

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JÚLIA CRISTINA DE MORAIS PEREIRA**

**ANÁLISE *IN SILICO* DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS E  
PADRONIZAÇÃO EXPERIMENTAL PARA *Orthobunyavirus oropoucheense* E**

***Alphavirus mayaro***

**PATOS DE MINAS – MG**  
**JANEIRO DE 2026**

**JÚLIA CRISTINA DE MORAIS PEREIRA**

**ANÁLISE *IN SILICO* DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA REAÇÃO EM CADEIA DA  
POLIMERASE EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE ARBOVÍRUS E  
PADRONIZAÇÃO EXPERIMENTAL PARA *Orthobunyavirus oropoucheense* E  
*Alphavirus mayaro***

Monografia apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade Federal de  
Uberlândia como requisito final para obtenção  
do título de Bacharel em Biotecnologia

Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

**PATOS DE MINAS - MG  
JANEIRO DE 2026**

## **JÚLIA CRISTINA DE MORAIS PEREIRA**

**Análise *in silico* de Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real para detecção de arbovírus e padronização experimental para *Orthobunyavirus oropoucheense* e *Alphavirus mayaro***

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia

Banca Examinadora:

Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC)  
Presidente

Dra. Luciana de Oliveira Almeida - Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC)  
Membro

Dra. Giulia Magalhães Ferreira – Instituto Master de Ensino Presidente Antônio Carlos (IMEPAC)  
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

## RESUMO

A urbanização e a globalização têm contribuído para o aumento da incidência de arboviroses, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Os arbovírus das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e mais recentemente, *Peribunyaviridae* são responsáveis por surtos em diversas regiões, representando uma ameaça à saúde pública. O gênero *Orthoflavivirus*, reúne arbovírus importantes, como vírus da dengue, Zika, febre amarela, Nilo Ocidental, Ilhéus, encefalite de *Saint Louis* e *Rocio*. No gênero *Alphavirus*, destacam-se vírus como o Sindbis, Chikungunya, Rio Ross, Mayaro e os vírus das encefalites equinas venezuelana, oriental e ocidental. Outro arbovírus de grande importância epidemiológica no Brasil é o vírus Oropouche, pertencente ao gênero *Orthobunyavirus*. Assim, são necessários métodos de diagnóstico eficazes para detecção e identificação de diferentes arbovírus. A Transcrição Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) é considerada a técnica padrão-ouro para o diagnóstico de doenças virais. Logo, o objetivo deste trabalho foi analisar e padronizar ensaios de RT-qPCR a partir de análises *in silico* para detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense*, além de realizar a validação experimental para os vírus *Orthobunyavirus oropoucheense* e Mayaro. Os oligonucleotídeos foram selecionados por meio de uma revisão literária. As análises *in silico* foram realizadas utilizando diferentes softwares, avaliando parâmetros como similaridade e alinhamento das sequências consenso virais com cada oligonucleotídeo, tamanho dos primers, temperatura de melting, porcentagem de guanina e citosina, formação de dímeros de primers e estruturas secundárias. A partir das análises realizadas, foi possível estabelecer os ensaios mais adequados para cada vírus-alvo e selecionar os melhores oligonucleotídeos para detecção e identificação dos diferentes alvos. A validação experimental foi realizada com os oligonucleotídeos escolhidos para os vírus *Orthobunyavirus oropoucheense* e Mayaro, em ensaios *singleplex* e *multiplex*. Com relação a especificidade da reação, não foi observada amplificação inespecífica e houve pouca variação entre os quantification cycle dos ensaios, evidenciando que a reação *multiplex* não comprometeu a eficiência da reação. Para determinar a eficiência da reação, por meio da curva padrão, as amostras de *Orthobunyavirus oropoucheense* e Mayaro foram submetidas a diluições seriadas. Para a análise estatística das curvas padrão, foram determinados o slope, o intercepto e o coeficiente de determinação com o software *GraphPad Prism 8*. Os valores obtidos para os ensaios de *Orthobunyavirus oropoucheense* estavam dentro da faixa ideal de acordo com a literatura. No entanto, os ensaios para a detecção do vírus Mayaro apresentaram valores fora das faixas ideais de slope (*multiplex* e *singleplex*), eficiência (apenas o *multiplex*) e de coeficiente de determinação (apenas o *singleplex*). Dessa forma, os resultados demonstram que ensaios *multiplex* fornecem resultados semelhantes aos ensaios *singleplex*, além de possuir vantagens como rapidez e menor custo permitindo a amplificação de múltiplos alvos por reação.

**Palavras-chave:** *Orthoflavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus oropoucheense*, RT-qPCR, detecção simultânea, diagnóstico diferencial.

## ABSTRACT

Arboviruses from the families Flaviviridae, Togaviridae, and more recently Peribunyaviridae, are responsible for outbreaks in several regions, representing a threat to public health. The genus Orthoflavivirus comprises important arboviruses such as Dengue virus, Zika virus, Yellow fever virus, West Nile virus, Ilhéus virus, Saint Louis encephalitis virus, and Rocio virus. Within the genus Alphavirus, notable viruses include Sindbis, Chikungunya, Ross River, Mayaro, and the Venezuelan, Eastern, and Western equine encephalitis viruses. Another arbovirus of major epidemiological importance in Brazil is Oropouche virus, which belongs to the genus Orthobunyavirus. Urbanization and globalization have contributed to the increased incidence of arboviral diseases, especially in tropical and subtropical regions. Therefore, effective diagnostic methods are required for the detection and identification of different arboviruses. Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) is considered the gold standard technique for the diagnosis of viral diseases. Thus, the objective of this study was to analyze and standardize RT-qPCR assays for arbovirus detection through in silico analyses targeting Orthoflavivirus, Alphavirus, and Orthobunyavirus oropoucheense, in addition to performing experimental validation for Oropouche and Mayaro viruses. Oligonucleotides were selected through a literature review. In silico analyses were performed using different software tools, evaluating parameters such as similarity and alignment between viral consensus sequences and each oligonucleotide, primer length, melting temperature, guanine and cytosine content, primer dimer formation, and secondary structures. Based on these analyses, it was possible to establish the most suitable assays for each target virus and to select the best oligonucleotides for detection and identification of the different targets. Experimental validation was carried out using the selected oligonucleotides for Orthobunyavirus oropoucheense and Mayaro viruses in singleplex and multiplex assays. Regarding reaction specificity, no nonspecific amplification was observed, and there was little variation among quantification cycle values, indicating that the multiplex reaction did not compromise assay efficiency. To determine reaction efficiency through standard curves, Orthobunyavirus oropoucheense and Mayaro samples were subjected to serial dilutions. For statistical analysis of the standard curves, slope, intercept, and coefficient of determination were calculated using GraphPad Prism 8 software. The values obtained for the Orthobunyavirus oropoucheense virus assays were within the ideal range according to the literature. However, assays for Mayaro virus detection showed values outside the ideal ranges for slope (both multiplex and singleplex), efficiency (multiplex only), and coefficient of determination (singleplex only). Overall, the results demonstrate that multiplex assays provide results comparable to singleplex assays, in addition to offering advantages such as faster processing and lower cost by allowing the amplification of multiple targets in a single reaction.

Keywords: Orthoflavivirus, Alphavirus, Orthobunyavirus oropoucheense, RT-qPCR, simultaneous detection, differential diagnosis.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos <i>primers</i> e sondas.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção das sequências genômicas virais.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Análise <i>in silico</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>Validação experimental de uma RT-qPCR.....</b>	<b>19</b>
3.4.1	Cepas Virais.....	19
3.4.2	Extração de RNA.....	19
3.4.3	Condições da reação de RT-qPCR.....	20
3.4.4	Avaliação da especificidade e eficiência da reação.....	20
3.4.5	Análise estatística.....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>Análise da literatura e definição dos vírus alvos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção dos <i>primers</i> e sondas.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Análise <i>in silico</i>.....</b>	<b>22</b>
4.3.1	Alinhamento e similaridade dos <i>primers</i> e sondas à sequencias virais alvo.....	22
4.3.2	Propriedades dos <i>primers</i> e sondas.....	40
4.4	Validação experimental por RT-qPCR.....	56
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>	
<b>APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS <i>Orthoflavivirus</i>.....</b>	<b>76</b>	
<b>APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS <i>Alphavirus</i>.....</b>	<b>88</b>	
<b>APÊNDICE C – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i>.....</b>	<b>96</b>	
<b>APÊNDICE D – ALINHAMENTO DENV-1 COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>98</b>	
<b>APÊNDICE E – ALINHAMENTO DENV-2 COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>99</b>	
<b>APÊNDICE F – ALINHAMENTO DENV-3 COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>100</b>	
<b>APÊNDICE G – ALINHAMENTO DENV-4 COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>101</b>	
<b>APÊNDICE H – ALINHAMENTO JEV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>102</b>	
<b>APÊNDICE I – ALINHAMENTO ROCV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>103</b>	
<b>APÊNDICE J – ALINHAMENTO SLEV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>104</b>	
<b>APÊNDICE K – ALINHAMENTO WNV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>105</b>	
<b>APÊNDICE L – ALINHAMENTO YFV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....</b>	<b>106</b>	

APÊNDICE M – ALINHAMENTO ZIKV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	107
APÊNDICE N – ALINHAMENTO CHIKV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	108
APÊNDICE O – ALINHAMENTO EEEV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	109
APÊNDICE P – ALINHAMENTO VEEV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	110
APÊNDICE Q – ALINHAMENTO WEEV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	111
APÊNDICE R – ALINHAMENTO MAYV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	112
APÊNDICE S – ALINHAMENTO OROV COM <i>PRIMERS</i> E SONDAS.....	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I</b> - Trabalhos selecionados na revisão da literatura para as análises de desenvolvimento de ensaios de RT-qPCR para a detecção de <i>Orthoflavivirus</i> , <i>Alphavirus</i> e <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> .....	23
<b>Tabela II</b> – Sequências de <i>primers</i> e sondas descritos na literatura para detecção molecular de <i>Orthoflavivirus</i> utilizados no presente estudo.....	25
<b>Tabela III</b> - Sequências de <i>primers</i> e sondas descritos na literatura para detecção molecular de <i>Alphavirus</i> utilizados no presente estudo.....	27
<b>Tabela IV</b> - Sequências de <i>primers</i> e sondas descritos na literatura para detecção molecular de <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> utilizados no presente estudo.....	29
<b>Tabela V</b> – Similaridade entre <i>primers</i> e sondas em relação à sequência consenso de <i>Orthoflavivirus</i> obtidas utilizando o software <i>Unipro UGENE</i> e a presença de bases degeneradas.....	30
<b>Tabela VI</b> – Similaridade entre <i>primers</i> e sondas em relação à sequência consenso de <i>Alphavirus</i> obtidas utilizando o software <i>Unipro UGENE</i> e a presença de bases degeneradas.....	35
<b>Tabela VII</b> – Similaridade entre <i>primers</i> e sondas em relação à sequência consenso de <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> obtidas utilizando o software <i>Unipro UGENE</i> e a presença de bases degeneradas.....	38
<b>Tabela VIII</b> - Propriedades dos <i>primers</i> e sondas para detecção de <i>Orthoflavivirus</i> determinadas a partir do software <i>OlygoAnalyser</i> .....	44
<b>Tabela IX</b> - Propriedades dos <i>primers</i> e sondas para detecção de <i>Alphavirus</i> determinadas a partir do software <i>OlygoAnalyser</i> .....	46
<b>Tabela X</b> - Propriedades dos <i>primers</i> e sondas para detecção de <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> determinadas a partir do software <i>OlygoAnalyser</i> .....	48
<b>Tabela XI</b> – <i>Cross dimers</i> formados entre todos os <i>primers</i> e sondas com seus respectivos valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) .....	49

**Tabela XII** - RT-qPCR propostas neste estudo, formatos *singleplex* e *multiplex*, referência dos oligonucleotídeos utilizados e os respectivos vírus-alvos, baseados nas análises *in silico*.....53

**Tabela XIII** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* para OROV e MAYV utilizando o protocolo descrito por Naveca *et al.* (2017). As reações foram testadas contra cepas de OROV, MAYV\_N, MAYV\_S, DENV-4, CHIKV, ZIKV, YFV e CN.....60

**Tabela XIV** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* com amostras de OROV submetidas a oito diluições.....61

**Tabela XV** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* com amostras de MAYV\_selvagem submetidas a oito diluições.....62

**Tabela XVI** – Parâmetros da curva padrão dos ensaios *singleplex* e *multiplex* de OROV e MAYV.....64

## 1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, que têm como hospedeiros os vertebrados (Weaver; Reisen, 2010). Na sua maioria, eles possuem como material genético RNA e encontram-se distribuídos em diferentes famílias, incluindo *Flaviviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (Socha *et al.*, 2022). Os arbovírus das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e mais recentemente, *Peribunyaviridae* são responsáveis pela ocorrência de surtos em diversas regiões, representando uma ameaça à saúde pública (Huang *et al.*, 2023). Nas últimas décadas, houve um aumento na reemergência ou no surgimento de arboviroses em todo mundo, impulsionado por fatores como a urbanização, a alta densidade populacional, as alterações climáticas, a globalização e as migrações (Socha *et al.*, 2022). Apesar da distribuição global, a maioria das arboviroses são consideradas doenças endêmicas em regiões específicas, predominantemente presentes em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas favorecem a procriação de mosquitos, permitindo a transmissão de doenças ao longo de todo o ano (Fujita *et al.*, 2023; Gubler, 2002; Soni *et al.*, 2023).

