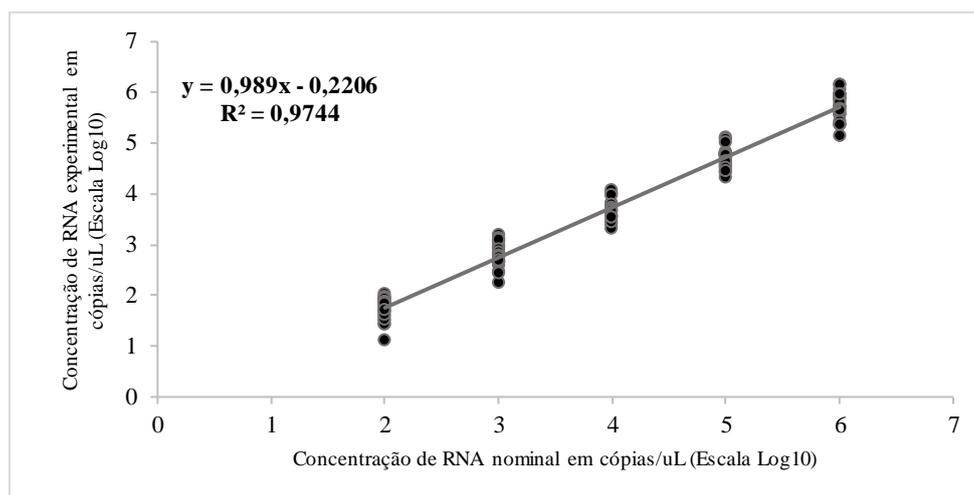
Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Recuperações %							
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	$1,0 \times 10^6$	110,28	73,03	72,39	89,81	38,70	50,83	55,35	81,48
	$1,0 \times 10^5$	124,88	62,09	56,78	56,99	61,17	36,16	59,82	65,94
	$1,0 \times 10^4$	105,77	93,25	62,91	65,50	45,56	35,73	29,88	46,45
	$1,0 \times 10^3$	125,51	120,34	95,98	90,24	152,16	136,06	65,20	106,59
	$1,0 \times 10^2$	107,71	73,25	89,46	93,24	70,27	63,43	87,98	59,93
B	$1,0 \times 10^6$	143,46	141,60	93,90	51,03	35,32	22,40	23,00	38,40
	$1,0 \times 10^5$	117,36	101,46	50,35	62,17	27,23	21,11	36,44	56,28
	$1,0 \times 10^4$	106,28	115,55	93,95	63,39	35,95	25,03	26,34	21,31
	$1,0 \times 10^3$	90,85	127,53	81,01	70,27	45,30	30,52	18,18	44,38
	$1,0 \times 10^2$	83,34	87,07	76,94	76,57	53,06	26,32	30,64	27,41
C	$1,0 \times 10^6$	79,50	63,06	48,02	27,47	94,15	14,14	22,86	44,76
	$1,0 \times 10^5$	58,26	61,16	58,83	59,13	45,15	43,01	32,99	28,06
	$1,0 \times 10^4$	53,82	49,09	27,26	37,70	37,40	45,36	34,62	35,65
	$1,0 \times 10^3$	59,04	59,32	40,47	44,50	56,42	50,46	26,56	48,66
	$1,0 \times 10^2$	49,68	49,66	39,59	13,03	67,19	34,40	40,69	51,85

Fonte: Própria autoria

De acordo com a tabela 17 e os valores em destaque na mesma, é possível verificar que os resultados obtidos para as recuperações percentuais médias das réplicas processadas não atenderam ao critério proposto para o parâmetro de exatidão, que compreende a faixa entre 75% e 125% em relação à concentração nominal, tal observação justificada pela elevada variabilidade ocorrida em todos os níveis de concentrações de cópias de RNA viral analisadas.

A curva de linearidade de resposta apresentada no gráfico 12 demonstrou que, com base na correlação dos resultados obtidos entre os valores das concentrações virais experimentais e nominais, levando em consideração os coeficientes de correlação (r) ($r = 0,9871 > 0,990$) e de determinação (R^2) ($R^2 = 0,9744 < 0,990$) obtidos, que o parâmetro de exatidão para o vírus inoculado nessa matriz não foi alcançado, impedindo que os coeficientes da curva ajustada e seus coeficientes de correlação fossem considerados para o parâmetro analisado.

Gráfico 12 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado



B	57,66907
C	43,26097

Continuação Tabela 18

Fonte: Própria autoria

Como a tentativa de obter resultados satisfatórios para os parâmetros de precisão e exatidão a partir da modificação da matriz empregada na diluição do vírus de interesse não foi alcançada, levantou-se a hipótese de que o problema raiz estivesse no equipamento de extração semiautomática utilizado para a realização dos ensaios.

Para verificar essa possibilidade, foi realizado um teste com vírus Zika, o qual encontra-se validado para a mesma metodologia de extração de ácidos nucleicos. Para isso, um dos painéis extras de ZIKV diluído em soro humano negativo, gerado para o processo de sua validação, teve seu RNA extraído. Na etapa da qPCR, esse foi comparado com uma nova quantificação do RNA viral de um dos painéis extraídos e testado durante a validação, acondicionado em freezer -80 °C desde a finalização dos ensaios de validação desse vírus. Desta comparação não foram observadas variações que revelassem algum tipo de problema causado pelo equipamento utilizado para a extração do RNA viral, nem mesmo que a relacionasse a um problema referente à matriz (soro humano negativo) utilizada na diluição dos painéis (dados não apresentados). Assim, decidiu-se investigar um novo painel de ZIKV inoculado em matriz meio de cultura 199 Earle suplementado para avaliar se a variabilidade entre as replicatas seria aceitável, da mesma maneira como ocorre em soro humano negativo.

Da mesma maneira que observado nos resultados do vírus diluído em matriz soro, em matriz meio de cultura 199 Earle suplementado o vírus ZIKV apresentou CV% dentro do aceitável para a metodologia (dados não apresentados).

Livre da desconfiança com o equipamento de extração semiautomática de ácidos nucleicos utilizado nos estudos, a atenção foi, então, redirecionada ao vírus de interesse, o CHIKV. Uma nova investigação a respeito da constituição da matriz empregada foi feita com o intuito de verificar se os suplementos utilizados no meio de cultura 199 Earle seriam a fonte das variações obtidas entre as replicatas analisadas. Dessa vez, foram gerados dois pequenos painéis constituídos por três replicatas para cada uma das concentrações analisada, onde: um deles o vírus foi inoculado em meio de cultura 199 Earle suplementado, conforme os estudos anteriores, e o outro, em meio de cultura 199 Earle não suplementado, sendo ambos extraídos por meio da extração semiautomática. Esses painéis foram constituídos por replicatas do CHIKV puro, ou seja, sem diluição, e

de diluições seriadas de fator 10 desse vírus, de 10^5 a 10^2 cópias/ μ L, para a avaliação da quantificação obtida para cada uma das matrizes empregadas. Na tabela 19 estão demonstrados os resultados dessa comparação.

Tabela 19 – Resultados experimentais da RT-qPCR para CHIKV diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado e não suplementado

Amostra	Extração semiautomática			
	Cópias/uL	Média Cópias/uL	Desvio Padrão (cópias/uL)	CV% (cópias/uL)
1,0 x 10⁶ CHIKV puro	2,60 x 10 ⁶			
	2,26 x 10 ⁶	2,92 x 10 ⁶	8,65 x 10 ⁵	29,62
	3,90 x 10 ⁶			
1,0 x 10⁵ Não suplementado	3,23 x 10 ⁵			
	3,10 x 10 ⁵	3,73 x 10 ⁵	9,90 x 10 ⁴	26,51
	4,87 x 10 ⁵			
1,0 x 10⁵ Suplementado	9,45 x 10 ⁴			
	1,39 x 10 ⁵	1,46 x 10 ⁵	5,53 x 10 ⁴	37,90
	2,04 x 10 ⁵			
1,0 x 10⁴ Não suplementado	4,04 x 10 ⁴			
	5,83 x 10 ⁴	5,17 x 10 ⁴	9,78 x 10 ³	18,94
	5,62 x 10 ⁴			
1,0 x 10⁴ Suplementado	2,63 x 10 ⁴			
	1,87 x 10 ⁴	2,09 x 10 ⁴	4,68 x 10 ³	22,41
	1,77 x 10 ⁴			
1,0 x 10³ Não suplementado	4,28 x 10 ³			
	3,16 x 10 ³	4,51 x 10 ³	1,48 x 10 ³	32,76
	6,09 x 10 ³			
1,0 x 10³ Suplementado	2,37 x 10 ³			
	2,62 x 10 ³	1,94 x 10 ³	9,68 x 10 ²	49,90
	8,31 x 10 ²			
1,0 x 10² Não suplementado	6,10 x 10 ²			
	3,78 x 10 ²	4,67 x 10 ²	1,25 x 10 ²	26,83
	4,12 x 10 ²			
1,0 x 10² Suplementado	1,80 x 10 ²			
	1,55 x 10 ²	1,46 x 10 ²	3,85 x 10 ¹	26,36
	1,04 x 10 ²			

Fonte: Própria autoria

Os resultados dessa investigação revelaram elevadas variações nas quantificações obtidas entre as replicatas analisadas, demonstradas por meio dos CV% > 25%. Essa variação só não foi obtida para a concentração teórica de 10^4 cópias/ μ L. Apesar de ambas as condições avaliadas não terem atendido ao critério predeterminado, vale destacar que as quantificações médias das replicatas analisadas em CHIKV inoculado em meio de cultura 199 Earle não suplementado revelaram-se maiores do que às quantificações do vírus diluído em meio de cultura 199 Earle suplementado. Como os resultados obtidos nessas análises também não foram satisfatórias, o estudo não foi estendido para a avaliação das recuperações percentuais de RNA viral para a verificação do parâmetro de exatidão.