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros, sendo eles *Orthoflavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (Chen *et al.*, 2017). Os *Orthoflavivirus* são vírus envelopados e possuem genoma RNA fita simples positiva (Alzahrani *et al.*, 2020). Eles infectam cerca de 400 milhões de pessoas por ano, sendo responsáveis por causar diversas doenças que impactam a saúde pública em todo o mundo (Chen *et al.*, 2017; Roy; Bhattacharjee, 2021; Socha *et al.*, 2022). Entre os membros desse gênero estão presentes o vírus da dengue (DENV), vírus da Zika (ZIKV), vírus da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) e o vírus Rocio (ROCV) (Milhim *et al.*, 2020; Saivish *et al.*, 2021; Simon; Kong; Graham, 2024; Van Leur *et al.*, 2021).

A dengue é considerada a arbovirose mais comum em todo mundo (Akter *et al.*, 2024), sendo causada pelo *Orthoflavivirus denguei*, conhecido popularmente como vírus da dengue (DENV). O vírus possui quatro sorotipos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Contudo, em 2013, foi identificado um quinto sorotipo (DENV-5) em um paciente no estado de Sarawak, na Malásia (Côrtes *et al.*, 2023). O DENV-5 foi identificado apenas nas florestas de Sarawak e circula predominantemente entre primatas não humanos, ao contrário dos outros sorotipos que são transmitidos entre humanos (Mustafa *et al.*, 2015). A transmissão do vírus acontece por meio da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes*, principalmente pelo *A.*

*aegypti*, e alguns casos pelo *A. albopictus* (Khan *et al.*, 2023) A infecção pode gerar sintomas como febre, dores musculares e mal-estar, podendo evoluir para manifestações graves, tais como dor abdominal intensa, vômitos persistentes, sangramento na gengiva ou nariz, fadiga, entre outros (Khan *et al.*, 2023; Roy; Bhattacharjee, 2021; World Health Organization, 2025).

Nos últimos anos, a dengue tem se tornado um desafio para a saúde pública, acometendo aproximadamente dois quintos da população mundial, infectando por ano, cerca de 390 milhões de pessoas (Khan *et al.*, 2023; Roy; Bhattacharjee, 2021). Em 2023, a Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou mais de cinco milhões de ocorrências de dengue e mais de 5.000 mortes em 80 países (Kanan *et al.*, 2024) A dengue é considerada uma doença endêmica em mais de 100 países, incluindo o Brasil, sendo este, um dos mais afetados pelo vírus (Fujita *et al.*, 2023) No Brasil, além do comportamento endêmico, a dengue apresenta comportamento sazonal. De 2014 a 2019, 95,8% dos municípios brasileiros registraram a doença, sendo que 69,5% foram notificados entre os meses de fevereiro e maio (Pescarini *et al.*, 2022). Segundo o Ministério da Saúde, em 2023, entre as semanas epidemiológicas 1 e 35 (janeiro a agosto), foram notificados 1.530.940 casos prováveis de dengue no Brasil (Brasil, 2023). Já em 2024, ocorreu um aumento significativo nesse número, com 6.215.201 casos prováveis entre os meses de janeiro e junho (Brasil, 2024).

O ZIKV pertence a espécie *Orthoflavivirus zikaense* e é disseminado predominantemente por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *A. aegypti*. No entanto, há outras vias de transmissão, incluindo via sexual, vertical e sanguínea. Ademais, o vírus já foi encontrado em diversos fluidos corporais como urina, saliva, leite materno, fezes e sêmen (Mwaliko *et al.*, 2021) A maioria das pessoas infectadas são assintomáticas, porém, dentre aqueles que desenvolvem sintomas, é comum apresentar dores de cabeça, febre, dores nas articulações, dor muscular e conjuntivite (Pielnaa *et al.*, 2020) Em gestantes, a infecção viral se estende por um período mais longo, podendo causar a síndrome congênita do ZIKV, caracterizada por inúmeras anomalias congênitas (De Amorin Vilharba *et al.*, 2023; Mwaliko *et al.*, 2021).

Em 2016, a OMS declarou o ZIKV como emergência de saúde pública internacional após um surto do vírus no Brasil em 2015, no Nordeste (Mwaliko *et al.*, 2021). Logo após o surto, o vírus se disseminou pelas Américas, atingindo mais de 80 países em março de 2017 (Antoniou *et al.*, 2023). Atualmente, o vírus está presente principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, abrangendo cerca de 92 países, principalmente África, Sudeste Asiático e América Latina (Gardini Sanches Palasio *et al.*, 2023; Giraldo; Gonzalez-Orozco; Rajsbaum, 2023) No Brasil, entre os anos de 2015 e 2021, foram notificados 404.779 casos de ZIKA

(Gardini Sanches Palasio *et al.*, 2023). Ademais, de 2015 a 2020, o Ministério da Saúde do Brasil confirmou 3.523 casos de síndrome congênita associados ao vírus ZIKA (De Amorim Vilharba *et al.*, 2023).

A febre amarela é uma doença infecciosa viral causada pela espécie *Orthoflavivirus flavi*. O vírus é transmitido por mosquitos dos gêneros *Haemagogus*, das espécies *H. janthinomys* e *H. leucocelaenus*, e alguns casos por *A. aegypti* e *A. albopictus* (Sadeghieh *et al.*, 2021; Tuells; Henao-Martínez; Franco-Paredes, 2022). Os sintomas da infecção variam desde febre, dores nas articulações, dores corporais e náuseas até doença hepática, caracterizada por hemorragia e icterícia (Malik *et al.*, 2023). O vírus é endêmico em regiões subtropicais e tropicais da África, América do Sul e América Central (Malik *et al.*, 2023). O YFV é dividido em duas linhagens, na qual a primeira linhagem abrange quatro genótipos, dois na África Ocidental e dois na América do Sul. A segunda linhagem abrange três genótipos identificados na África Central/Oriental (Gianchechchi *et al.*, 2022). A doença não possui tratamento específico, logo, são necessárias medidas preventivas para evitar sua disseminação, como a vacinação (Schnyder *et al.*, 2024). A vacina contra a febre amarela foi desenvolvida há mais de 80 anos e introduzida no Brasil em 1937, proporcionando respostas imunológicas duradouras com apenas uma dose (Sadeghieh *et al.*, 2021; Schnyder *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2022).

Nos últimos anos houve uma expansão das áreas de risco para transmissão do YFV (Tuells; Henao-Martínez; Franco-Paredes, 2022). No mundo, são notificados cerca de 200 mil casos da doença e 30 mil mortes por ano (Malik *et al.*, 2023). Atualmente, a OMS considera que existem 44 países na África Subsaariana e nas Américas (América do Sul e Central) com casos esporádicos, selvagens, epizoóticos, ocasionais e surtos urbanos de febre amarela (Tuells; Henao-Martínez; Franco-Paredes, 2022). No Brasil, a doença tem caráter sazonal, com surtos entre novembro e abril, durante a estação chuvosa (Sadeghieh *et al.*, 2021). Em 2016, ocorreu uma das epidemias mais significativas da febre amarela silvestre no Brasil, responsável por 2.114 casos notificados da doença e mais de 700 mortes (De Oliveira Figueiredo *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022). Ademais, no Brasil, entre os anos de 2000 e 2021, a doença teve uma taxa de letalidade de 47,8% (Silva *et al.*, 2022).

O WNV, pertencente a espécie *Orthoflavivirus nilense*, é responsável por causar a Febre do Nilo Ocidental. O vírus pode ser transmitido por uma variedade de mosquitos, no entanto, os principais vetores são do gênero *Culex*. A maioria das infecções é assintomática, porém, em casos sintomáticos, os sintomas podem variar desde mal-estar até doenças neuro invasivas (Chancey *et al.*, 2015). O WNV é reconhecido como o flavivírus mais amplamente distribuído no mundo, presente em todos os continentes, exceto a Antártica (Zhang *et al.*, 2023)

Atualmente, o arbovírus é frequentemente encontrado na África, Europa, América do Norte, Oriente Médio e Ásia. Em 2014, no Piauí, foi relatada a primeira infecção pelo vírus em um ser humano no Brasil (Costa *et al.*, 2021). De 2014 a 2022, a Secretaria de Estado da Saúde do Piauí (SESAPI), registrou 10 casos de Febre do Nilo Ocidental, e um caso registrado em equino, deixando evidente a circulação do vírus em território nacional.

O SLEV, espécie *Orthoflavivirus luisense*, é transmitido por mosquitos do gênero *Culex* e a maioria das infecções são assintomáticas (Simon; Kong; Graham, 2024). Nos casos sintomáticos, os sintomas podem ser leves ou, em casos graves, os sintomas podem incluir febre alta, disfunção neurológica, alteração da consciência, encefalite ou meningoencefalite (Barbosa Costa *et al.*, 2019) O vírus é amplamente distribuído nas Américas, principalmente nos Estados Unidos (Simon; Kong; Graham, 2024) No Brasil, em 1971 e 1978, foram registradas duas infecções humanas por SLEV, ambas na região Amazônica. No estado de São Paulo, houve o primeiro isolamento do vírus de um caso humano em 2004 (Mondini *et al.*, 2007; Rocco *et al.*, 2005) Nos últimos anos, foram registrados casos esporádicos de infecção por SLEV nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país. A maioria dos casos são diagnosticados de forma inadequada, frequentemente confundidos com suspeitas de dengue (Barbosa Costa *et al.*, 2019)

O ROCV, espécie *Orthoflavivirus ilheusense*, é transmitido por mosquitos dos gêneros *Psorophora*, *Aedes* e *Culex*. Os sintomas da infecção englobam febre, mal-estar, dor de cabeça intensa, fraqueza nos membros inferiores e distúrbios neurológicos graves. Em cerca de 20% dos pacientes que sobrevivem, são observadas sequelas neurológicas permanentes. No Brasil, o ROCV é responsável por uma infecção neurológica potencialmente fatal que afeta os seres humanos (Saivish *et al.*, 2021). Durante a década de 1970, o ROCV foi identificado pela primeira vez após surtos em comunidades costeiras de São Paulo, desencadeando a maior epidemia de encefalite arboviral registrada no Brasil, acometendo mais de mil pessoas, com 100 óbitos e 200 pessoas com sequelas graves. O vírus circula em diversas regiões do país, porém, a maioria das infecções apresenta sintomas leves, logo, elas são subnotificadas ou atribuídas a outros arbovírus, como a dengue (Romano-Lieber; Iversson, 2000; Saivish *et al.*, 2021).

A família *Togaviridae* é composta por vírus envelopados com genoma RNA fita simples positiva e possui o gênero *Alphavirus* (Wang; Zhang, 2019). O gênero *Alphavirus*, inclui vírus emergentes que causam grandes epidemias na África, Europa, Oceania, América do Sul e Sudeste Asiático (Abdoullah *et al.*, 2023). Os vírus são transmitidos por mosquitos e causam manifestações como artrite e encefalite em humanos e animais (Wang; Zhang, 2019). Os membros deste gênero incluem alfavírus do Velho Mundo e do Novo Mundo. Os vírus do Velho

Mundo, como o vírus Sindbis (SINV), o vírus Chikungunya (CHIKV) e o vírus do Rio Ross (RRV), são encontrados principalmente na África, Europa e Ásia. Eles são caracterizados por causar febres, erupções e artralgia. Os alfavírus do Novo Mundo, incluindo os vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), oriental (EEEV) e ocidental (WEEV), além do vírus Mayaro (MAYV), são encontrados principalmente nas Américas e são conhecidos por causar encefalite (Azar *et al.*, 2020).

A Chikungunya é uma arbovirose causada pelo *Alphavirus chikungunya* (Grabenstein; Tomar, 2023). O vírus possui quatro genótipos espalhados pelo mundo, sendo eles: África Ocidental (WA), África Oriental/Central/Sul (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL) (Zhang *et al.*, 2023) O CHIKV é transmitido através da picada de mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus*, e provoca sintomas na maioria das pessoas infectadas, semelhantes com a dengue, como febre, artrite, erupções cutâneas, mialgia e dores de cabeça, além de afetar as articulações, sendo essa uma das manifestações clínicas mais características da doença (Silva; Dermody, 2017; Vu; Jungkind; Angelle Desiree LaBeaud, 2017).