Diante de todas as tentativas e avaliações realizadas até este momento, optou-se por uma última análise empregando como matriz para a diluição do CHIKV o tampão fosfato (PBS), diluente bastante empregado para a diluição de diferentes substâncias. Assim como nas avaliações anteriores, foram gerados três painéis constituídos por diluições seriadas de fator 10, contendo cinco concentrações decrescentes de PBS inoculado com CHIKV, nas concentrações 1×10^6 a 1×10^2 cópias/ μ L.

O estudo foi iniciado a partir da extração semiautomática de ácidos nucleicos realizadas por um dos operadores (Analista A) para a testagem de um dos painéis gerados. Entretanto, da mesma maneira que ocorreu para todas as testagens anteriores, em soro humano negativo, meio de cultura 199 Earle suplementado e não suplementado, as amostras de CHIKV inoculadas em PBS não atenderam aos parâmetros aceitáveis predeterminados para o método.

Com base em todos os resultados insatisfatórios das extrações realizadas pela metodologia semiautomática, decidiu-se avaliar os resultados da extração dos outros dois painéis por meio da extração do RNA viral por meio do método manual, sendo um deles testado pelo analista A, o mesmo que realizou a extração do primeiro painel pela metodologia semiautomática, e o outro, pelo analista B. Essa última abordagem teve o objetivo de verificar possíveis erros na execução da etapa de extração do RNA viral entre os analistas. Na tabela 20, a seguir, estão demonstrados os resultados obtidos para os ensaios realizados por ambas as metodologias citadas.

Tabela 20 – Resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em PBS para estimativa da repetibilidade e da precisão intermediária

Extração	Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Resultados (cópias/ μ L)							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Semiautomática	A	$1,0 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	$1,95 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	$8,70 \times 10^5$	$5,43 \times 10^5$	$6,24 \times 10^5$	$1,02 \times 10^6$	$2,81 \times 10^5$
	A	$1,0 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$5,01 \times 10^4$	$8,14 \times 10^4$	$8,07 \times 10^4$	$5,72 \times 10^4$	$4,28 \times 10^4$	$4,52 \times 10^4$	$1,16 \times 10^5$
	A	$1,0 \times 10^4$	$4,54 \times 10^3$	$4,75 \times 10^3$	$2,44 \times 10^3$	$5,49 \times 10^3$	$3,21 \times 10^3$	$2,92 \times 10^3$	$3,31 \times 10^3$	$3,38 \times 10^3$
	A	$1,0 \times 10^3$	$6,33 \times 10^2$	$5,18 \times 10^2$	$3,20 \times 10^2$	$3,25 \times 10^2$	$2,45 \times 10^2$	$2,41 \times 10^2$	$1,96 \times 10^2$	$3,30 \times 10^2$
	A	$1,0 \times 10^2$	$8,87 \times 10^1$	$4,40 \times 10^1$	$5,77 \times 10^1$	$4,00 \times 10^1$	$1,39 \times 10^1$	$3,40 \times 10^1$	$1,69 \times 10^1$	$1,75 \times 10^1$
Manual	A	$1,0 \times 10^6$	$3,44 \times 10^6$	$5,56 \times 10^6$	$2,99 \times 10^6$	$3,74 \times 10^6$	$1,75 \times 10^6$	$1,95 \times 10^6$	$2,12 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6$
	A	$1,0 \times 10^5$	$1,89 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$	$1,68 \times 10^5$	$1,53 \times 10^5$	$1,12 \times 10^5$	$1,32 \times 10^5$	$1,41 \times 10^5$
	A	$1,0 \times 10^4$	$9,36 \times 10^3$	$1,03 \times 10^4$	$1,01 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$	$4,89 \times 10^3$	$5,11 \times 10^3$	$5,99 \times 10^3$	$6,21 \times 10^3$
	A	$1,0 \times 10^3$	$9,24 \times 10^2$	$9,27 \times 10^2$	$8,66 \times 10^2$	$7,20 \times 10^2$	$9,09 \times 10^2$	$7,01 \times 10^2$	$6,97 \times 10^2$	$9,73 \times 10^2$
	A	$1,0 \times 10^2$	$6,18 \times 10^1$	$1,47 \times 10^2$	$8,00 \times 10^1$	$6,87 \times 10^1$	$8,32 \times 10^1$	$5,55 \times 10^1$	$7,61 \times 10^1$	$8,00 \times 10^1$
	B	$1,0 \times 10^6$	$3,18 \times 10^6$	$4,53 \times 10^6$	$3,25 \times 10^6$	$2,05 \times 10^6$	$1,59 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$	$1,98 \times 10^6$	$2,83 \times 10^6$
	B	$1,0 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$	$1,93 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$	$1,08 \times 10^5$	$7,41 \times 10^4$	$7,82 \times 10^4$	$6,70 \times 10^4$	$1,85 \times 10^5$
	B	$1,0 \times 10^4$	$6,36 \times 10^3$	$4,61 \times 10^3$	$4,64 \times 10^3$	$4,55 \times 10^3$	$4,18 \times 10^3$	$4,17 \times 10^3$	$4,54 \times 10^3$	$3,83 \times 10^3$
	B	$1,0 \times 10^3$	$7,26 \times 10^2$	$5,57 \times 10^2$	$7,87 \times 10^2$	$3,21 \times 10^2$	$5,88 \times 10^2$	$4,43 \times 10^2$	$4,22 \times 10^2$	$3,60 \times 10^2$
	B	$1,0 \times 10^2$	$1,64 \times 10^2$	$5,30 \times 10^1$	$8,52 \times 10^1$	$6,17 \times 10^1$	$4,79 \times 10^1$	$4,69 \times 10^1$	$4,91 \times 10^1$	$7,96 \times 10^1$

Fonte: Própria autoria

Com base nos resultados demonstrados na tabela acima, foi construído um sumário estatístico para a avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais (Tabela 21).

Tabela 21 – Sumário estatístico das concentrações teóricas para avaliação do grau de dispersão dos resultados experimentais de RT-qPCR em amostras de CHIKV diluído em PBS

Concentração teórica (cópias/ μ L)	Analista	Número de resultados (n)	Média	Desvio Padrão	CV% (repetibilidade)	CV% (precisão intermediária)
$1,0 \times 10^6$	A	8	956734,18	513530,46	53,68	58,69
	A	8	2997936,98	1256757,99	41,92	
	B	8	2678710,67	966877,29	36,09	
$1,0 \times 10^6$	A	8	71678,54	27097,24	37,80	43,00
	B	8	128428,04	52562,07	40,93	
$1,0 \times 10^4$	A	8	3755,98	3755,98	27,82	43,73
	A	8	7804,68	7804,68	31,82	
	B	8	4609,21	762,36	16,54	
$1,0 \times 10^3$	A	8	350,96	149,57	42,62	43,59
	A	8	839,63	114,47	13,63	
	B	8	525,51	169,21	32,20	
$1,0 \times 10^2$	A	8	39,09	25,24	64,56	54,81
	A	8	81,49	28,06	34,43	
	B	8	73,37	39,28	53,54	

Fonte: Própria autoria

Assim como obtido para as análises dos painéis de CHIKV diluídos em soro humano negativo e em meio de cultura 199 Earle suplementado, os resultados de repetibilidade e precisão intermediária ficaram fora do valor limite desejado que seria $CV\% \leq 25\%$ (valores em destaque na tabela 21). Além disso, nos painéis diluído em PBS também foi observado um decaimento nas quantificações das replicatas analisadas (resultados experimentais) com relação às concentrações teóricas esperadas, bem como a falta de linearidade entre as diluições de cada concentração estudada.

Os resultados obtidos para o parâmetro de precisão foram empregados para o cálculo da recuperação percentual média de cópias de RNA viral de CHIKV referente ao parâmetro de exatidão do método. Os resultados das recuperações percentuais médias obtidos estão apresentados na tabela 22 a seguir.

Tabela 22 – Resultados das recuperações percentuais médias das réplicas obtidas em amostras de CHIKV diluído em PBS para a avaliação da exatidão da RT-qPCR

Extração	Analista	Concentração (cópias/ μ L)	Recuperações %							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Semiautomática	A	$1,0 \times 10^6$	121,37	195,29	115,31	87,01	54,34	62,43	101,55	28,09
		$1,0 \times 10^5$	100,26	50,11	81,41	80,67	57,21	42,82	45,23	115,73
		$1,0 \times 10^4$	45,45	47,46	24,43	54,86	32,14	29,23	33,12	33,80
		$1,0 \times 10^3$	63,28	51,75	31,98	32,54	24,54	24,05	19,59	33,02
		$1,0 \times 10^2$	88,74	44,04	57,72	40,02	13,87	33,96	16,90	17,49
Manual	A	$1,0 \times 10^6$	343,78	555,92	299,29	374,28	175,12	194,54	212,49	242,94
		$1,0 \times 10^5$	188,88	199,51	153,82	168,42	152,52	112,20	132,26	140,74
		$1,0 \times 10^4$	93,58	103,17	100,65	105,40	48,45	51,12	59,87	62,14
		$1,0 \times 10^3$	92,41	92,66	86,59	72,02	90,94	70,12	69,70	97,27
		$1,0 \times 10^2$	61,78	146,66	79,96	68,71	83,16	55,49	76,11	80,03
	B	$1,0 \times 10^6$	318,49	453,22	324,57	204,76	158,73	202,09	198,17	282,94
		$1,0 \times 10^5$	171,66	192,87	150,75	108,22	74,09	78,20	66,99	184,65
		$1,0 \times 10^4$	63,62	46,07	46,40	45,46	41,82	41,72	45,37	38,28
		$1,0 \times 10^3$	72,58	55,73	78,72	32,12	58,82	44,29	42,17	35,96
		$1,0 \times 10^2$	163,56	52,98	85,17	61,69	47,94	46,88	49,11	79,63

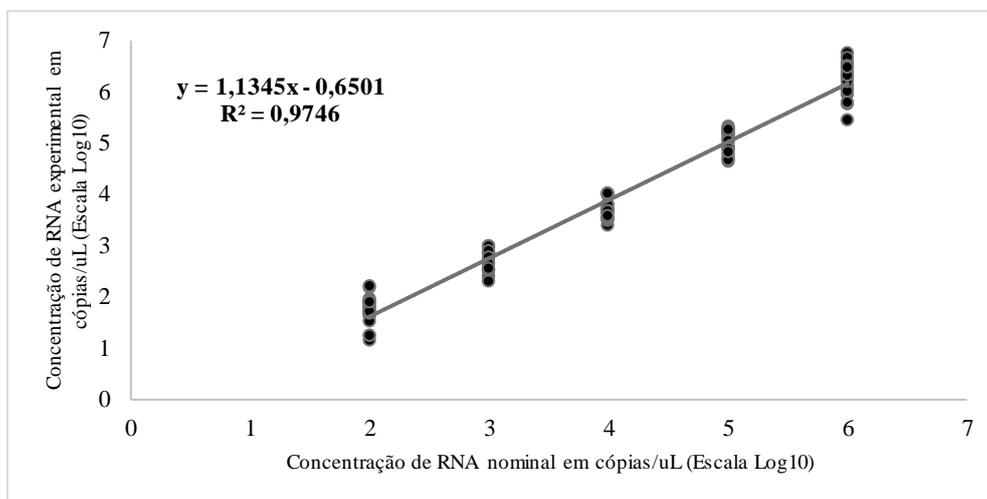
Fonte: Própria autoria

Observando os valores em destaque na tabela 22, verificou-se que muitas das recuperações percentuais médias das réplicas não ficaram compreendidas na faixa entre 75% e 125% em relação à concentração nominal, o que justifica o não atendimento do parâmetro de exatidão para o método.

A curva de linearidade de resposta apresentada no gráfico 13 para a matriz PBS, com base na correlação dos resultados obtida entre os valores das concentrações virais

experimentais e nominais e levando em consideração os coeficientes de correlação (r) ($r = 0,9872 < 0,990$) e de determinação (R^2) ($R^2 = 0,9746 < 0,990$) obtidos, demonstra que o parâmetro de exatidão exigido para a metodologia não foi alcançado nessa matriz. Logo, os coeficientes da curva ajustada e seus coeficientes de correlação não puderam ser considerados para o parâmetro analisado.

Gráfico 13 – Curva de linearidade de resposta da RT-qPCR para o parâmetro de exatidão de amostras de CHIKV diluído em PBS



Linearidade de resposta obtida, em Log10, entre os valores de RNA experimentais obtidos para as concentrações analisadas em amostras de CHIKV inoculadas em PBS e os valores de RNA nominais. Fonte: SEVAN – Bio-Manguinhos

Com base na tabela 23 verificou-se que as análises das recuperações médias por analistas não atenderam ao critério de aceitação para o parâmetro de exatidão em todas as concentrações teóricas analisadas, conforme os valores em destaque. Sendo assim, o método não foi capaz de revelar a quantificação de cópias de RNA viral de maneira exata.

Tabela 23 – Resultados de recuperação percentual média da RT-qPCR obtidos de amostras de CHIKV diluído em PBS por níveis de concentração e por analistas

Concentração teórica (cópias/ μ L)	Analista	Recuperação % média
1,0 x 10 ⁶	A	95,67342
	A	299,79370
	B	267,87107
1,0 x 10 ⁵	A	71,67854
	A	156,04416
	B	128,42804
1,0 x 10 ⁴	A	37,55982
	A	78,04684
	B	46,09214

1,0 x 10 ³	A	35,09552
	A	83,96262
	B	52,55053
1,0 x 10 ²	A	39,09040
	A	81,48833
	B	73,37000

Continuação Tabela 23

Fonte: Própria autoria

6.6 Considerações finais

A necessidade de desenvolver uma vacina contra o vírus Chikungunya está diretamente atrelada ao desenvolvimento de metodologias capazes de identificá-lo de maneira inequívoca e de quantificá-lo de maneira precisa, exata e rápida, possibilitando o acompanhamento das diferentes etapas de desenvolvimento e produção de um imunobiológico seguro e eficaz no combate da infecção por esse vírus. Para isso, essas metodologias devem atender determinados parâmetros de qualidade, estabelecidos por órgãos regulamentadores, que evidenciem a confiabilidade dos resultados por elas obtidos.

Nesse trabalho, duas metodologias de abordagens diferentes, uma baseada em cultivo celular (ensaio de plaque) e a outra, em biologia molecular (RT-qPCR), foram empregadas para avaliar o perfil replicativo do vírus Chikungunya. A quantificação obtida por ambas as abordagens foi comparada, revelando que a técnica de RT-qPCR representa uma abordagem promissora, podendo ser aplicada em estudos de quantificação do RNA viral em diferentes etapas do desenvolvimento de uma vacina para esse vírus. Com base nisso, a RT-qPCR foi submetida ao estudo de validação.

Devido a inexistência de um guia específico para a validação da técnica de qPCR e ao não atendimento completo de suas peculiaridades por parte das resoluções vigentes da ANVISA, foi necessário realizar um compilado dos parâmetros apropriados ao estudo baseado em guias, normas, resoluções de agências regulamentadoras nacionais e internacionais e referências da literatura sobre o assunto que melhor atendesse as características do método estudado.

Após analisar o vírus Chikungunya em diferentes matrizes (soro humano negativo, meio de cultura 199 Earle e PBS) foi observado que em nenhum dos casos foram alcançados os parâmetros de precisão e exatidão, os quais revelam,

respectivamente, a concordância dos resultados obtidos intra e interensaios e a capacidade do método em quantificar corretamente o número de cópias genômicas do alvo de interesse em uma amostra.

Apesar disso, o estudo mais completo realizado em matriz soro humano negativo revelou que o método foi capaz de identificar inequivocamente o vírus Chikungunya junto a outros vírus correlatos, bem como foi capaz de detectar, no estudo de limite de detecção, um pequeno número de cópias nas amostras testadas. Contudo, para as outras matrizes, não foi possível aprofundar esse estudo, a qual se faz necessária em investigações futuras.

Embora o estudo aqui realizado não tenha gerado resultados favoráveis ao cumprimento da validação da RT-qPCR para o vírus Chikungunya de acordo com os critérios estabelecidos pelos órgãos reguladores de processos de validação de métodos analíticos, sejam eles nacionais (ANVISA e INMETRO) ou internacionais (FDA, EPA e EMA), as limitações encontradas ao longo do processo não invalidam a aplicação da metodologia como uma alternativa para o acompanhamento do título viral em diferentes etapas produtivas de uma vacina, assim como em estudos de cinética viral.