O CHIKV possui uma distribuição abrangente, presente principalmente na África, Ásia, América do Sul e Oceania. Desde 1952, quando os primeiros casos de infecção foram relatados, até 2021, a infecção pelo vírus foi registrada em mais de 100 países (Costa *et al.*, 2023). No final de 2014, nas Américas, o vírus se tornou um problema de saúde pública, com quase um milhão de casos notificados e 71 mortes (De Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). O vírus foi disseminado em todo território brasileiro, principalmente o genótipo ECSA, gerando diversos surtos em todo o país, com mais de 200 mil casos confirmados apenas nos anos de 2021 e 2022 (Xavier *et al.*, 2023) Em outubro de 2022, foram registrados aproximadamente 3,4 milhões casos de Chikungunya e 70 mortes em todo o mundo, sendo o Brasil o país com o maior número de casos (Ratnayake *et al.*, 2023)

O MAYV, espécie *Alphavirus mayaro*, é responsável por desencadear a Febre Mayaro, uma doença infecciosa caracterizada por sintomas como febre, calafrios, dor ocular, mialgia, artralgia e manifestações gastrointestinais. O vírus é transmitido principalmente por mosquitos fêmeas do gênero *Hemagogus*, porém, existem evidências de transmissão por mosquitos do gênero *Aedes* (Diagne *et al.*, 2020; Esposito; Fonseca, 2017). O MAYV é endêmico em algumas regiões da América do Sul, América Central e Caribe. O Brasil é o país mais afetado, com o maior número de casos registrados da doença, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste (Andreolla *et al.*, 2022; Diagne *et al.*, 2020). De dezembro de 2014 a janeiro de 2016, foram registrados 343 casos suspeitos de Febre Mayaro no Brasil, sendo que mais de 50% desses casos foram identificados no estado de Goiás (Esposito; Fonseca, 2017).

Os vírus da encefalite equina, sendo eles VEEV, espécie *Alphavirus venezuelan*, EEEV, espécie *Alphavirus eastern*, e WEEV, espécie *Alphavirus western*, são agentes patogênicos relevantes para a saúde animal, pública e segurança biológica (Stromberg *et al.*, 2020). Inúmeros mosquitos são capazes de transmitir esses vírus, como *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Haemagogus*, *Sabethes*, *Deinocerites* e *Anopheles* (Banda; Samanta, 2024; Guzmán-Terán *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2018). Esses vírus podem provocar uma ampla gama de sintomas, que variam desde febre até encefalite grave. Eles são responsáveis por causar infecções virais frequentes nas Américas e possuem variantes norte-americanas e sul-americanas (Guzmán-Terán *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2018) No Brasil, o primeiro caso de infecção pelo EEEV em humanos foi registrado em 1956, na Bahia. Além disso, estudos sorológicos têm demonstrado a presença de anticorpos anti-EEEV, anti-WEEV e anti-VEEV em diversas regiões do país, sugerindo a possibilidade de infecções não diagnosticadas (Iversson, 1980; Iversson; Coimbra, 1984; PAUVOLID-CORRÊA, 2008)

A família *Peribunyaviridae* é composta por vírus envelopados com formato esférico, distribuídos em oito gêneros: *Orthobunyavirus*, *Gryffinivirus*, *Herbevirus*, *Khurdivirus*, *Lakivirus*, *Lambavirus*, *Pacuvirus* e *Shangavirus* (Costa, 2018; De Souza *et al.*, 2024). Os vírus possuem genoma de RNA fita simples negativo tri-segmentado, ou seja, possui três segmentos: pequeno (S), médio (M) e grande (L). O segmento S é responsável por codificar a proteína do nucleocapsídeo (N), e em alguns vírus do gênero *Orthobunyavirus*, codificam a proteína não estrutural S (NSs). O segmento M codifica as glicoproteínas Gn e Gc, e em alguns gêneros, como *Orthobunyavirus*, *Pacuvirus* e *Shangavirus*, codificam também a proteína não estrutural M (NSm). Já o segmento L é responsável por codificar a RdRp, uma enzima polimerase responsável pela replicação do genoma viral (De Souza *et al.*, 2024). Os peribuniavírus encontram-se distribuídos em todos os continentes, exceto na Antártida, e podem causar doenças em humanos, com sintomas como erupções cutâneas, febres, mialgias, doenças pulmonares, encefalites ou febres hemorrágicas virais (Costa, 2018; De Souza *et al.*, 2024). Alguns membros dessa família incluem o vírus da Febre do Rift Vale (RVF), vírus da Febre Hemorrágica do Crimeia-Congo (FHCC), vírus La Crosse (LACV) e o vírus Oropouche (OROV). O OROV possui grande importância epidemiológica no Brasil, visto que é responsável por causar diversas epidemias na Amazônia (Costa, 2018).

O OROV, espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*, causa a febre de Oropouche, uma doença febril com sintomas que se sobrepõem a outras arboviroses, como cefaleia, mialgia, artralgia, náusea, dor retro-orbital e fotofobia (Riccò *et al.*, 2024). O OROV é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Culicoides*, espécie *C. paraensis* e gênero *Culex*,

espécie *C. quinquefasciatus*. No entanto, várias espécies de mosquitos já foram consideradas vetores para a transmissão do vírus, incluindo *A. serratus* e outras espécies de *Culicoides* (Desai *et al.*, 2024; Riccò *et al.*, 2024). Em 1995, em Trinidad e Tobago, houve o primeiro caso identificado de OROV em um trabalhador florestal (Riccò *et al.*, 2024; Tilston-Lunel, 2024). Posteriormente, o vírus se disseminou para América Central e do Sul, em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Bolívia, Equador, Guiana Francesa, Panamá, Peru e Venezuela (Riccò *et al.*, 2024; Scachetti *et al.*, 2025).

O OROV é considerado endêmico nas Américas, principalmente no estado do Amazonas, no qual o clima e o ambiente favorecem a proliferação de vetores (Martins-Filho; Carvalho; Dos Santos, 2024; Porwal *et al.*, 2025). Durante décadas a infecção causada pelo OROV foi relatada de forma esporádica no Brasil e em outros países da América do Sul (Salvato, 2025). No entanto, em 2023, foram registrados surtos da doença na região Norte do Brasil. Em 2024 o surto se estendeu para estados brasileiros considerados não endêmicos, afetando as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Godinho *et al.*, 2025; Salvato, 2025). No Brasil, entre janeiro de 2015 a março de 2024, foram registrados mais de 5 mil casos de OROV, dos quais 52% ocorreram entre homens e 48% entre mulheres, e a maioria entre pessoas de 20 a 59 anos (Martins-Filho; Carvalho; Dos Santos, 2024). O surto no país persiste em 2025, com 11.853 casos confirmados entre janeiro e maio deste ano (Godinho *et al.*, 2025).

O diagnóstico clínico de arboviroses é dificultado pela presença de sintomas inespecíficos e pela circulação de múltiplos vírus transmitidos por vetores comuns na mesma região, dificultando a identificação precisa dessas infecções (Patel *et al.*, 2013). Além disso, no Brasil, há evidências de infecções subclínicas ou clínicas frequentemente não diagnosticadas por arbovírus (Iversson, 1980). Logo, são necessárias técnicas eficazes para identificação específica e simultânea de diferentes arbovírus.

Os métodos de diagnóstico mais empregados para detecção de vírus das famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Peribunyaviridae* abrangem a identificação de anticorpos específicos contra o vírus, o isolamento e a identificação viral por imunoensaios, e a detecção do genoma viral, por meio da transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Islam *et al.*, 2020). O isolamento viral em cultivo celular foi considerado por anos como padrão ouro para detecção, permitindo a multiplicação do vírus e sua caracterização. No entanto, esse método demanda tempo, equipamentos especializados e uma equipe qualificada (Natrajan; Rojas; Waggoner, 2019). De maneira geral, muitos laboratórios utilizam testes sorológicos para realizar o diagnóstico de arboviroses, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), capaz de detectar anticorpos IgM e IgG específicos. Apesar de apresentarem vantagens, como a rapidez

e o baixo custo, os métodos sorológicos apresentam limitações, visto que antes de 5 a 7 dias, os anticorpos não são detectáveis, limitando a utilidade desses testes (Patel *et al.*, 2013; Varghese; De Silva; Millar, 2023). Ademais, na técnica de ELISA, o anticorpo IgG apresenta alto grau de reatividade cruzada entre antígenos homólogos e heterólogos de vírus altamente relacionados, comprometendo a interpretação clara do diagnóstico e gerando resultados falsos positivos (Islam *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2013; Varghese; De Silva; Millar, 2023).

As técnicas moleculares como a RT-qPCR é capaz de detectar o material genético viral e pode ser utilizada na fase aguda da infecção (Patel *et al.*, 2013). A RT-qPCR é considerada padrão-ouro para o diagnóstico de doenças virais, apresentando alta eficácia devido à sua sensibilidade, especificidade e rapidez (Costa; Ferreira; Santos, 2021; Mhamadi *et al.*, 2023). Na técnica, ocorre simultaneamente a amplificação e quantificação do material genético testado, reduzindo o tempo necessário para a reação e minimizando a possibilidade de contaminação cruzada (Licínio; Ayres, 2021). Ademais, a partir da RT-qPCR, é possível sintetizar *primers* e sondas pan-família, capazes de detectar diferentes espécies de arbovírus ao mesmo tempo em ensaios *multiplex*, auxiliando durante surtos de arbovírus (Varghese; De Silva; Millar, 2023). Portanto, utilizar a RT-qPCR para o diagnóstico simultâneo e diferencial de vírus dos gêneros *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense* pode ser uma alternativa para complementar a vigilância epidemiológica das diversas regiões brasileiras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analizar e padronizar ensaios de RT-qPCR para detecção de arbovírus, a partir de análises *in silico* para *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e a espécie *Orthobunyavirus oropoucheense* com validação experimental para *Orthobunyavirus oropoucheense* e Mayaro.

### 2.2 Objetivos específicos

- Selecionar diferentes *primers* e sondas previamente descritos na literatura para a detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense*;
- Realizar a análise *in silico* dos *primers* e sondas selecionados;
- Avaliar o desempenho analítico de ensaios de RT-qPCR para detecção de *Orthobunyavirus oropoucheense* e Mayaro, baseados em condições previamente descritas na literatura, comparando os formatos *singleplex* e *multiplex*;
- Validar o ensaio em relação a especificidade e eficiência de amplificação.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Obtenção dos *primers* e sondas

Os *primers* e sondas utilizados neste estudo foram selecionados por meio de uma revisão literária na base de dados PubMed. A busca foi direcionada para artigos publicados em periódicos científicos e trabalhos acadêmicos como dissertações de mestrado e teses de doutorado, publicados a partir dos anos 2000, que utilizaram técnicas moleculares para detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense* utilizando as combinações das palavras-chave: “flavivirus”, “alfavirus”, “oropouche”, “arbovirus”, “RT-qPCR” e “development”.

### 3.2 Obtenção das sequências genômicas virais

Para a realização das análises *in silico*, foram obtidas sequências genômicas virais em formato FASTA a partir do *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC), um banco de dados que reúne genomas de patógenos bacterianos e virais, sendo a maioria coletados do GenBank, com atualização diária de novos genomas (Olson *et al.*, 2023). As sequências foram selecionadas baseadas em vírus isolados de amostras humanas, animais ou de mosquitos, priorizando-se isolados do Brasil, seguido por outras países da América do Sul, das Américas ou de outras regiões do mundo. Foram selecionadas vinte sequências genômicas representativas de cada vírus alvo pertencentes aos gêneros *Orthoflavivirus* (**Apêndice A**), *Alphavirus* (**Apêndice B**) e ao vírus Oropouche (**Apêndice C**), com o objetivo de contemplar a variabilidade genética descrita para esses grupos virais.

### 3.3 Análise *in silico*

As análises *in silico* dos *primers* e sondas foram realizadas com o objetivo de avaliar parâmetros que pudessem interferir na especificidade e eficiência das reações moleculares. Para isso, foram utilizados os softwares *Unipro UGENE* (*Unipro LLC*), *OligoAnalyzer* (*Integrated DNA Technologies*) e *Multiple Primer Analyzer* (*Thermo Fisher Scientific*).

O *Unipro UGENE* é um software que possui diversas ferramentas de bioinformática em uma interface gráfica e utiliza o mesmo modelo de dados para todas as ferramentas, permitindo a visualização de sequências de DNA, RNA, proteínas, alinhamento de múltiplas sequências, entre outros (Golosova *et al.*, 2014; Okonechnikov; Golosova; Fursov, 2012). Neste estudo, o software foi utilizado para a avaliação de alinhamentos múltiplos, predição de sequências consenso, e da similaridade dos *primers* e sondas com as sequências genômicas virais selecionadas. As sequências genômicas foram alinhadas através do programa *Clustal Omega* e a sequência consenso gerada foi exportada. Cada conjunto de *primers* e sondas foi alinhado a sequência consenso de cada vírus alvo, com o objetivo de verificar a ocorrência de alinhamento, a localização do sítio de ligação no gene alvo esperado e a similaridade entre as sequências e os *primers*, especialmente nas regiões terminais dos *primers*.

O *OligoAnalyzer* foi empregado para a avaliação das propriedades físico-químicas dos *primers* e sondas, incluindo número de bases (pB), porcentagem de guanina e citosina (%GC), temperatura de *melting* (Tm, em °C) e a formação potencial de *hairpins* e *self-dimers*. O

*Multiple Primer Analyzer* foi utilizado para detectar a presença de *cross dimers* entre todos os *primers* e sondas selecionados. Posteriormente, os *cross dimers* identificados foram analisados no *OligoAnalyzer* para determinação dos valores de energia livre de *Gibbs* ( $\Delta G$ ). A análise de dímeros e estruturas secundárias foi baseada nos valores de  $\Delta G$  preditos pelo *software*, considerando que valores de  $\Delta G$  mais negativos indicam maior estabilidade das estruturas formadas e maior probabilidade de interferência na amplificação (Owczarzy *et al.*, 2008).

### 3.4 Validação experimental de uma RT-qPCR

#### 3.4.1 Cepas Virais

Para a validação experimental de uma RT-qPCR *multiplex* para detecção de MAYV e OROV, foram utilizadas neste estudo amostras de cultivo viral de diferentes arbovírus. De OROV, foi utilizada a cepa BeAn 19991 (GenBank: KP052850.1) cultivada em células VERO E6 a uma concentração de  $4,8 \times 10^6$  unidades formadoras de placa/mL (UFP/mL). Para o MAYV, foram utilizadas duas cepas, sendo a cepa BeAr 20290 (MAYV- selvagem) (GenBank: KT754168), e uma versão recombinante da mesma cepa modificada com o gene *reporter* da luciferase (MAYV-*nanoluc*) (Marinho *et al.*, 2024) ambas cultivadas em células BHK às concentrações de  $3,0 \times 10^7$  e  $2,7 \times 10^8$  UFP/mL, respectivamente. Essas três cepas foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Ana Carolina Gomes Jardim, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Além dessas, cepas de DENV-4, CHIKV, ZIKV, YFV e uma amostra de células cultivadas sem infecção viral, nomeada como controle negativo (CN) no estudo, foram utilizadas, sendo que essas fazem parte do Programa de Ensaio de Proficiência da Fundação Ezequiel Dias (PEP-FUNED), e informações adicionais não foram repassadas pela instituição.

#### 3.4.2 Extração de RNA

A extração de RNA total das amostras foi realizada a partir de 250  $\mu\text{l}$  de cada amostra utilizando o kit comercial “*TANBead® Nucleic Acid Extraction Kit ®*”, no extrator automático de ácidos nucleicos *Maelstrom 4800* (*Taiwan Advanced Nanotech Inc., Taoyuan, Taiwan*), seguindo as orientações do fabricante. O extrator utiliza tecnologia de *beads* magnéticas revestidas por dióxido de silício, capazes de adsorver as moléculas com carga negativa e

purificar o material genético presente nas amostras. A amostra é submetida a diferentes processos e tampões, incluindo ativação das *beads*, tampão de lise, mistura com as *beads*, processos de lavagem com diferentes tampões, eluição e por fim, liberação das *beads* e do ácido nícleico (Taiwan Advanced Nanotech Inc, 2024). No final da extração, o RNA foi eluído em 30µL de tampão de eluição.

### 3.4.3 Condições da reação de RT-qPCR

Para cada reação foram utilizados 5µL de RNA total em um ensaio com volume final de 20µL. Os *primers* e sondas descritos por Naveca *et al.* (2017) para MAYV (**Tabela III**) e OROV (**Tabela IV**), foram escolhidos para o ensaio, e utilizados na concentração de 300 nM de *primer* e 100 nM de sonda, conforme estabelecido pelos autores. A sonda OROV\_FNP foi marcada com o fluoróforo FAM como *reporter* e Black Hole Quencher 1 (BHQ1) como *quencher*. A sonda MAYV\_FNP foi marcada com o fluoróforo HEX como *reporter* e BHQ1 como *quencher*. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). O kit *iTaq Universal Probes One-Step* (*Bio-Rad*) foi utilizado para a amplificação, seguindo os parâmetros de ciclagem recomendados pelo fabricante: 50°C por 10 minutos para a transcrição reversa, 95°C por 3 minutos para a ativação da Taq DNA polimerase e desnaturação inicial, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação e de 60°C por 60 segundos para anelamento e extensão. Foram realizados ensaios tanto no formato *singleplex*, com *primers* e sondas específicos para apenas um dos alvos, como *multiplex*, com *primers* e sondas específicos para os dois alvos simultaneamente. Todas as amostras foram testadas em triplicatas.

### 3.4.4 Avaliação da especificidade e eficiência da reação

Para verificar a amplificação dos alvos e a especificidade da reação, foram realizados ensaios *singleplex* e *multiplex* para detecção de OROV e MAYV. O resultado foi baseado nos valores de Cq (*quantification cycle*) médio para cada uma das cepas descritas anteriormente (item 3.4.1), analisadas em triplicata. Ademais, foi realizado um segundo experimento com uma curva padrão para determinar e comparar a eficiência da reação, a partir de ensaios *singleplex* e *multiplex* utilizando amostras em triplicatas de OROV e MAYV selvagem submetidas a diluições seriadas. Nesse segundo ensaio, o RNA extraído das amostras de OROV e MAYV-selvagem foram submetidos a oito diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em água livre de DNase e

RNAse. A diluição  $10^{-1}$  foi feita a partir da passagem de 5 $\mu$ L do RNA extraído para outro microtubo com 45 $\mu$ L de água livre de DNase e RNAse. A diluição de  $10^{-2}$  foi realizada a partir da passagem de 5 $\mu$ L da diluição anterior para outro microtubo com 45 $\mu$ L de água livre de DNase e RNAse, repetindo-se o processo até a oitava diluição. Novamente, foram calculados os valores médios de Cq para cada uma das diluições, testadas em triplicata.

### 3.4.5 Análise estatística

Para a análise estatística das curvas padrão, a eficiência dos ensaios de RT-qPCR em formato *multiplex* foi avaliada em relação às reações *singleplex* para cada alvo (OROV e MAYV). As curvas padrão foram construídas a partir dos valores médios de Cq obtidos para cada uma das diluições seriadas do RNA viral, e a regressão linear foi realizada entre o Cq médio e o logaritmo decimal da diluição. A partir dessa regressão, foram determinados o *slope* (inclinação da reta), o intercepto e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ). A eficiência de amplificação foi calculada com base no valor do *slope*. As análises estatísticas e gráficas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism 8* (versão 8.0.2), permitindo a comparação do desempenho dos ensaios nos formatos *singleplex* e *multiplex* para cada um dos alvos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise da literatura e definição dos vírus alvos

Utilizando a combinação de palavras-chave “RT-qPCR”, “development” e “flavivirus”, ou “alfavirus”, ou “oropouche”, ou “arbovirus” a base de dados PubMed retornou 188 trabalhos científicos publicados após os anos 2000. Entretanto, após a leitura do resumo ou “abstract” constatou-se que apenas 17 trabalhos tiveram como objetivo o desenvolvimento e descrição de uma RT-PCR (em tempo real ou convencional) para detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus*. Esses trabalhos compuseram a base para desenvolvimento deste estudo (**Tabela I**). Com base nos estudos selecionados durante a revisão literária e em dados epidemiológicos de circulação de arbovírus no Brasil e que possivelmente podem circular na região de Patos de Minas, Minas Gerais, os vírus alvos foram definidos como:

- *Orthoflavivirus*: DENV (1-4), SLEV, JEV, YFV, WNV, ROCV e ZIKV;
- *Alphavirus*: CHIKV, WEEV, EEEV, VEEV e MAYV;
- *Orthobunyavirus*: OROV.

#### **4.2 Obtenção dos *primers* e sondas**

A seleção dos *primers* e sondas foi realizada por meio do levantamento dos dados apresentados nos estudos selecionados que descreveram as sequências utilizadas para detecção de *Orthoflavivirus* (**Tabela II**), *Alphavirus* (**Tabela III**) e *Orthobunyavirus* (**Tabela IV**) para posterior análise *in silico*.

#### **4.3 Análise *in silico***

##### **4.3.1 Alinhamento e similaridade dos *primers* e sondas à sequencias virais alvo**

Para avaliar o alinhamento e a similaridade dos *primers* e sondas, foram selecionadas vinte sequências genômicas depositadas no banco de dados BV-BRC de cada vírus alvo de *Orthoflavivirus* (**Apêndice A**), *Alphavirus* (**Apêndice B**) e *Orthobunyavirus oropoucheense* (**Apêndice C**). Foram selecionados e destacados em negrito os *primers* que apresentaram maior similaridade com as sequências consenso para *Orthoflavivirus* (**Tabela V**), *Alphavirus* (**Tabela VI**) e *Orthobunyavirus oropoucheense* (**Tabela VII**). Além disso, também foi considerado a presença de bases degeneradas na composição dos *primers*, visto que *primers* degenerados possuem um custo maior para serem sintetizados. A representação gráfica dos alinhamentos dos oligonucleotídeos selecionados encontram-se nos **Apêndices D a S**.

Para DENV (1-4) os *primers* e sondas descritos por Dyer; Chisenhall; Mores (2007) foram considerados os mais adequados, devido à alta similaridade entre as sequências consenso e os *primers*. Logo, considerando a utilização do termociclador *QuantStudio 3*, disponível para as pesquisas conduzidas no Laboratório de Diagnóstico e Análises Moleculares (LDAM), capaz de detectar apenas 3 alvos por reação (incluindo o controle interno), é necessário a realização de duas reações de RT-qPCR em formato *multiplex*, uma para detecção dos sorotipos 1 e 3, e outra para os sorotipos 2 e 4. Ademais, é possível o desenvolvimento de uma RT-qPCR *multiplex* para JEV e ROCV utilizando os *primers* de Chao; Davis; Chang (2007), que

demonstraram alta similaridade com a sequência consenso dessas duas espécies virais, além da ausência de bases degeneradas. No entanto, para ROCV é necessário a inclusão de uma sonda, visto que o autor não descreve uma para esse vírus especificamente. Sugere-se então que o *primer reverse* ROCV/NS5R descrito por Henriques (2009) poderia ser utilizado como sonda, pois apresenta 100% de similaridade com a sequência consenso dessa espécie viral e é complementar a uma região localizada entre os *primers forward* e *reverse* da reação proposta Chao; Davis; Chang (2007). Os *primers* de Chao; Davis; Chang (2007) também apresentaram os melhores resultados para YFV, sugerindo então uma reação de YFV separada, devido a limitação do *QuantStudio 3*. Para SLEV e WNV, é possível utilizar os *primers* descritos por Brault; Fang; Reisen (2015) para uma RT-qPCR *multiplex*, devido a boa similaridade e a ausência de bases degeneradas.

Para ZIKV e CHIKV, os oligonucleotídeos descritos por Álvarez-Díaz *et al.* (2021) apresentaram 100% de similaridade, logo, sendo a melhor opção para uma RT-qPCR *multiplex* para detecção desses alvos. Os *primers* descritos por Vina-Rodriguez *et al.* (2016) apresentaram alta similaridade para os vírus VEEV, WEEV e EEEV, principalmente para WEEV e EEEV, com 100% de similaridade e ausência de bases degeneradas, permitindo o desenvolvimento de uma RT-qPCR *multiplex* para WEEV e EEEV. Já para VEEV, sugere-se uma reação separada, devido a limitação do termociclador. Para MAYV e OROV, os melhores resultados foram os *primers* descritos por Naveca *et al.*, (2017), que apresentaram 100% de similaridade para OROV e MAYV (exceto para MAYV\_FNR) e ausência de bases degeneradas nos *primers* para OROV e na sonda de MAYV, logo, sendo possível desenvolver uma RT-qPCR *multiplex* para esses alvos. Os *primers* descritos por Naveca *et al.*, (2017) foram utilizados na parte experimental desse estudo para detecção simultânea dos vírus Mayaro e *Orthobunyavirus oropoucheense* por meio de uma RT-qPCR *Multiplex*.