Esse trabalho representa uma fonte de consulta para futuras propostas de validação dessa metodologia, onde foram demonstradas alternativas de matrizes que podem ser aplicadas ao estudo de outros vírus, podendo apresentar resultados favoráveis para a implementação da sua validação. Além disso, os resultados de validação da RT-qPCR que não alcançaram os objetivos propostos no trabalho permitem a continuidade do estudo, levando em consideração os erros e acertos obtidos e o aprimoramento do método no laboratório, oferecendo a Bio-Manguinhos uma maneira rápida e específica a ser aplicada para a retomada de projetos que envolvam o vírus Chikungunya.

Por fim, é importante ressaltar a urgente necessidade do empenho por parte dos órgãos regulamentadores para gerar um documento que se aproprie das especificidades referentes à metodologia de qPCR e determine, de maneira assertiva, os parâmetros imprescindíveis a serem avaliados e as faixas ou limites aceitos para cada um deles que possa ser aplicado em estudos de validação da técnica.

6.7 CONCLUSÕES

- O sequenciamento e alinhamento do vírus Chikungunya empregado nos ensaios revelou 99,97% de homologia com as cepas pertencentes à linhagem ECSA.
- Os resultados desse trabalho demonstraram que o vírus Chikungunya apresentou uma boa adaptação ao cultivo em células Vero.
- A cinética de replicação viral revelou uma ótima capacidade replicativa do vírus Chikungunya em células Vero, mesmo ao empregar uma MOI baixa (MOI 0,01). Além disso, elevados títulos virais puderam ser obtidos em menos de 24h pós-infecção (9,13 Log₁₀ cópias/mL e 8,37 Log₁₀ PFU/mL).
- A técnica de RT-qPCR foi padronizada com sucesso apresentando resultados adequados aos critérios de controle de qualidade avaliados.
- Os resultados de padronização da técnica de RT-qPCR nos permitiu empregar o método para a quantificação do vírus Chikungunya em amostras de cultivo de células Vero.
- Os títulos virais obtidos por RT-qPCR foram comparados àqueles obtidos por meio do ensaio de plaque, os quais revelaram um perfil elevado e já esperado, o que faz da técnica de RT-qPCR uma potencial abordagem para o estudo, desenvolvimento e controle de qualidade de uma vacina contra o vírus Chikungunya.
- Os resultados da quantificação do vírus Chikungunya por RT-qPCR apresentou valores absolutos maiores do que naquela obtida por meio do ensaio de plaque, revelando a capacidade do método em quantificar o RNA viral total presente nas amostras, sem distinguir o genoma viral de partículas viáveis e não viáveis.

- Os resultados obtidos para os parâmetros analisados no estudo da RT-qPCR para o vírus Chikungunya não permitiram a validação da metodologia, já que os parâmetros de precisão e exatidão não apresentaram resultados homogêneos quanto à variabilidade e dispersão dos dados predeterminados pelos critérios de aceitação dos ensaios ($\leq 25\%$) em todas as matrizes testadas (soro humano negativo, meio de cultura 199 Earle suplementado e PBS).

6.8 PERSPECTIVAS

- Um estudo de correlação dos resultados da titulação por ensaio de plaque e da quantificação obtida por RT-qPCR mais aprofundado deve ser realizado para que seja possível estimar com maior assertividade o título viral com base no número de cópias do genoma viral presente na amostra de interesse.
- Um novo conjunto de *primers* para a RT-qPCR deve ser desenhado e testado com o objetivo de avaliar se as incongruências obtidas para os parâmetros de precisão e exatidão apresentados neste trabalho foram causadas por alguma inespecificidade, impedindo a quantificação precisa e a recuperação total do RNA viral contido em cada amostra testada dos painéis.
- Após a utilização de um novo conjunto de *primers*, o desempenho da metodologia de RT-qPCR para o vírus Chikungunya deve ser reavaliado nas matrizes já testadas e, caso continue não atendendo aos requisitos estabelecidos, o método deve ser aprimorado para que seja, então, validado.
- Nos estudos futuros, deve ser considerada a possibilidade utilizar valores em Log_{10} , ao invés do valor absoluto de cópias do genoma viral obtido, como unidade de quantificação para a metodologia de RT-qPCR, já que esta revela o crescimento exponencial do vírus para cada C_q da amostra analisada.

REFERÊNCIAS

- ABEYRATNE, E. et al. Attenuation and stability of CHIKV-NoLS, a live-attenuated Chikungunya virus vaccine candidate. **Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2019.
- ACHARYA, D. et al. Loss of glycosaminoglycan receptor binding after mosquito cell passage reduces *Chikungunya virus* infectivity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004139, 2015.
- AGARWAL, A. et al. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of *Chikungunya virus* in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2990, 2014.
- AGUILAR, P. V. et al. Structural and nonstructural protein genome regions of *Eastern Encephalitis virus* are determinants of interferon sensitivity and murine virulence. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 4920–4930, 2008.
- AHOLA, T. et al. *Semliki Forest virus* mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. **EMBO Journal**, v. 18, n. 11, p. 3164–3172, 1999.
- AKAHATA, W. et al. A VLP vaccine for epidemic *Chikungunya virus* protects non-human primates against infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 3, p. 334–338, 2010.
- ALTHOUSE, B. M. et al. Role of monkeys in the sylvatic cycle of *Chikungunya virus* in Senegal. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.
- AN, W. et al. Recent progress on *Chikungunya virus* research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 441–453, 2017.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC nº 27**, de 17 de maio de 2012.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC nº 166**, de 25 de julho de 2017.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira, Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos**. 6. ed. Brasília, 2019.
- AOYAMA, I., et al. A case of Chikungunya fever imported from India to Japan, follow-up of specific IgM and IgG antibodies over a 6-month period. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 63, n. 1, p. 65-6. 2010.
- APPASSAKIJ, H. et al. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic *Chikungunya* fever: A blood transfusion threat? **Transfusion**, v. 53, n. 10 PART 2, p. 2567–2574, 2013.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of *Chikungunya* viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General**

Virology, v. 88, n. 7, p. 1967–1976, 2007.

ARÉVALO, M. T. et al. Vaccination with a *Chikungunya virus*-like particle vaccine exacerbates disease in aged mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 4, p. 1–18, 2019.

ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

ASHBROOK, A. W. et al. Residue 82 of the *Chikungunya virus* E2 attachment protein modulates viral dissemination and arthritis in mice. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p. 12180–12192, 2014.

AZAMI, N. A. M.; MOI, M. L.; TAKASAKI, T. Neutralization assay for *Chikungunya virus* infection: plaque reduction neutralization test. In: **Chikungunya Virus: Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 1426p. 273–282.

AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. *Chikungunya* risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 58, 2015.

BANDEIRA, A. C. et al. Prolonged shedding of *Chikungunya virus* in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, v. 6, p. 100–103, 2016.

BERNARD, E. et al. Endocytosis of *Chikungunya virus* into mammalian cells: Role of clathrin and early endosomal compartments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11479, 2010.

BHALLA, N. et al. Host translation shutoff mediated by non-structural protein 2 is a critical factor in the antiviral state resistance of Venezuelan equine encephalitis virus. **Physiology & behavior**, v. 496, n. 1, p. 147–165, 2016.

BINN, L. N., HARRISON, V. R., RANDALL, R. Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with *Chikungunya* and other serologically related group A arboviruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. 6, p. 782–785. 1967.

BLACKBURN, N. K.; BESSELAAR, T. G.; GIBSON, G. Antigenic relationship between *Chikungunya virus* strains and *O'nyong nyong virus* using monoclonal antibodies. **Research in Virology**, v. 146, n. 1, p. 69–73, 1995.

BLAGROVE, M. S. C. et al. A *Wolbachia* wMel transinfection in *Aedes albopictus* is not detrimental to host fitness and inhibits *Chikungunya virus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2152, 2013.

BOGA, J. A. et al. Simultaneous detection of *Dengue virus*, *Chikungunya virus*, *Zika virus*, *Yellow Fever virus* and *West Nile virus*. **Journal of Virological Methods**, v. 268, n. March, p. 53–55, 2019.

BORG, I. et al. Evaluation of a quantitative real-time PCR for the detection of respiratory syncytial virus in pulmonary diseases. **European Respiratory Journal**, v.

21, n. 6, p. 944–951, 2003.

BORGES, M. B. et al. Detection of post-vaccination enhanced *Dengue virus* infection in macaques: An improved model for early assessment of *Dengue* vaccines. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. 1–25, 2019.

BOUTIN, J. P, et al. Marseilles, the Indian Ocean and *Chikungunya virus*. **Bulletin de l' Academie Nationale de Medicine**, v. 191, n. 4-5, p. 785-787, 2007.

BRANDLER, S. et al. A recombinant measles vaccine expressing *Chikungunya virus*-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with *Chikungunya virus*. **Vaccine**, v. 31, n. 36, p. 3718–3725, 2013.

BREAKWELL, L. et al. Semliki Forest Virus Nonstructural Protein 2 Is Involved in Suppression of the Type I Interferon Response. **Journal of Virology**, v. 81, n. 16, p. 8677–8684, 2007.

BROEDERS, S. et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 115–126, 2014.