**Tabela I** - Trabalhos selecionados na revisão da literatura para as análises de desenvolvimento de ensaios de RT-qPCR para a detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense*

	Autor	Ano	Publicação	Palavras-chave
1	Álvarez-Díaz <i>et al.</i>	2021	<i>Infection, Genetics and Evolution</i>	Arbovirus, <i>Viral load</i> , RT-qPCR, Chikungunya, Dengue, Zika
2	Brault; Fang; Reisen	2015	<i>Journal of Medical Entomology</i>	<i>Multiplex, Surveillance, West Nile virus, Western equine encephalitis virus, St. Louis encephalitis virus</i>
3	Camarão <i>et al.</i>	2019	<i>Journal of Virological Methods</i>	<i>Simbu serogroup viruses, Clade A, Clade B, TaqMan®, Real-time RT-PCR</i>
4	Carrera <i>et al.</i>	2023	<i>Journal of Clinical Microbiology</i>	<i>Venezuelan equine encephalitis, Madariaga virus, Eastern equine encephalitis virus, Alphavirus, rRT-PCR</i>
5	Chao; Davis; Chang	2007	<i>Journal of Clinical Microbiology</i>	-
6	Coimbra <i>et al.</i>	2008	Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo	<i>Rocio virus, RT-PCR, Phylogenetic analysis, Disease diagnosis</i>
7	Dyer; Chisenhall; Mores	2007	<i>Journal of Virological Methods</i>	<i>Multiplex, Flavivirus, Arbovirus, qRT-PCR</i>
8	Giry <i>et al.</i>	2017	<i>BMC Microbiology</i>	<i>Alphavirus, Molecular diagnosis, Virus emergence</i>
9	Henriques	2009	Universidade Federal do Pará (Mestrado em Doenças Tropicais)	Infecção persistente, Flavivírus, Vírus Rocio e Vírus Ilhéus
10	De Lima Cavalcanti <i>et al.</i>	2024	<i>Pathogens</i>	<i>Surveillance; PRNT; arbovirus; RT-qPCR</i>

11	<b>Mansuy et al.</b>	2018	<i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i>	Zika, Dengue, Chikungunya, PCR, Molecular, <i>Multiplex</i>
12	<b>Naveca et al.</b>	2017	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz	<i>Real-time PCR, Mayaro virus, Oropouche virus, Amazon</i>
13	<b>Pabbaraju et al.</b>	2016	<i>Journal of Clinical Virology</i>	Arbovirus, Zika, Chikungunya, Dengue, <i>Multiplex real-time RT-PCR, Molecular diagnosis</i>
14	<b>Patel et al.</b>	2013	<i>Virology Journal</i>	<i>Pan-Flavi assay, Locked-nucleic acid, Flaviviruses, qRT-PCR</i>
15	<b>Rojas et al.</b>	2020	<i>Diagnostic Microbiology and Infectious Disease</i>	<i>Oropouche virus, Orthobunyavirus, Reverse Transcriptase PCR, Quantitative Real-Time PCR</i>
16	<b>Vina-Rodriguez et al.</b>	2016	<i>BioMed Research International</i>	-
17	<b>Wise et al.</b>	2020	<i>PLOS Neglected Tropical Diseases</i>	-

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica dados não informados pelos autores.

**Tabela II** – Sequências de *primers* e sondas descritos na literatura para detecção molecular de *Orthoflavivirus* utilizados no presente estudo

Referência	Vírus	Primer	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Posição genômica
Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	DENV	DENV1-4 F	TGTACGCACGGGGTAGCAGACT	-	10490–10511
		DENV1-4 R	TGTGCCTGGAATGATGCTGHRGAG	-	10692–10669
		DENV1-4 P	GCATATTGACGCTGGARAGA	-	10686–10706
	ZIKV	ZIKV-F	CTGYGGGATCTCCTCTGTYTCAA	Poliproteína	2651–2673
		ZIKV-R	ACGGGCAATCTCTGTGGASCTCT	Poliproteína	2806–2784
		ZIKV-P	ACGGTCGTTGTGGGATCTGTRAAA	Poliproteína	2748–2771
Brault; Fang; Reisen, 2015	SLEV	SLE2420	CTGGCTGTCGGAGGGATTCT	Proteína M	2420–2439
		SLE2487c	TAGGTCAATTGCACATCCCG	Glicoproteína E	2487–2468
		SLE244-probe	TCTGGCGACCAGCGTGCAAGCCG	Glicoproteína E	2444–2466
	WNV	WNENV-forward	TCAGCGATCTCTCCACCAAAG	Proteína M	1160–1180
		WNENV-reverse	GGGTCAGCACGTTGTCATTG	Proteína M	1209–1229
		WNENV-probe	TGCCCGACCATGGGAGAAGCTC	Proteína M	1186–1207
Chao; Davis; Chang, 2007	SLEV, WNV, DENV (1-4)	mFU1	TACAACATGATGGAAAGCGAGAGAAAAAA	NS5	8997
		CFD2	GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCACTCAGC	NS5	9233
		SLEVP	TGCAAGAAATCTCCCAAATCCCAGGAGGA	NS5	-
		WNVP	TGCGTGAAGTTGGCACCCGGCCT	NS5	-
		YFVP	TCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGT	NS5	-
		JEVP	TCCGTGACATAGCAGGAAAGCAAG	NS5	-
		D1P	TCAGAGACATATCAAAGATTCCAGGGGG	NS5	-
		D2P	AAGAGACGTGAGCAGGAAGGAAGGGGGAGC	NS5	-
		D3P	TGAGAGATATTCCAAGATAACCGGAGGAG	NS5	-

		D4P	TGGAGGAGATAGACAAGAAGGATGGAGACC	NS5	-
<b>Coimbra <i>et al.</i>, 2008</b>	ROCV	N1	AGAGAATTCATATGGGGAGTAG	NS5	9066
		N2	TTCAGAAAATGGAGAGCAGTTG	NS5	9620
<b>Dyer; Chisenhall; Mores, 2007</b>	DENV	834	GAAAATGGTTCTGCGCA	Proteína C	834–852
		905C	GTTGCTGCCTAGCATCCATCC	Proteína M	905–889
		<i>PROBE 857</i>	TGGATATGCCCTAGTTGCGCTGGC	Proteína C	857–880
		10589	AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC	NS5	10589-10613
<b>Henriques, 2009</b>	ROCV	10699c	GGCGYTCTGTGCCTGGAWTGATG	NS5	10699-10677
		<i>Probe DEN I/III</i>	AACAGCATATTGACGCTGGGAGAGACC	NS5	10610-10636
		<i>Probe Den II/IV</i>	AACAGCATATTGACGCTGGGAAAGACC	NS5	10616-10642
		ROCV/NS5F	GCTTCTGGAGTCCTCTTCCT	NS5	-
<b>Patel <i>et al.</i>, 2013</b>	SLEV, WNV,	ROCV/NS5R	GGCAAGGTTCTTGAGTTCG	NS5	-
		DEN4 F	TACAACATgATgggRAAACgTgAGAA	NS5	8996–9019
	YFV, JEV,	Flavi all AS4	gTgTCCCAGCCNgCKgTRTCRTC	NS5	9235–9260
		Flavi all <i>probe 3</i>	Tg + gTWYATgTggYTNg + gRgC	NS5	9062–9082
	DENV,	mix	CCgTgCCATATggTATATgTggCTgggAgC	NS5	9052–9081
		Flavi all S	TTTCTggAATTgAAgCCCTgggTTT	NS5	9086–9012
	ZIKV	Flavi all S2	TACAACATgATggggAARAgAgARA	NS5	8993–9019
			TACAACATgATgggMAAACgYgARA	NS5	8996–9019

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica dados não informados pelos autores.

**Tabela III** - Sequências de *primers* e sondas descritos na literatura para detecção molecular de *Alphavirus* utilizados no presente estudo

Autor	Vírus	Primer	Sequência	Gene alvo	Posição genômica
Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	CHIKV	CHIKV-F	RAAGGAGTGCCGGAARGACAT	Poliproteína	1261–1281
		CHIKV-R	GACAACCCGGACGACCACAG	Poliproteína	1458–1439
		CHIKV-P	GARAAGCTYYTGGGGTCAGAGA	Poliproteína	1289–1311
Brault; Fang; Reisen, 2015	WEEV	WEEV-1F	GTCTTCAACTGCCGGATCTTA	-	-
		WEEV-1 R	GGTGTCAAGCGGAATGGAA	-	-
Carrera <i>et al.</i> , 2023	VEEV	WEEV-1 P	CACACAGACCCTCAGTGCAAGGTAAACTGC	-	-
		VEEV forward 1	GAAAGTTACGTTGAYATCGAGGA	nsP1	44–67
		VEEV forward 2	GAAGGTTACGTTGAYATCGAGGA	nsP1	44–67
		VEEV reverse 1	GCTCTGGCRTTAGCATGGTC	nsP1	144–163
		VEEV reverse 2	GCTCTAGCRTTAGCATGGTC	nsP1	144–163
		VEEV probe	TTGAGGTAGAAGCHAAGCAGGTC	nsP1	112–134
		ME forward	GAGATAGAACGCMACGCAGGTC	nsP1	99–119
		ME reverse	TGYTTGGAATGCGTGTGC	nsP1	233–250
De Lima Cavalcanti <i>et al.</i> , 2022	CHIKV	EEEV probe	TGAGGGAGAAGTGGAYACAGACC	nsP1	176–198
		CHIKV 874	AAAGGGCAAACCTCAGCTTCAC	nsP1	874–894
		CHIKV 961	GCCTGGGCTCATCGTTATT	nsP1	961–942
Giry <i>et al.</i> , 2017	CHIKV, MAYV, VEEV,	CHIKV 899	CGCTGTGATAACAGTGGTTCGTGTG	nsP1	899–923
		F2A	ATGATGAARTCIGGIATGTTYYT	nsP4	6844–6866
		R2A	ATYTTIACCTCCATGTTCATCCA	nsP4	7043–7021
		R3A	ATYTTIACCTCCATRTTCARCCA	nsP4	7043–7021
		R4A	ATYTTIACCTCCATGTTGACCCA	nsP4	7043–7021

	EEEV, WEEV	P1	AT + GTT + GTC + GT + CN + CC	nsP4	6971-6958
<b>Mansuy <i>et al.</i>, 2018</b>	CHIKV	CHIK-NS5-F	AAGCTYCGCGTCCTTACCAAG	Proteína E1	10366–10387
		CHIK-NS5-R	CCAAATTGTCCYGGTCTTCCT	Proteína E1	10554–10574
		CHIK-NS5-probe	CCAATGTCYTCMGCCTGGACACCTTT	Proteína E1	10465–10490
<b>Naveca <i>et al.</i>, 2017</b>	MAYV	MAYVFNF	CACGGACMTTTGCCTTCA	nsP1	465-483
		MAYVFNR	AGACTGCCACCTCTGCTKGAG	nsP1	524-504
		MAYVFNP	ACAGATCAGACATGCAGG	nsP1	485-502
<b>Pabbaraju <i>et al.</i>, 2016</b>	CHIKV	Chik_NSP_For	TGTACTGGCWGCAGCCACG	nsP4	-
		Chik_NSP_Rev	ATAGGGCTGGCAGCAAATT	nsP4	-
		Chik_NSP_VIC_MGB	AACGTCACACAGATGAG	nsP4	-
<b>Vina-Rodriguez <i>et al.</i>, 2016</b>	VEEV	AlphaVIR966F	TCCATGCTAATGCYAGAGCGTTTCGCA	nsP1	151–178
		AlphaVIR966R	TGGCGCACTTCCAATGTCHAGGAT	nsP1	248–225
		INEID-VEEV_probe	TGATCGARACGGAGGTRGAMCCATCC	nsP1	193–218
<b>Vina-Rodriguez <i>et al.</i>, 2016</b>	EEEV	EEE9391	ACACCGCACCCCTGATTTACA	Proteína E2	9391-9411
		EEE9459c	CTTCCAAGTGACCTGGTCGTC	Proteína E2	9459–9439
		EEE.9414probe	TGCACCCGGACCATCCGACCT	Proteína E2	9414–9434
	WEEV	WEE10,248	CTGAAAGTCGGCCTGCGTAT	Poliproteína	10248–10267
		WEE 10,314c	CGCCATTGACGAACGTATCC	Poliproteína	10314–10295
		WEE 10,271probe	ATACGGCAATACCACCGCGCACC	Poliproteína	10271–10293

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica dados não informados pelos autores.

**Tabela IV** - Sequências de *primers* e sondas descritos na literatura para detecção molecular de *Orthobunyavirus oropoucheense* utilizados no presente estudo

Autor	Primer	Sequência	Gene alvo	Posição genômica
<b>Camarão et al., 2019</b>	Simbu_F	TAGAGTCTTCTTCCTCAAYCAGAAGA	Proteína N	120-145
	Simbu_R	TAYTGGGGAAAATGGTTATTAAACCA	Proteína N	218-242
	Simbu_CladeAP	TACGTMAGACGYCGAGG	Proteína N	161-177
	Simbu_CladeBP	TYGGTTGTGSCGTCTT	Proteína N	166-181
<b>Naveca et al., 2017</b>	OROV_FNF	TCCGGAGGCAGCATATGTG	N e NS	98-116
	OROV_FNR	ACAACACCAGCATTGAGCACTT	N e NS	160-139
	OROV_FNP	CATTTGAAGCTAGATAACGG	N e NS	118-136
<b>Rojas et al., 2020</b>	OROV Forward-S	GACAAGTSCTCAATGCTGGTGT	Proteína N	92-113
	OROV Forward-K	GACAAGTGCTCAATGCKGTGT	Proteína N	92-113
	OROV Reverse	CGTTGTCCGGSACTGGATT	Proteína N	247-265
	OROV Probe-Yc	TGGTTGACCTYACTTTGGTGGGGT	Proteína N	179-203
	OROV Probe-Rc	TGGTTGACCTTACTTTTRGTGGGGT	Proteína N	179-203
	OROV F	CATTTGAAGCTAGATAACGGACAA	N e NS	118-140
<b>Wise et al., 2020</b>	Ec2 R	CATCTTGGCCTTCTTTRG	N e NS	198-179
	OROV P	CAATGCTGGTGTGTTAGAGTCTTCTCCT	N e NS	146-175

Fonte: elaborada pelo próprio autor

**Tabela V** – Similaridade entre *primers* e sondas em relação à sequência consenso de *Orthoflavivirus* obtidas utilizando o software *Unipro UGENE* e a presença de bases degeneradas

Vírus	Autor	Primer	Similaridade (%)	Degenerado/Não degenerado
DENV-1	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	DENV1-4 F	95	Não degenerado
		DENV1-4 R	96	Degenerado
		DENV1-4 P	100	Degenerado
	Chao; Davis; Chang, 2007	mFU1	93	Não degenerado
		CFD2	85	Não degenerado
		D1P	96	Não degenerado
	Dyer; Chisenhall; Mores, 2007	<b>10589</b>	<b>100</b>	Degenerado
		<b>10699c</b>	<b>96</b>	Degenerado
		<b>Probe DEN I/III</b>	<b>100</b>	Não degenerado
	Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all S	61	Degenerado
		Flavi all S2	85	Degenerado
		Flavi all AS4	61	Degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 1</i>	77	Degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i>	90	Não degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	88	Não degenerado
DENV-2	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	DENV1-4 F	82	Não degenerado
		DENV1-4 R	96	Degenerado
		DENV1-4 P	100	Degenerado
	Chao; Davis; Chang, 2007	mFU1	90	Não degenerado
		CFD2	81	Não degenerado
		D2P	90	Não degenerado
	Dyer; Chisenhall; Mores, 2007	<b>10589</b>	<b>100</b>	Degenerado
		<b>10699c</b>	<b>96</b>	Degenerado
		<b>Probe DEN II/IV</b>	<b>100</b>	Não degenerado

		Flavi all S	96	Degenerado
		Flavi all S2	92	Degenerado
		Flavi all AS4	*	Degenerado
	Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 1	*	Degenerado
		Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 2	87	Não degenerado
		Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 3	77	Não degenerado
		DENV1-4 F	95	Não degenerado
	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	DENV1-4 R	96	Degenerado
		DENV1-4 P	100	Degenerado
		mFU1	90	Não degenerado
	Chao; Davis; Chang, 2007	CFD2	88	Não degenerado
		D3P	90	Não degenerado
		<b>10589</b>	<b>100</b>	<b>Degenerado</b>
DENV-3	<b>Dyer; Chisenhall; Mores, 2007</b>	<b>10699c</b>	<b>96</b>	<b>Degenerado</b>
		<b>Probe DEN I/III</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
		Flavi all S	96	Degenerado
		Flavi all S2	88	Degenerado
		Flavi all AS4	70	Degenerado
	Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 1	*	Degenerado
		Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 2	80	Não degenerado
		Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 3	73	Não degenerado
		DENV1-4 F	100	Não degenerado
	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	DENV1-4 R	87	Degenerado
		DENV1-4 P	100	Degenerado
DENV-4		mFU1	93	Não degenerado
	Chao; Davis; Chang, 2007	CFD2	92	Não degenerado
		D2P	100	Não degenerado
	<b>Dyer; Chisenhall; Mores, 2007</b>	<b>10589</b>	<b>100</b>	<b>Degenerado</b>

	<b>10699c</b>	<b>96</b>	<b>Degenerado</b>	
	<b>Probe DEN II/IV</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>	
	DEN4 F	100	Degenerado	
	Flavi all S	88	Degenerado	
	Flavi all S2	100	Degenerado	
	Flavi all AS4	*	Degenerado	
Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 1	*	Degenerado	
	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 2	87	Não degenerado	
	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 2	100	Não degenerado	
	<b>mFU1</b>	<b>90</b>	<b>Não degenerado</b>	
Chao; Davis; Chang, 2007	<b>CFD2</b>	<b>96</b>	<b>Não degenerado</b>	
	<b>JEVP</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>	
	Flavi all S	96	Degenerado	
JEV	Flavi all S2	92	Degenerado	
	Flavi all AS4	78	Degenerado	
Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 1	82	Degenerado	
	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 2	80	Não degenerado	
	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 3	77	Não degenerado	
	<b>mFU1</b>	<b>97</b>	<b>Não degenerado</b>	
Chao; Davis; Chang, 2007	<b>CFD2</b>	<b>88</b>	<b>Não degenerado</b>	
ROCV	Coimbra <i>et al.</i> , 2008	N1	100	Não degenerado
		N2	100	Não degenerado
	<b>Henriques, 2009</b>	<b>ROCV/NS5F</b>	*	Não degenerado
		<b>ROCV/NS5R</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
	<b>SLE2420</b>	<b>95</b>	<b>Não degenerado</b>	
SLEV	<b>Brault; Fang; Reisen, 2015</b>	<b>SLE2487c</b>	<b>95</b>	<b>Não degenerado</b>
		<b>SLE2444-probe</b>	<b>96</b>	<b>Não degenerado</b>
	Chao; Davis; Chang, 2007	mFU1	90	Não degenerado

		CFD2	85	Não degenerado
		SLEVP	97	Não degenerado
		834	95	Não degenerado
Dyer; Chisenhall; Mores, 2007		905C	90	Não degenerado
		<i>PROBE 857</i>	88	Não degenerado
		Flavi all S	85	Degenerado
		Flavi all S2	92	Degenerado
		Flavi all AS4	65	Degenerado
Patel <i>et al.</i> , 2013		Flavi all <i>probe 3 mix - 1</i>	*	Degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i>	83	Não degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	77	Não degenerado
		<b>WNENV-forward</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
<b>Brault; Fang; Reisen, 2015</b>		<b>WNENV-reverse</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
		<b>WNENV-probe</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
		mFU1	97	Não degenerado
Chao; Davis; Chang, 2007		CFD2	92	Não degenerado
		WNVP	100	Não degenerado
WNV		Flavi all S	96	Degenerado
		Flavi all S2	88	Degenerado
		Flavi all AS4	70	Degenerado
Patel <i>et al.</i> , 2013		Flavi all <i>probe 3 mix - 1</i>	*	Degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i>	70	Não degenerado
		Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	80	Não degenerado
		<b>mFU1</b>	<b>86</b>	<b>Não degenerado</b>
<b>Chao; Davis; Chang, 2007</b>		<b>CFD2</b>	<b>85</b>	<b>Não degenerado</b>
		<b>YFVP</b>	<b>85</b>	<b>Não degenerado</b>
YFV	Patel <i>et al.</i> , 2013	Flavi all S	100	Degenerado
		Flavi all S2	85	Degenerado

	Flavi all AS4	83	Degenerado
	Flavi all <i>probe 3 mix - 1</i>	82	Degenerado
	Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i>	93	Não degenerado
	Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	85	Não degenerado
<hr/>			
<b>Álvarez-Díaz <i>et al.</i>, 2021</b>			
<b>ZIKV-F</b> <b>100</b> <b>Degenerado</b>			
<b>ZIKV-R</b> <b>100</b> <b>Degenerado</b>			
<b>ZIKV-P</b> <b>100</b> <b>Degenerado</b>			
<hr/>			
Chao; Davis; Chang, 2007			
mFU1      86      Não degenerado			
CFD2      88      Não degenerado			
<hr/>			
ZIKV			
Flavi all S      96      Degenerado			
Flavi all S2      92      Degenerado			
Patel <i>et al.</i> , 2013			
Flavi all AS4      91      Degenerado			
Flavi all <i>probe 3 mix - 1</i> *      Degenerado			
Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i> 87      Não degenerado			
Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i> 81      Não degenerado			

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Notas: O símbolo (\*) indica que durante o alinhamento o oligonucleotídeo não se alinhou de forma satisfatória com a sequência consenso;

O mix de sonda Flavi all *probe 3 mix* foi subdividido em Flavi all *probe 3 mix-1*, Flavi all *probe 3 mix-2* e Flavi all *probe 3 mix-3* para a análise *in silico*;

Primers de Chao; Davis; Chang (2007) foram analisados para ZIKV e ROCV pelo próprio autor.

**Tabela VI** – Similaridade entre *primers* e sondas em relação à sequência consenso de *Alphavirus* obtidas utilizando o software *Unipro UGENE* e a presença de bases degeneradas

Vírus	Autor	Primer	Similaridade (%)	Degenerado/Não degenerado
CHIKV	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	CHIKV-F	100	Degenerado
		CHIKV-R	100	Não degenerado
		CHIKV-P	100	Degenerado
	De Lima Cavalcanti <i>et al.</i> , 2022	CHIKV 874	100	Não degenerado
		CHIKV 961	100	Não degenerado
		CHIKV 899	96	Não degenerado
	Giry <i>et al.</i> , 2017	F2A	100	Degenerado
		R2A	96	Degenerado
		R3A	91	Degenerado
		R4A	87	Degenerado
		P1	*	Degenerado
	Mansuy <i>et al.</i> , 2018	CHIK-NS5-F	100	Degenerado
		CHIK-NS5-R	95	Degenerado
		CHIK-NS5-probe	100	Degenerado
	Pabbaraju <i>et al.</i> , 2016	Chik_NSP_For	100	Degenerado
		Chik_NSP_Rev	100	Não degenerado
		Chik_NSP_VIC_MGB	100	Não degenerado
EEEV	Carrera <i>et al.</i> , 2023	ME forward	100	Degenerado
		ME reverse	94	Degenerado
		EEEV probe	100	Degenerado
	Giry <i>et al.</i> , 2017	F2A	100	Degenerado
		R2A	91	Degenerado
		R3A	87	Degenerado

	R4A	87	Degenerado
	P1	84	Degenerado
	<b>EEE9391</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
<b>Vina-Rodriguez et al., 2016</b>	<b>EEE9459c</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
	<b>EEE.9414probe</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
VEEV	VEEV forward 1	100	Degenerado
	VEEV forward 2	96	Degenerado
	VEEV reverse 1	100	Degenerado
	VEEV reverse 2	90	Degenerado
	VEEV probe	100	Degenerado
Giry et al., 2017	F2A	100	Degenerado
	R2A	91	Degenerado
	R3A	87	Degenerado
	R4A	87	Degenerado
	P1	89	Degenerado
<b>Vina-Rodriguez et al., 2016</b>	<b>AlphaVIR966F</b>	<b>93</b>	<b>Degenerado</b>
	<b>AlphaVIR966R</b>	<b>96</b>	<b>Degenerado</b>
	<b>INEID-VEEV probe</b>	<b>100</b>	<b>Degenerado</b>
WEEV	WEEV-1F	100	Não degenerado
	WEEV-1 R	100	Não degenerado
	WEEV-1 P	100	Não degenerado
	F2A	100	Degenerado
	R2A	91	Degenerado
Giry et al., 2017	R3A	87	Degenerado
	R4A	87	Degenerado
	P1	79	Degenerado
	<b>Vina-Rodriguez et al., 2016</b>	<b>WEE10,248</b>	<b>100</b>
			<b>Não degenerado</b>

	<b>WEE 10,314c</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
	<b>WEE 10,271probe</b>	<b>100</b>	<b>Não degenerado</b>
MAYV	F2A	100	Degenerado
	R2A	83	Degenerado
	Giry <i>et al.</i> , 2017	R3A	Degenerado
		R4A	Degenerado
		P1	*
		<b>MAYV_FNF</b>	<b>100</b>
<b>Naveca <i>et al.</i>, 2017</b>		<b>MAYV_FNR</b>	<b>95</b>
		<b>MAYV_FNP</b>	<b>100</b>
			<b>Não degenerado</b>

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (\*) indica que durante o alinhamento o oligonucleotídeo não se alinhou de forma satisfatória com a sequência consenso;

**Tabela VII** – Similaridade entre *primers* e sondas em relação à sequência consenso de *Orthobunyavirus oropoucheense* obtidas utilizando o software *Unipro UGENE* e a presença de bases degeneradas

Vírus	Autor	Primer	Similaridade (%)	Degenerado/Não degenerado
Camarão <i>et al.</i> , 2019		Simbu_F	96	Degenerado
		Simbu_R	84	Degenerado
		Simbu_ClaeAP	88	Degenerado
		Simbu_ClaeBP	69	Degenerado
Naveca <i>et al.</i> , 2017		OROV_FNF	100	Não degenerado
		OROV_FNR	100	Não degenerado
		OROV_FNP	100	Não degenerado
OROV	Rojas <i>et al.</i> , 2020	OROV Forward-S	100	Degenerado
		OROV Forward-K	100	Degenerado
		OROV Reverse	100	Degenerado
		OROV Probe-Yc	100	Degenerado
		OROV Probe-Rc	100	Degenerado
	Wise <i>et al.</i> , 2020	OROV F	100	Não degenerado
		Ec2 R	95	Degenerado
		OROV P	100	Não degenerado

Fonte: elaborada pelo próprio autor

### 4.3.2 Propriedades dos *primers* e sondas

Com o intuito de alcançar uma melhor eficiência das reações de amplificação prevendo possíveis interferências, foram analisadas as propriedades como tamanho das sequências de *primers* e sondas, Tm, %GC, formação de dímeros de *primers* e de estruturas secundárias. De acordo com a literatura, o tamanho ideal para *primers* é de 15 a 24 nucleotídeos para assegurar especificidade aos seus alvos (Thornton; Basu, 2011). A Tm é a temperatura na qual metade das moléculas de DNA estão hibridizadas, formando fitas duplas, e a outra metade está formando fita simples (Ximenes; Braga, 2025). Também, de acordo com a literatura, a Tm deve estar preferencialmente entre 52 e 58º C ou entre 60 e 65ºC, para garantir a especificidade e a eficiência de amplificação da reação (Lorenz, 2012; Ximenes; Braga, 2025). Em casos de Tm baixas, os oligonucleotídeos podem se ligar de maneira inespecífica, gerando amplificações não específicas. Já em Tm altas, a ligação entre os *primers*, sondas e a fita molde pode ser insuficiente, resultando em uma menor eficiência de amplificação, portanto formando pouco produto ao final da reação (Burpo, 2001). Além disso, a reação de amplificação acontece apenas em uma temperatura de anelamento, logo, a diferença de Tm entre os *primers* e sondas, preferencialmente, não pode ser acima de 5 ºC, pois grandes variações afetam diretamente na especificidade da reação, gerando amplificações inespecíficas (Lorenz, 2012; Ximenes; Braga, 2025). A porcentagem de GC deve variar entre 40 e 60%, para que haja uma ligação específica e estável entre o *primer* ou a sonda e o seu alvo (Burpo, 2001).