BUONAGURO, L.; L. TORNESELLO, M.; M. BUONAGURO, F. Virus-Like Particles as Particulate Vaccines. **Current HIV Research**, v. 8, n. 4, p. 299–309, 1 maio 2010.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 550–576, 2010.

BURNS, M. J. et al. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. [s.n.], p. 1–13, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 15, n. 3, p. 155–166, 2004.

BUSTOS CARRILLO, F. et al. Surrogates for the study, of *Norovirus* stability and inactivation in the environment: A comparison of murine *Norovirus* and feline *Calicivirus*. **Journal of Virology**, v. 93, n. 4, p. e01622-18, 2019.

CAGLIOTI, C. et al. *Chikungunya virus* infection: An overview. **New Microbiologica**, v. 36, n. 3, p. 211–227, 2013.

CANNON, J. L. et al. Surrogates for the study, of *Norovirus* stability and inactivation in the environment: A comparison of murine *Norovirus* and feline *Calicivirus*. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2761–2765, 2006.

CARDULLO, R. A. et al. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative

fluorescence resonance energy transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 23, p. 8790–8794, 1988.

CAREY, D. E. *Chikungunya* and *Dengue*: A case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 26, n. 3, p. 243–262, 1971.

CARRAU, L. et al. *Chikungunya virus* vaccine candidates with decreased mutational robustness are attenuated *in vivo* and have compromised transmissibility. **Journal of Virology**, v. 93, n. 18, p. 1–20, 2019.

CARRILLO-HERNÁNDEZ, M. Y. et al. Co-circulation and simultaneous co-infection of *Dengue*, *Chikungunya*, and *Zika* viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 61, 2018.

CASTELAIN, S. et al. TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 3, p. 227–234, 2004.

CAVRINI, F. et al. Chikungunya: An emerging and spreading arthropod-borne viral disease. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 10, p. 744–752, 2009.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chikungunya Virus: Clinical Evaluation & Disease**. 2018.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chikungunya Virus: Geographic Distribution**. 2019.

CHAN, Y. et al. Mutating *Chikungunya virus* non-structural protein produces potent live-attenuated vaccine candidate. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2019.

CHANG, L. J. et al. Safety and tolerability of *Chikungunya virus*-like particle vaccine in healthy adults: A phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet**, v. 384, n. 9959, p. 2046–2052, 2014.

CHARLYS, A. et al. Spread of *Chikungunya virus* East/Central/South African genotype in northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1742–1744, 2017.

CHARREL, R. N.; DE LAMBALLERIE, X.; RAOULT, D. *Chikungunya* outbreaks - The globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 8, p. 769–771, 2007.

CHARREL, R. N., DE LAMBALLERIE, X. *Chikungunya virus* in northeastern Italy: a consequence of seasonal synchronicity. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 1, p. 8003, 2008.

CHATTOPADHYAY, A. et al. A chimeric vesiculo/alphavirus is an effective alphavirus vaccine. **Journal of Virology**, v. 87, n. 1, p. 395–402, 2013.

CHEVILLON, C. et al. The *Chikungunya* threat: an ecological and evolutionary perspective. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–88, 2008.

- CHIAM, C. W. et al. Real-time polymerase chain reaction for diagnosis and quantitation of negative strand of *Chikungunya virus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, n. 2, p. 133–137, 2013.
- CHO, B. et al. Expression of the capsid protein of *Chikungunya virus* in a *Baculovirus* for serodiagnosis of *Chikungunya* disease. **Journal of Virological Methods**, v. 154, n. 1–2, p. 154–159, 2008.
- CHOMPOOSRI, J. et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of *Chikungunya virus* in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. [s.n.], p. 227, 2016.
- CHUA, C. L. et al. Antigenic variation of East/Central/South African and Asian *Chikungunya virus* genotypes in neutralization by immune sera. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 2016.
- COELHO, S. V. A. et al. Development of standard methods for *Zika virus* propagation, titration, and purification. **Journal of Virological Methods**, v. 246, n. [s.n.], p. 65–74, 2017.
- COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A. B.; WEAVER, S. C. *Chikungunya virus*–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, 2014.
- COFFEY, L. L.; VIGNUZZI, M. Host alternation of *Chikungunya virus* increases fitness while restricting population diversity and adaptability to novel selective pressures. **Journal of Virology**, v. 85, n. 2, p. 1025–1035, 2011.
- COUDERC, T.; LECUIT, M. Focus on *Chikungunya* pathophysiology in human and animal models. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1197–1205, 2009.
- COUTURIER, E. et al. Impaired quality of life after *Chikungunya virus* infection: A 2-year follow-up study. **Rheumatology**, v. 51, n. 7, p. 1315–1322, 2012.
- CROSS, R. K. Identification of a unique guanine-7-methyltransferase in Semliki forest virus (SFV) infected cell extracts. **Virology**, v. 130, n. 2, p. 452–463, 1983.
- D'ORTENZIO, E. et al. A226V strains of *Chikungunya virus*, Reunion Island, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 309–311, 2011.
- DE LAMBALLERIE, X. et al. *Chikungunya virus* adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: A sign of things to come? **Virology Journal**, v. 5, n. [s.n.], p. 33, 2008.
- DEFILIPPIS, V. R. *Chikungunya virus* vaccines: Platforms, progress, and challenges. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. [n.v.], p. [n.p.], 2019.
- DEZURE, A. D. et al. Whole-inactivated and virus-like particle vaccine strategies for *Chikungunya virus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 5, p. S497–S499, 2016.

DIALLO, M. et al. Vectors of *Chikungunya virus* in Senegal: Current data and transmission cycles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281–286, 1999.

DIDENKO, V. V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. **Biotechniques**, v. 31, n. 5, p. 1106–1121, 2001.

DING, X. et al. Virus-like particle engineering: From rational design to versatile applications. **Biotechnology Journal**, v. 13, n. 5, p. 1–7, 2018.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual review of microbiology**, v. 51, n. [s.n.], p. 151–178, 1997.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. *Chikungunya* disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.

ECKELS, K. H.; HARRISON, V. R.; HETRICK, F. M. *Chikungunya virus* vaccine prepared by Tween-ether extraction. **Applied microbiology**, v. 19, n. 2, p. 321–325, 1970.

EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live *Chikungunya virus* vaccine TSI-GSD-218. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 681–685, 2000.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on bioanalytical method validation**. London, 2015.

EMMADI, R. et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: A review of FDA-approved and cleared assays. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 583–604, 2011.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Microbiological Methods of Analysis**. Lexington, 2016.

ESPY, M. J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165–256, 2006.

EWER, K. et al. Chimpanzee adenoviral vectors as vaccines for outbreak pathogens. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 13, n. 12, p. 3020–3032, 2017.

FARKAS, T. et al. Characterization of a rhesus monkey *Calicivirus* representing a new genus of *Caliciviridae*. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5408–5416, 2008.

FDA. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Nucleic Acid Sequence-Based Analysis of Food, Feed, Cosmetics and Veterinary Products**. 2019.

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

FERRARO, B. et al. Clinical applications of DNA vaccines: Current progress. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 3, p. 296–302, 2011.

FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in *Alphavirus* 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v. 5, n. [s.n.], p. 108, 2008.

FORRESTER, N. L. et al. Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002897, 2012.

FROLOVA, E. I. et al. Functional *Sindbis virus* replicative complexes are formed at the plasma membrane. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11679–11695, 2010.

FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. *Alphavirus* infection: Host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 166, 2016.

FURUYA-KANAMORI, L. et al. Co-distribution and co-infection of *Chikungunya* and *Dengue* viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. [s.n.], p. 84, 2016.

GAEDIGK-NITSCHKO, K.; SCHLESINGER, M. J. The sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 274–281, 1990.

GALÁN-HUERTA, K. A. et al. *Chikungunya virus*: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GAO, S.; SONG, S.; ZHANG, L. Recent progress in vaccine development against *Chikungunya virus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–10, 2019.

GARCIA-ARRIAZA, J. et al. A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against *Chikungunya* infection. **Journal of Virology**, v. 88, n. 6, p. 3527–3547, 2014.

GARDNER, J. et al. *Chikungunya virus* arthritis in adult wild-type mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 2010.

GASPERINA, D. D. et al. *Chikungunya* infection in a human immunodeficiency virus-infected kidney transplant recipient returning to Italy from the Dominican Republic. **Transplant Infectious Disease**, v. 17, n. 6, p. 876–879, 2015.

GAY, B. et al. PH-dependent entry of *Chikungunya virus* into *Aedes albopictus* cells. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1275–1281, 2012.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child *Chikungunya virus* infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 2008.

GÉRARDIN, P. et al. Perceived morbidity and community burden after a *Chikungunya* outbreak: The TELECHIK survey, a population-based cohort study. **BMC Medicine**, v. 9, n. [s.n.], p. 5, 2011.

GÉRARDIN, P. et al. Predictors of *Chikungunya* rheumatism: A prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n. 1, p. R9, 2013.

GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child *Chikungunya virus* infection: The CHIMERE Cohort study on Reunion Island. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2996, 2014.

GIRÃO, E. S. et al. *Chikungunya* infection in solid organ transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 49, n. 9, p. 2076–2081, 2017.

GIULIETTI, A. et al. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386–401, 2001.

GOO, L. et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all *Chikungunya virus* genotypes. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1487–1491, 2016.

GORBALENYA, A. E. et al. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 12, p. 4713–4730, 1984.

GOYAL, M. et al. Recent development in the strategies projected for *Chikungunya* vaccine in humans. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 4195–4206, 2018.

GRIGOROV, B. et al. Rapid titration of measles and other viruses: Optimization with determination of replication cycle length. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e24135, 2011.

GUERRERO, N. A. S.; BELLO, F. J. Comparative assessment of the replication efficiency of *Dengue*, *Yellow Fever*, and *Chikungunya* arboviruses in some insect and mammalian cell lines. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, n. [s.n.], p. e20180511, 2019.

HALLENGARD, D. et al. Novel attenuated *Chikungunya* vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2858–2866, 2014.

HALSTEAD, S. B. Reappearance of *Chikungunya*, formerly called *Dengue*, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 557–561, 2015.

HALSTEAD, S. B.; BUESCHER, E. L. Hemorrhagic disease in rodents infected with virus associated with Thai hemorrhagic fever. **Science**, v. 134, n. 3477, p. 475–476, 1961.

- HARRISON, V.R; BINN, L.N; RANDALL, R. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. [s.n.], p. 786–91, 1967.
- HARRISON, V. R. et al. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 107, n. 3, p. 643–647, 1971.
- HEDMAN, J. et al. Validation guidelines for PCR workflows in bioterrorism preparedness, food safety and forensics. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 23, n. 3, p. 133–144, 2018.
- HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986–994, 1996.
- HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of *Dengue*, *Yellow Fever*, *Zika* and *Chikungunya* arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, n. [s.n.], p. 99–111, 2019.
- HOKE, C. H. et al. US Military contributions to the global response to pandemic Chikungunya. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6713–6720, 2012.
- HORWOOD, P. F.; BUCHY, P. *Chikungunya*. **Revue Scientifique et Technique Office international des Épizooties**, v. 34, n. 2, p. 479–489, 2015.
- HOSSAIN, M. S. et al. *Chikungunya* outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006561, 2018.
- HUSSAIN, K. M. et al. Establishment of a novel primary human skeletal myoblast cellular model for *Chikungunya virus* infection and pathogenesis. **Scientific Reports**, v. 6, n. [s.n.], p. 21406, 2016.
- ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy: 2018b Release**. 2018.
- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre calibração e rastreabilidade das medições em laboratórios de calibração e de ensaio: documento de caráter informativo**. rev. 8. Duque de Caxias, 2020.
- INOUE, S. et al. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. **Journal of Medical Primatology**, v. 32, n. 2, p. 89–94, 2003.
- Butantan fecha parceria com farmacêutica europeia para produzir vacina contra chikungunya. **Instituto Butantan**, 2020. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/butantan-fecha-parceria-com-farmacautica-europeia-para-produzir-vacina-contra-chikungunya>. Acesso em: 22 de ago. 2021.
- ITURBE-ORMAETXE, I.; WALKER, T.; O’NEILL, S. L. *Wolbachia* and the

biological control of mosquito-borne disease. **EMBO Reports**, v. 12, n. 6, p. 508–518, 2011.

IVANOVA, L.; SCHLESINGER, M. J. Site-directed mutations in the *Sindbis virus* E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. **Journal of Virology**, v. 67, n. 5, p. 2546–2551, 1993.

JAIN, J. et al. Evidence for natural vertical transmission of *Chikungunya viruses* in field populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana states in India—a preliminary report. **Acta Tropica**, v. 162, n. [s.n.], p. 46–55, 2016.

JOHNSON, G.; NOLAN, T.; BUSTIN, S. A. Real-time quantitative PCR, pathogen detection and MIQE. In: **Methods in molecular biology**. [s.l: s.n.]. v. 943p. 1–16, 2013.

JOON YAU LEONG, AMIR S. PATEL, R. R. A Chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nature Medicine**, v. 23, n. 2, p. 192–199, 2017.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of *Alphavirus* replication and assembly. **Future microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837–856, 2009.

JOUBERT, P. E. et al. *Chikungunya virus*-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 1029–1047, 2012.

JUPP, P. G. et al. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with *Chikungunya virus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 15–19, 1981.

JUPP, P. G., MCINTOSH, B. M. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of *Chikungunya virus* at Mica, Northeastern Transvaal, South Africa. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 6, n. 3, p. 415–420, 1990.

KADING, R. C. et al. Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 587–599, 2013.

KAM, Y. W. et al. Immuno-biology of *Chikungunya* and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1186–1196, 2009.

KAM, Y. W. et al. Early neutralizing IgG response to *Chikungunya virus* in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. **EMBO Molecular Medicine**, v. 4, n. 4, p. 330–343, 2012a.

KAM, Y. W. et al. Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with *Chikungunya virus* clearance and long-term clinical protection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 7, p. 1147–1154, 2012b.

KARPE, Y. A.; AHER, P. P.; LOLE, K. S. NTPase and 5'-RNA triphosphatase activities of *Chikungunya virus* nsP2 protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22336, 2011.

- KEE, A. C. L.; YANG, S.; TAMBYAH, P. Atypical *Chikungunya virus* infections in immunocompromised patients. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1038–1040, 2010.
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of *Chikungunya virus* and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. Part 12, p. 3075–3084, 2002.
- KHAN, M. et al. Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of *Chikungunya virus* elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. **Virus Research**, v. 167, n. 2, p. 236–246, 2012.
- KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 6, p. 257–260, 2002.
- KRALIK, P.; RICCHI, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. [s.n.], p. 108, 2017.
- KREJBICH-TROTOT, P. et al. *Chikungunya* triggers an autophagic process which promotes viral replication. **Virology Journal**, v. 8, n. [s.n.], p. 432, 2011a.
- KREJBICH-TROTOT, P. et al. *Chikungunya virus* mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 314–325, 2011b.
- KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.
- KUHN, R. **Togaviridae. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields virology.** 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2013. p. 629-50.
- KUJALA, P. et al. Biogenesis of the *Semliki Forest virus* RNA replication complex. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3873–3884, 2001.
- KUMAR, M.; SUDEEP, A. B.; ARANKALLE, V. A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against *Chikungunya virus*. **Vaccine**, v. 30, n. 43, p. 6142–6149, 2012.
- KUMAR, S. et al. Quality control of vaccines-A journey from classical approach to 3Rs. **Microbiology: Current Research**, v. 2, n. 3, p. 45–61, 2018.
- KURI-MORALES, P. A. et al. Emerging and re-emerging diseases. **Gaceta Médica de México**, v. 151, n. 5, p. 674–680, 2015.
- LAACKONEN, P. et al. Expression of *Semliki Forest virus* nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. **Journal of Virology**, v. 68, n. 11, p. 7418–7425, 1994.
- LAACKONEN, P.; AHOLA, T.; KÄÄRIÄINEN, L. The effects of palmitoylation on

- membrane association of *Semliki Forest virus* RNA capping enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28567–28571, 1996.
- LAMPIO, A. et al. Membrane binding mechanism of an RNA virus-capping enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37853–37859, 2000.
- LANCIOTTI, R. S. et al. *Chikungunya virus* in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.
- LEBRUN, G. et al. Guillain-barré syndrome after *Chikungunya* infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495–496, 2009.
- LE COUPANEC, A., et al. Co-infection of mosquitoes with *Chikungunya* and *Dengue* viruses reveals modulation of the replication of both viruses in Midguts and salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 8, p. 1708, 2017.
- LEE, R. C. H. et al. Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of *Chikungunya virus*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. e2050, 2013.
- LEPARC-GOFFART, I. et al. *Chikungunya* in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.
- LESSA-AQUINO, C. et al. Detection of East/Central/South African genotype *Chikungunya virus* during an outbreak in a southeastern state of Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 146, n. 16, p. 2056–2058, 2018.
- LEUNG, J. Y. S.; NG, M. M. L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: A review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in Virology**, v. 2011, n. [s.n.], p. 249640, 2011.
- LEVITT, N. H. et al. Development of an attenuated strain of *Chikungunya virus* for use in vaccine production. **Vaccine**, v. 4, n. 3, p. 157–162, 1986.
- LI, Y. G. et al. *Chikungunya virus* induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirology**, v. 56, n. 1, p. 6–12, 2013.
- LIM, E. X. Y. et al. Mosquitoes as suitable vectors for alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.
- LIN, J.-C. et al. Quantification of plasma *Epstein–Barr virus* DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 24, p. 2461–2470, 2004.
- LITZBA, N. et al. Evaluation of the first commercial *Chikungunya virus* indirect immunofluorescence test. **Journal of Virological Methods**, v. 149, n. 1, p. 175–179, 2008.
- LIU, S. Q. et al. Development and evaluation of one-step multiplex real-time RT-PCR