Os dímeros de *primers* e as estruturas secundárias também podem interferir na reação, afetando a especificidade, sensibilidade e qualidade do produto amplificado (Garafutdinov; Galimova; Sakhabutdinova, 2020). O *self dimer* ocorre quando duas moléculas iguais se hibridizam, formando uma estrutura estável, como quando um *primer* se liga a outro igual (*forward* com *forward*, *reverse* com *reverse* ou sonda com sonda) (Ximenes; Braga, 2025). Já o *cross dimer* ocorre quando um *primer* se liga a outro *primer* diferente (*forward* com *reverse*, *forward* com sonda ou *reverse* com sonda) (Thornton; Basu, 2011). Além disso, na reação pode haver formação de *hairpins*, ou seja, quando um oligonucleotídeo se dobra e encontra complementariedade com ele mesmo, formando uma estrutura de grampo (Thornton; Basu, 2011; Ximenes; Braga, 2025). Para avaliar essas estruturas, é necessário a obtenção do ΔG, parâmetro que determina a espontaneidade das interações entre os oligonucleotídeos (Ximenes; Braga, 2025). Alterações de energia livre mais negativas, menores que -6 kcal/mol, indicam interações termodinamicamente favoráveis, logo, favorecem a formação de dímeros e estruturas

secundárias mais estáveis, as quais podem comprometer a reação de amplificação (Chukwuemeka *et al.*, 2020; Ximenes; Braga, 2025).

Os *primers* e sondas que apresentaram valores fora das faixas ideais de tamanho, Tm, %GC e ΔG para *self dimers* e *hairpins* foram destacados em negrito nas **Tabelas VIII** (*Orthoflavivirus*), **IX** (*Alphavirus*) e **X** (*Orthobunyavirus oropoucheense*). A **Tabela XI** apresenta a análise de *cross-dimers* entre todos os *primers* e sondas dos gêneros *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e *Orthobunyavirus oropoucheense*. No entanto, foram apresentadas apenas as estruturas secundárias que apresentaram valores de ΔG inferiores a -6 kcal/mol, pois favorecem a formação de estruturas secundárias mais estáveis. A discussão foi direcionada apenas aos oligonucleotídeos selecionados com base nos resultados de alinhamento e similaridade.

Os *primers* de Dyer, Chisenhall e Mores (2007) para DENV (1-4) apresentaram bons resultados em relação as propriedades analisadas *in silico*. O *primer forward* 10589 apresenta comprimento de 25 pares de bases, com um nucleotídeo a mais do que o considerado ideal (entre 15 e 24 pb), assim como as sondas *Probe DEN I/III* e *Probe DEN II/IV* que possuem três nucleotídeos a mais do que a faixa ideal. Já o *primer reverse* 10699c e as sondas apresentam valores de Tm superiores a faixa ideal determinada (entre 52 e 58°C ou 60 e 65°C), com valores de 68,2, 69,3 e 68,5, respectivamente. No entanto, eles não apresentam diferença acima de 5°C entre eles, logo, essa Tm pode não afetar diretamente na especificidade da reação. Com relação a formação de dímeros, o *primer reverse* e a sondas apresentam valores de ΔG para *self-dimer* abaixo de -6 kcal/mol, indicando interações termodinamicamente favoráveis que favorecem a formação de dímeros e podem comprometer a reação. Em relação aos *cross-dimers* entre os *primers* e sondas da PCR *multiplex* para DENV I/III e DENV II/IV, não foi identificada a formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos.

O *primer forward* mFU1 e o *primer reverse* CFD2 descritos por Chao; Davis; Chang, (2007), escolhidos como os melhores para JEV, ROCV e YFV, apresentaram valores acima do ideal em relação ao comprimento dos *primers*, com 29 e 26 pares de bases, respectivamente. Ademais, foram observados valores de Tm acima do ideal, sendo 66,9°C para o *forward* e 74,7°C para o *reverse*. A diferença de Tm entre os *primers* ultrapassa a diferença recomendada de 5°C, o que pode favorecer a formação de amplificações inespecíficas. Além disso, os *primers* apresentam valores fora do ideal para a %GC (entre 40 e 60%), com 37,9% para o *primer forward* e 69,2% para o *primer reverse*. O *primer reverse* apresentou ΔG de -16,03 kcal/mol, o que também pode interferir na reação devido a formação de dímeros. Em relação a PCR *multiplex* para detecção de JEV e ROCV, a sonda JEVP apresenta boas propriedades, exceto para a Tm que corresponde a 66,5 °C. No entanto, apesar da Tm estar fora dos padrões ideais,

existe pouca diferença entre a Tm da sonda e do *primer forward* (menor que 5°C), o que pode não afetar a reação. Já entre a sonda e o *primer reverse* a diferença é superior a 5°C, logo, a variação na Tm pode afetar diretamente na especificidade da reação. Além disso, o *primer reverse* ROCV/NS5R, escolhido como sonda da reação para o ROCV, apresenta boas propriedades, dentro das faixas ideais. Quanto a PCR *singleplex* para YFV, a sonda YFVP apresenta valor acima do ideal em relação ao comprimento dos *primers*, com 26 pares de bases, além de apresentar Tm acima do ideal, porém, dentro da diferença abaixo de 5°C entre os *primers forward* e *reverse*. Em relação aos *cross-dimers* entre os *primers* e sondas da PCR *multiplex* para JEV e ROCIO e a PCR *singleplex* para YFV, não foi identificada a formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos.

Os *primers forward* e *reverse* de Brault; Fang; Reisen, (2015), escolhidos para desenvolvimento de uma PCR *multiplex* para SLEV e WNV, mostraram excelentes resultados com relação às suas propriedades. Em relação aos oligonucleotídeos de SLEV, o *primer forward* SLE2420 apresenta todas as propriedades dentro das faixas ideais. O *primer reverse* SLE2487c também apresenta bons resultados, exceto em relação ao ΔG para formação de *self-dimer*, com ΔG igual a -9,27 kcal/mol, valor este que indica a possível formação de dímeros na reação. A sonda SLE2444-*probe* apresenta resultados acima do ideal para a Tm, com 74,2°C, e com diferença acima de 5°C para os outros *primers* e sondas, o que pode afetar diretamente a especificidade da reação. Além disso, possui %GC maior do que a faixa considerada ideal.

Em relação aos oligonucleotídeos específicos para WNV, também descritos por Brault, Fang e Reisen (2015), o *primer forward* WNENV-*forward* apresenta resultados ótimos para todas as propriedades, dentro das faixas consideradas como ideais. O *primer reverse* WNENV-*reverse* apresenta bons resultados, exceto em relação ao valor de ΔG para formação de *self-dimer*, com ΔG igual a -6,3 kcal/mol. Apesar desse valor estar próximo ao ideal pode favorecer a formação de dímeros na reação. A sonda WNENV-*probe* apresenta Tm de 69,8°C, com diferença acima de 5°C para os primers SLE2487c, WNENV-*forward* e WNENV-*reverse*, o que pode levar a formação de amplificações inespecíficas. Ademais, possui ΔG igual a -11,52 kcal/mol, indicando interações termodinamicamente estáveis que podem gerar dímeros. Em relação aos *cross-dimers* entre os *primers* e sondas da PCR *multiplex* para SLEV e WNV, foi identificada a formação de duas estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos, estruturas essas que podem interferir na reação. Uma das estruturas foi formada entre a sonda SLE2444-*probe* e o primer WNENV-*reverse*, com ΔG igual a -10,05 kcal/mol e a outra foi formada entre a sonda WNENV-*probe* e o primer SLE2420, com ΔG igual a -9,60 kcal/mol.

Os *primers* de Álvarez-Díaz *et al.* (2021), escolhidos para uma PCR *multiplex* para ZIKV e CHIKV, apresentam ótimos resultados para ZIKV com relação as propriedades dos seus *primers*. O *primer forward* ZIKV-F apresenta todas as propriedades dentro da faixa ideal. O *primer reverse* ZIKV-R e a sonda ZIKV-P possui Tm acima do ideal, no entanto, não possui diferença acima de 5°C para os outros *primers*, o que pode não afetar diretamente na especificidade da reação. Além disso, o *primer reverse* possui ΔG igual a -9,32 kcal/mol, o que favorece a formação de dímeros. Para CHIKV, o *primer forward* CHIKV-F apresenta valor acima do ideal para ΔG, com -9,75 kcal/mol, assim como o *primer reverse* CHIKV-R, favorecendo formação de dímeros. O *primer reverse* e a sonda CHIKV-P apresentam valores acima do ideal para Tm, de 66,4°C para ambos, mas abaixo da diferença de 5°C para todos os *primers*, podendo não afetar diretamente na reação. Ademais, o *primer reverse* possui %GC acima do ideal e a sonda apresenta valor de ΔG igual a -17,39 kcal/mol, favorecendo a formação de dímeros estáveis, que podem atrapalhar a amplificação do produto. Em relação aos *cross-dimers* entre os *primers* e sondas da PCR *multiplex* para ZIKV e CHIKV, foi identificada a formação de duas estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos. Uma delas do *primer* ZIKV-R com CHIKV-R, com ΔG igual a -9,92 kcal/mol, e a outra com *primer* ZIKV-R com a sonda CHIKV-P, com ΔG igual a -10,82 kcal/mol. Essas estruturas podem gerar amplificações inespecíficas e afetar parâmetros como especificidade e sensibilidade da reação (Garafutdinov; Galimova; Sakhabutdinova, 2020).

Para WEEV, EEEV e VEEV os melhores *primers* baseados no alinhamento foram de Vina-Rodriguez *et al.* (2016), sendo possível desenvolvimento de uma PCR *multiplex* para detecção de WEEV e EEEV, e uma PCR *singleplex* para detecção de VEEV. Com relação ao EEEV, o *primer forward* EEE9391 apresenta todas as propriedades dentro dos parâmetros ideais, exceto para %GC, com 47,6%. Ademais, o *primer* AlphaVIR966F também apresenta %GC fora do ideal, com 48,2%. Os *primers* e as sondas de Vina-Rodriguez, exceto o *primer forward* EEE9391 e o *primer reverse* EEE9459c, apresentam valores acima do ideal de ΔG para formação de *self-dimer*, indicando interações termodinamicamente favoráveis que favorecem a formação de dímeros. Além disso, os *primers* AlphaVIR966F e AlphaVIR966R e a sonda INEID-VEEV *probe* apresentam comprimento maior do que o ideal, com 28, 24 e 26 pB, respectivamente. Os oligonucleotídeos EEE.9414*probe*, WEE 10,271*probe*, AlphaVIR966F, AlphaVIR966R e INEID-VEEV *probe* apresentam valores acima do ideal com relação a Tm. Em relação a PCR *multiplex*, há uma diferença maior do que 5°C entre os *primers* e a sondas, podendo gerar amplificações inespecíficas na reação. Para PCR *singleplex*, apesar dos oligonucleotídeos apresentarem Tm elevadas, não há diferença acima de 5°C entre eles, o que

pode não afetar de forma direta na especificidade da reação. Em relação aos *cross-dimers* entre os *primers* e sondas da PCR *multiplex* para WEEV e EEEV e a PCR *singleplex* para VEEV, não foi identificada a formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos.