- assay for simultaneous detection of *Zika virus* and *Chikungunya virus*. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 3, p. 389–396, 2018.
- LULLA, A. et al. Molecular determinants of substrate specificity for *Semliki Forest virus* nonstructural protease. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5413–5422, 2006.
- LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.
- LUSA, S.; GAROFF, H.; LIUESTRÖM, P. Fate of the 6K membrane protein of *Semliki Forest virus* during virus assembly. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 843–846, 1991.
- LWANDE, O. W. et al. Global emergence of alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. [s.n.], p. 29853, 2015.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292–1305, 2002.
- MAHAJAN, R. et al. A TaqMan® reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in vitro potency assay for plasmid-based vaccine products. **Molecular Biotechnology**, v. 40, n. 1, p. 47–57, 2008.
- MALET, H. et al. The crystal structures of *Chikungunya* and *Venezuelan Equine Encephalitis virus* nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6534–6545, 2009.
- MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53 - an additional note on *Chikungunya virus* isolations and serum antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957.
- MAVALANKAR, D.; SHASTRI, P.; RAMAN, P. *Chikungunya* epidemic in India: a major public-health disaster. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 306–307, 2007.
- MAVALE, M. et al. Venereal transmission of *Chikungunya virus* by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1242–1244, 2010.
- MCCLAIN, D. J. et al. Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, n. 3, p. 634–641, 1998.
- MCCRAE, A. W. R. et al. *Chikungunya virus* in the entebbe area of Uganda: Isolations and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 152–168, 1971.
- MCINTOSH, B. M. Antibody against *Chikungunya virus* in wild primates in Southern Africa. **South African Journal of Medical Sciences**, v. 35, n. 3, p. 65-74, 1970.

MELTON, J. V. et al. *Alphavirus* 6K proteins form ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923–46931, 2002.

METZ, S. W. et al. Functional processing and secretion of *Chikungunya virus* E1 and E2 glycoproteins in insect cells. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 353, 2011.

METZ, S. W. et al. Effective *Chikungunya virus*-like particle vaccine produced in insect cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

MOREIRA, L. A. et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with *Dengue*, *Chikungunya*, and *Plasmodium*. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268–1278, 2009.

MORILLO, J. M. et al. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 5, p. 518–524, 2003.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

MURA, M.; TOURNIER, J. N. Chikungunya vaccine: a single shot for a long protection? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1111–1112, 2020.

MUTHUMANI, K. et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against *Chikungunya virus*. **Vaccine**, v. 26, n. 40, p. 5128–5134, 2008.

MUTHUMANI, K. et al. Rapid and long-term immunity elicited by DNA-encoded antibody prophylaxis and DNA vaccination against *Chikungunya virus*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 3, p. 369–378, 2016.

NAKAO, E.; HOTTA, S. Immunogenicity of purified, inactivated *Chikungunya virus* in monkeys. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 48, n. 5, p. 559–562, 1973.

NAVA, A. et al. The impact of global environmental changes on infectious disease emergence with a focus on risks for Brazil. **ILAR Journal**, v. 58, n. 3, p. 393–400, 2017.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.

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

NCCLS. The National Committee for Clinical and Laboratory Standards. **Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline**. v. 24. Wayne, 2004.

NG, L. F. P. et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of *Chikungunya* severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. [s.v.], n. 33, p. 10–13, 2004.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of *Chikungunya virus* in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. [s.n.], p. 102, 2015.

OZDEN, S. et al. Human muscle satellite cells as targets of *Chikungunya virus* infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e527, 2007.

PABBARAJU, K. et al. Simultaneous detection of *Zika*, *Chikungunya* and *Dengue* viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, n. [s.n.], p. 66–71, 2016.

PAESSLER, S. et al. Recombinant *Sindbis/Venezuelan equine encephalitis virus* is highly attenuated and immunogenic. **Journal of Virology**, v. 77, n. 17, p. 9278–9286, 2003.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Preparedness and response for Chikungunya virus introduction in the Americas: Clinical**. 2011.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas - EW 26**. 2014a.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas - EW 30**. 2014b.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas - EW 39**. 2014c.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas - EW 44**. 2014d.

PAHO. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas - EW 47**. 2014e.

PARDI, N. et al. mRNA vaccines - A new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 4, p. 261–279, 2018.

PAROLA, P. et al. Novel *Chikungunya virus* variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. *Dengue, Zika and Chikungunya*: Emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

PEYREFITTE, C. N. et al. *Chikungunya virus*, Cameroon, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 768–771, 2007.

PEYREFITTE, C. N. et al. Circulation of *Chikungunya virus* in Gabon, 2006–2007. **Antiviral Therapy**, v. 80, n. 3, p. 430–433, 2008.

PIALOUX, G. et al. *Chikungunya*, an epidemic arbovirolosis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319–327, 2007.

PLANTE, K. S. et al. Extended preclinical safety, efficacy and stability testing of a live-attenuated Chikungunya vaccine candidate. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–19, 2015.

POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. [s.v.], n. [s.n.], p. 1–18, 2020.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of *Chikungunya* and *O'nyong-nyong* viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. Part 2, p. 471–479, 2000.

POWERS, A. M. Genomic evolution and phenotypic distinctions of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, n. 8, p. 909–914, 2011.

POWERS, A. M. Vaccine and therapeutic options to control *Chikungunya virus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. e00104-16, 2018.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of *Chikungunya virus*: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. Part 9, p. 2363–2377, 2007.

PRABHU, M. et al. Real time PCR: A rapid tool for potency estimation of live attenuated camelpox and buffalopox vaccines. **Biologicals**, v. 40, n. 1, p. 92–95, 2012.

Chikungunya Vaccine (VLA1553). **Precision Vaccinations**, 2021. Disponível em: <<https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/chikungunya-vaccine-vla1553>>. Acesso em: 22 de ago. 2021.

PRUETZ, J.; SOCHA, A.; KANTE, D. New range record for the lesser spot-nosed Guenon (*Cercopithecus petaurista*) in southeastern Senegal. **African Primates**, v. 7, n. 1, p. 64–66, 2010.

RAMAKRISHNAN, C. et al. Structure–function relationship of *Chikungunya* nsP2 protease: A comparative study with papain. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 89, n. 5, p. 772–782, 2017.

RAMSAUER, K., et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based Chikungunya vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. **Lancet Infect Dis**. v. 15, n. 5, p. 519–27, 2015.

RANHEIM, T. et al. Development and application of a quantitative RT-PCR potency

- assay for a pentavalent rotavirus vaccine (RotaTeq®). **Journal of Virological Methods**, v. 131, n. 2, p. 193–201, 2006.
- REISINGER, E.C., et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of the measles-vectored *Chikungunya virus* vaccine MV-CHIK: a double-blind, randomised, placebo-controlled and active-controlled phase 2 trial. **Lancet**. v. 392, n. 10165, p. 2718-2727, 2019.
- REITER, P.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of *Chikungunya virus*: another emerging problem? **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 463–464, 2006.
- RENAULT, P.; JOSSERAN, L.; PIERRE, V. *Chikungunya*-related fatality rates, Mauritius, India, and Reunion Island. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1327, 2008.
- REYES-SANDOVAL, A. 51 years in of *Chikungunya* clinical vaccine development: A historical perspective. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2351–2358, 2019.
- REZZA, G. et al. Infection with *Chikungunya virus* in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.
- REZZA, G.; WEAVER, S. C. *Chikungunya* as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. e0006919, 2019.
- RIKKONEN, M.; PERÄNEN, J.; KÄÄRIÄINEN, L. ATPase and GTPase activities associated with *Semliki Forest virus* nonstructural protein nsP2. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5804–5810, 1994.
- ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.
- ROLDÃO, A. et al. Virus-like particles in vaccine development. **Expert Review of Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1149–1176, 2010.
- ROSS, B. Y. R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.
- ROSSI, S. L. et al. Immunogenicity and efficacy of a measles virus-vectored *Chikungunya* vaccine in nonhuman primates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 5, p. 735–742, 2019.
- ROZET, E. et al. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 848–858, 2011.

- RUBACH, J. K. et al. Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity *in vitro*. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 201–208, 2009.
- RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 8, n. [s.n.], p. 15412, 2017.
- RUDD, P. A. et al. Effective cutaneous vaccination using an inactivated *Chikungunya virus* vaccine delivered by Foroderm. **Vaccine**, v. 33, n. 39, p. 5172–5180, 2015.
- RUSSELL, R. C. Mosquito-borne disease and climate change in Australia: Time for a reality check. **Australian Journal of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 1–7, 2009.
- RUTLEDGE, R. G.; CÔTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 16, p. e93, 2003.
- RYAN, C.; IVANOVA, L.; SCHLESINGER, M. J. Effects of site-directed mutations of transmembrane cysteines in *Sindbis virus* E1 and E2 glycoproteins on palmitylation and virus replication. **Virology**, v. 249, n. 1, p. 62–67, 1998.
- SALVADOR, B., et al. Characterization of *Chikungunya* pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 33–41, 2009.
- SAM, I. C.; ABUBAKAR, S. *Chikungunya virus* infection. **The Medical journal of Malaysia**, v. 61, n. 2, p. 264–269, 2006.
- SARASWAT, S. et al. Expression and characterization of yeast derived *Chikungunya virus* like particles (CHIK-VLPs) and its evaluation as a potential vaccine candidate. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2016.
- SCHALK, J. A. C. et al. Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 117, n. 2, p. 179–187, 2004.
- SCHALK, J. A. C.; DE VRIES, C. G. J. C. A.; JONGEN, P. M. J. M. Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay. **Biologicals**, v. 33, n. 2, p. 71–79, 2005.
- SCHILTE, C. et al. *Chikungunya virus*-associated long-term arthralgia: A 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
- SCHRAUF, S. et al. Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and *Chikungunya virus* infections. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 592, p. 1–20, 2020.
- SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of *Chikungunya* viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of *Chikungunya virus*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.
- SHAH, K.V; GIBBS, C.J. JR.; BANERJEE, G. Virological investigation of the epidemic of haemorrhagic fever in Calcutta: isolation of three strains of *Chikungunya virus*. **Indian Journal of Medical Research**. v. 52, n. [s.n.], p. 676–83, 1964.
- SHAN, L. et al. Comparison of cell-based and PCR-based assays as methods for measuring infectivity of Tulane virus. **Journal of Virological Methods**, v. 231, n. [s.n.], p. 1–7, 2016.
- SHAW, C. et al. Safety and immunogenicity of a mRNA-based Chikungunya vaccine in a phase 1 dose-ranging trial. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, n. 2019, p. 17, 2019.
- SILVA, L. A. et al. A single-amino-acid polymorphism in *Chikungunya virus* E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2385–2397, 2014.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. *Chikungunya virus*: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SIMON, F. et al. *Chikungunya virus* infection. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 3, p. 218–228, 2011.
- SMITHER, S. J. et al. Comparison of the plaque assay and 50% tissue culture infectious dose assay as methods for measuring filovirus infectivity. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 565–571, 2013.
- SNYDER, A. J.; SOKOLOSKI, K. J.; MUKHOPADHYAY, S. Mutating conserved cysteines in the *Alphavirus* E2 glycoprotein causes virus-specific assembly defects. **Journal of Virology**, v. 86, n. 6, p. 3100–3111, 2012.
- SNYDER, J. E. et al. Functional characterization of the *Alphavirus* TF protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8511–8523, 2013.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- SOONSAWAD, P. et al. Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to *Alphavirus* budding. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11145–11151, 2010.
- SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging *Chikungunya virus*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.
- SPUUL, P. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of *Semliki Forest virus* replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 15, p. 7543–7557, 2010.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

SUDEEP, A. B. et al. Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of *Chikungunya virus*. **The Indian journal of medical research**, v. 149, n. 6, p. 771–777, 2019.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012.

SUN, S. et al. Structural analyses at pseudo atomic resolution of *Chikungunya virus* and antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–27, 2013.

TANG, J. et al. Molecular links between the E2 envelope glycoprotein and nucleocapsid core in *Sindbis virus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 414, n. 3, p. 442–459, 2011.

TAUBITZ, W. et al. Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course. **Clinical infectious diseases**, v. 45, n. 1, p. e1–4, 2007.

TAYLOR, A. et al. Effects of an in-frame deletion of the 6k gene locus from the genome of *Ross River virus*. **Journal of Virology**, v. 90, n. 8, p. 4150–4159, 2016.

TAYLOR, A. et al. Mutation of the N-terminal region of *Chikungunya virus* capsid protein: Implications for vaccine design. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.

TEIXEIRA, M. G. et al. East / Central / South African genotype *Chikungunya virus*, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906–907, 2015.

THAA, B. et al. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by *Semliki Forest* and *Chikungunya* viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11420–11437, 2015.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.

TIWARI, M. et al. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of *Chikungunya virus*. **Vaccine**, v. 27, n. 18, p. 2513–2522, 2009.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in *Chikungunya virus* affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of *Chikungunya virus* to *Aedes albopictus* and *Ae. Aegypti* mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6835, 2009.

TSETSARKIN, K. A. et al. *Chikungunya virus* emergence is constrained in Asia by

- lineage-specific adaptive landscapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 19, p. 7872–7877, 2011.
- TUITTILA, M. T. et al. Replicase complex genes of *Semliki Forest virus* confer lethal neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 74, n. 10, p. 4579–4589, 2000.
- UTT, A. et al. Versatile trans-replication systems for Chikungunya virus allow functional analysis and tagging of every replicase protein. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–27, 2016.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151–159, 2005.
- VAN BORTEL, W. et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 13, p. 20759, 2014.
- VAN DEN HURK, A. F. et al. Impact of *Wolbachia* on infection with *Chikungunya* and *Yellow Fever* viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1892, 2012.
- VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. Early events in *Chikungunya virus* infection—from virus cell binding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 2015.
- VASILJEVA, L. et al. Regulation of the sequential processing of *Semliki Forest virus* replicase polyprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41636–41645, 2003.
- VAZEILLE, M. et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1168, 2007.
- VEGA-RUA, A. et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten american countries as a crucial factor in the spread of *Chikungunya virus*. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.
- VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of *Chikungunya virus* reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.
- VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of *Chikungunya virus* particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- WAGGONER, J. J. et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology**, v. 98, n. [s.n.], p. 1–4, 2018.
- WALLIS, J.; SHENTON, D. P.; CARLISLE, R. C. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 196, p. 189–204, 2019.

- WANG, D. et al. A complex adenovirus vaccine against *Chikungunya virus* provides complete protection against viraemia and arthritis. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2803–2809, 2011.
- WANG, E. et al. Chimeric alphavirus vaccine candidates for Chikungunya. **Vaccine**, v. 26, n. 39, p. 5030–5039, 2008.
- WARTER, L. et al. *Chikungunya virus* envelope-specific human monoclonal antibodies with broad neutralization potency. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 5, p. 3258–3264, 2011.
- WAUQUIER, N. et al. The acute phase of *Chikungunya virus* infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.
- WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299, n. [s.n.], p. 285–314, 2006.
- WEAVER, S. C. et al. *Chikungunya virus* and prospects for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087–1101, 2012.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. *Chikungunya virus* and the global spread of a mosquito-borne disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.
- WEGER-LUCARELLI, J. et al. Identifying the role of E2 domains on Alphavirus neutralization and protective immune responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004163, 2015.
- WEINBREN, M. P.; HADDOW, A. J.; WILLIAMS, M. C. The occurrence of *Chikungunya virus* in Uganda I. Isolation from mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 253–262, 1958.
- WESTON, J., et al. Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease virus and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 12, p. 3155–6163, 2002.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint**. 2017.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emergencies preparedness, response: Chikungunya**. 2019.
- WIELANEK, A. C. et al. Guillain-Barré syndrome complicating a *Chikungunya virus* infection. **Neurology**, v. 69, n. 22, p. 2105–2107, 2007.
- WIKAN, N. et al. *Chikungunya virus* infection of cell lines: Analysis of the East, Central and South African lineage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e31102, 2012.
- WILKE, A. B. B. et al. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 5, p. 869–874, 2009.

- WILKE, A. B. B.; MARRELLI, M. T. Genetic control of mosquitoes: Population suppression strategies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 54, n. 5, p. 287–292, 2012.
- WINTACHAI, P. et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 2012.
- WOBUS, C. E.; THACKRAY, L. B.; VIRGIN, H. W. Murine *Norovirus*: a model system to study *Norovirus* biology and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5104–5112, 2006.
- WOLF, J. J.; WANG, L.; WANG, F. Application of PCR technology in vaccine product development. **Expert Review of Vaccines**, v. 6, n. 4, p. 547–558, 2007.
- WOLFE, N. D. et al. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 5–6, p. 310–316, 2001.
- WRESSNIGG, N. et al. Single-shot live-attenuated Chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial. **Lancet Infectious Diseases**, v. 20, p. 1–11, 2020.
- ZANG, Y. et al. Development of one-step real-time PCR assay for titrating trivalent live attenuated *Influenza* vaccines. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 12, p. 3642–3648, 2014.
- ZHANG, C. et al. Advances in mRNA vaccines for infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. [s.i.], p. 1–13, 2019a.
- ZHANG, L. F. et al. HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. **Vaccine**, v. 18, n. 11–12, p. 1051–1058, 6 jan. 2000.
- ZHANG, Y.-N. et al. Infectious *Chikungunya virus* (CHIKV) with a complete capsid deletion: a new approach for a CHIKV vaccine. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, p. 1–16, 2019b.