Os *primers* de Naveca *et al.*, (2017), escolhidos para uma PCR *multiplex* para detecção de MAYV e OROV, apresentam bons resultados para MAYV, com o *primer forward* MAYV\_FNF apresentando todas as propriedades dentro da faixa ideal. O *primer reverse* MAYV\_FNR apresenta bons resultados, exceto para o valor de Tm igual a 66,6°C, exibindo diferença acima de 5°C entre ele e a sonda MAYV\_FNP. A sonda apresenta valor de ΔG igual a -7,05 kcal/mol sendo que, apesar de estar próximo ao valor ideal, pode favorecer a formação de dímeros. Em relação aos *primers* de OROV, eles apresentam tamanho (pB), %GC e valores de Tm dentro do ideal, no entanto, a diferença das Tm entre os *primers* MAYV\_FNR e MAYV\_FNP, MAYV\_FNP e OROV\_FNR, OROV\_FNP e MAYVFNF, OROV\_FNP e MAYV\_FNR é acima de 5°C, o que afeta a especificidade da reação, gerando amplificações inespecíficas. Além disso, o *primer forward* OROV\_FNF e a sonda OROV\_FNP apresentam valores acima de ΔG, com -12,90 e -6,34 kcal/mol, respectivamente, favorecendo a formação de dímeros na reação, as quais podem comprometer a reação de amplificação. Na reação foram formadas quatro estruturas secundárias, incluindo: OROV\_FNR e MAYV\_FNR ( $\Delta G = -9,76$  kcal/mol), OROV\_FNF e MAYV\_FNP ( $\Delta G = -6,57$  kcal/mol), OROV\_FNR e MAYV\_FNR ( $\Delta G = -11,15$  kcal/mol) e OROV\_FNR e MAYV\_FNP ( $\Delta G = -6,57$  kcal/mol). A presença de estruturas secundárias na reação requer atenção, já que essas estruturas podem influenciar a amplificação do produto, afetando especificidade, sensibilidade, qualidade, entre outros (Garafutdinov; Galimova; Sakhabutdinova, 2020).

**Tabela VIII** - Propriedades dos *primers* e sondas para detecção de *Orthoflavivirus* determinadas a partir do software *OlygoAnalyser*

Autor	Nome	Número de bases (pB)	Tm (°C)	GC (%)	<i>Self-Dimer ΔG</i> (kcal.mole-1)	<i>Hairpin ΔG</i> (kcal.mole-1)
Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	<b>DENV1-4 F</b>	22	<b>69,0</b>	59,1	-3,65	-0,65
	<b>DENV1-4 R</b>	24	<b>68,0</b>	53,5	<b>-9,91</b>	-0,32
	ZIKV-F	23	65,4	52,2	-4,64	-0,98
	<b>ZIKV-R</b>	23	<b>69,0</b>	56,5	<b>-9,32</b>	0,05
	DENV1-4 P	21	63,3	50,0	-3,91	0,11
Brault; Fang; Reisen, 2015	<b>ZIKV-P</b>	24	<b>67,0</b>	47,9	-4,95	0,29
	<b>WEEV-1 F</b>	22	63,8	50,0	<b>-9,75</b>	0,42
	WEEV-1 R	19	62,4	52,6	-3,61	0,65
	<b>WEEV-1 P</b>	<b>31</b>	<b>71,0</b>	51,6	<b>-7,05</b>	-1,78
	SLE2420	20	65,3	60,0	-3,61	-0,06
Chao; Davis; Chang, 2007	<b>SLE2487c</b>	20	62,2	50,0	<b>-9,27</b>	0,37
	<b>SLE2444-probe</b>	23	<b>74,2</b>	<b>69,6</b>	<b>-7,05</b>	-2,27
	WNENV-forward	21	63,7	52,4	-4,62	0,84
	<b>WNENV-reverse</b>	21	63,9	52,4	<b>-6,30</b>	0,23
	<b>WNENV-probe</b>	22	<b>69,8</b>	63,6	<b>-11,52</b>	-3,10
	<b>mFU1</b>	<b>29</b>	<b>66,9</b>	<b>37,9</b>	-5,38	-0,09
	<b>CFD2</b>	<b>26</b>	<b>74,7</b>	<b>69,2</b>	<b>-16,03</b>	-0,14
	<b>JEVP</b>	24	<b>66,5</b>	50,0	-4,64	1,15
	<b>WNVP</b>	23	<b>74,2</b>	<b>65,2</b>	<b>-9,75</b>	-3,41
	<b>YFVP</b>	<b>26</b>	<b>70,8</b>	53,8	<b>-7,05</b>	-2,01
	<b>SLEVVP</b>	<b>29</b>	<b>70,5</b>	48,3	<b>-7,05</b>	-2,55

	<b>D1P</b>	<b>28</b>	<b>67,0</b>	46,4	-3,91	-0,43
	<b>D2P</b>	<b>30</b>	<b>73,9</b>	60,0	<b>-6,30</b>	0,46
	<b>D3P</b>	<b>30</b>	<b>67,8</b>	46,7	<b>-9,75</b>	-2,03
	<b>D4P</b>	<b>30</b>	<b>69,0</b>	50,0	-3,07	0,20
Coimbra <i>et al.</i> , 2008	<b>N1</b>	23	61,0	43,5	<b>-8,51</b>	-0,19
	<b>N2</b>	22	61,1	40,9	-3,52	-0,97
	<b>10589</b>	<b>25</b>	64,7	50,0	-4,41	-0,99
	<b>10699c</b>	23	<b>68,2</b>	58,7	<b>-8,99</b>	-2,19
Dyer; Chisenhall; Mores, 2007	<b>Probe DEN I/III</b>	<b>27</b>	<b>69,3</b>	51,9	<b>-6,69</b>	-3,60
	<b>Probe Den II/IV</b>	<b>27</b>	<b>68,5</b>	48,1	<b>-6,69</b>	-3,60
	<b>834</b>	19	63,2	52,6	<b>-13,80</b>	-0,78
	<b>905c</b>	21	65,0	57,1	<b>-6,69</b>	-2,58
	<b>Probe 857</b>	24	<b>70,1</b>	58,3	<b>-9,89</b>	-1,52
	ROCV/NS5F	20	63,4	55,0	-4,64	-1,10
Henriques, 2009	ROCV/NS5R	20	61,3	50,0	-5,50	-3,28
	<b>DEN4 F</b>	<b>26</b>	65,6	40,4	<b>-6,30</b>	-0,91
	<b>Flavi all AS4</b>	23	<b>70,1</b>	<b>65,2</b>	<b>-23,13</b>	1,58
		20	<b>68,5</b>	55,0	<b>-7,81</b>	2,40
	<b>Patel <i>et al.</i>, 2013</b>	<b>Flavi all probe 3 mix</b>	<b>30</b>	<b>71,9</b>	56,7	<b>-13,96</b>
			<b>26</b>	<b>67,3</b>	42,3	<b>-6,14</b>
		<b>Flavi all S</b>	<b>26</b>	64,3	38,5	-5,38
	<b>Flavi all S2</b>	<b>26</b>	<b>66,4</b>	40,4	<b>-8,63</b>	-0,09

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O mix de sonda Flavi all *probe* 3 mix foi subdividido em Flavi all *probe* 3 mix-1, Flavi all *probe* 3 mix-2 e Flavi all *probe* 3 mix-3 para a análise *in silico*.

**Tabela IX** - Propriedades dos *primers* e sondas para detecção de *Alphavirus* determinadas a partir do software *OlygoAnalyser*

Autor	Nome	Número de bases (pB)	Tm (°C)	GC (%)	Self-Dimer ΔG (kcal.mole-1)	Hairpin ΔG (kcal.mole-1)
Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021	<b>CHIKV-F</b>	21	65,1	52,4	<b>-9,75</b>	-0,13
	<b>CHIKV-R</b>	20	<b>66,4</b>	<b>65,0</b>	<b>-9,75</b>	-1,08
	<b>CHIKV-P</b>	23	<b>66,4</b>	54,3	<b>-17,39</b>	-2,37
Brault; Fang; Reisen, 2015	<b>WEEV-1F</b>	22	63,8	50,0	<b>-9,75</b>	0,42
	WEEV-1 R	19	62,4	52,6	-3,61	0,65
	<b>WEEV-1 P</b>	<b>31</b>	<b>71,0</b>	51,6	<b>-7,05</b>	-1,78
Carrera <i>et al.</i> , 2023	<b>VEEV forward 1</b>	24	63,6	43,8	<b>-7,49</b>	-1,27
	<b>VEEV forward 2</b>	24	65,0	47,9	<b>-7,49</b>	-1,27
	VEEV reverse 1	20	64,0	57,5	-5,38	-1,13
	VEEV reverse 2	20	61,2	52,5	-5,38	-1,13
	<b>VEEV probe</b>	23	64,7	49,3	<b>-6,95</b>	-0,56
	ME forward	21	63,2	54,8	-3,61	-0,56
	ME reverse	18	62,5	52,8	-3,61	-0,78
	EEEV probe	23	65,8	54,3	-3,30	0,26
De Lima Cavalcanti <i>et al.</i> , 2022	<b>CHIKV 874</b>	21	63,4	47,6	<b>-6,34</b>	-0,54
	<b>CHIKV 961</b>	20	62,7	55,0	<b>-6,21</b>	-0,86
	<b>CHIKV 899</b>	<b>25</b>	<b>67,1</b>	52,0	-4,89	-2,50
Giry <i>et al.</i> , 2017	<b>F2A</b>	23	63,8	32,6	<b>-9,54</b>	1,07
	R2A	23	62,0	32,6	-5,38	1,23
	R3A	23	62,1	32,6	-5,30	3,30

	R4A	23	63,8	37,0	-5,38	0,46
	P1	14	63,7	53,6	-3,61	1,51
	<b>CHIK-NS5-F</b>	22	65,8	52,3	<b>-10,36</b>	-0,05
Mansuy <i>et al.</i> , 2018	<b>CHIK-NS5-R</b>	21	63,3	50,0	<b>-8,19</b>	-0,28
	<b>CHIK-NS5-probe</b>	<b>26</b>	<b>69,8</b>	53,8	<b>-7,94</b>	-0,76
	MAYV_FNF	19	61,8	50,0	-3,61	0,29
Naveca <i>et al.</i> , 2017	<b>MAYV_FNR</b>	21	<b>66,6</b>	59,5	-5,02	-0,32
	<b>MAYV_FNP</b>	18	58,8	50,0	<b>-7,05</b>	0,34
	<b>Chik_NSP_For</b>	19	<b>66,7</b>	<b>63,2</b>	<b>-26,57</b>	-2,56
Pabbaraju <i>et al.</i> , 2016	<b>Chik_NSP_Rev</b>	20	63,0	50,0	<b>-6,69</b>	-1,94
	<b>Chik_NSP_VIC_MGB</b>	17	56,1	47,1	<b>-6,30</b>	-1,59
	<b>EEE9391</b>	21	64,4	<b>47,6</b>	-3,61	0,24
	EEE9459c	21	64,1	57,1	-5,99	-0,73
	<b>EEE.9414probe</b>	21	<b>71,5</b>	<b>66,7</b>	<b>-9,75</b>	-3,75
	<b>WEE10,248</b>	20	64,3	55,0	<b>-9,28</b>	-1,39
Vina-Rodriguez <i>et al.</i> , 2016	<b>WEE 10,314c</b>	20	63,0	55,0	<b>-6,30</b>	-0,25
	<b>WEE 10,271probe</b>	23	<b>70,6</b>	60,9	<b>-10,36</b>	-2,42
	<b>AlphaVIR966F</b>	<b>28</b>	<b>70,7</b>	<b>48,2</b>	<b>-6,75</b>	-5,27
	<b>AlphaVIR966R</b>	<b>24</b>	<b>68,8</b>	51,4	<b>-9,89</b>	-0,37
	<b>INEID-VEEV probe</b>	<b>26</b>	<b>69,3</b>	55,8	<b>-6,76</b>	-0,40

Fonte: elaborada pelo próprio autor

**Tabela X** - Propriedades dos *primers* e sondas para detecção de *Orthobunyavirus oropoucheense* determinadas a partir do software *OlygoAnalyser*

Autor	Nome	Número de bases (pB)	Tm (°C)	GC (%)	Self-Dimer ΔG (kcal.mole-1)	Hairpin ΔG (kcal.mole-1)
Camarão <i>et al.</i> , 2019	<b>Simbu_F</b>	<b>26</b>	63,7	40,4	<b>-8,29</b>	-2,98
	<b>Simbu_R</b>	<b>25</b>	62,0	<b>34,0</b>	<b>-9,27</b>	-3,20
	<b>Simbu_CladeAP</b>	17	59,9	58,8	<b>-11,09</b>	-1,47
	<b>Simbu_CladeBP</b>	16	59,8	53,1	<b>-6,72</b>	1,80
Naveca <i>et al.</i> , 2017	<b>OROV_FNF</b>	19	63,8	57,9	<b>-12,90</b>	-1,33
	OROV_FNR	22	65,3	45,5	-3,90	-1,83
	<b>OROV_FNP</b>	19	55,4	42,1	<b>-6,34</b>	1,87
Rojas <i>et al.</i> , 2020	OROV Forward-S	22	65,0	50,0	-3,30	0,35
	<b>OROV Forward-K</b>	22	64,6	47,7	<b>-7,40</b>	-1,59
	<b>OROV Reverse</b>	19	64,3	57,9	<b>-9,75</b>	-1,61
	<b>OROV Probe-Yc</b>	<b>25</b>	<b>68,9</b>	50,0	-4,41	-3,62
	<b>OROV Probe-Rc</b>	<b>25</b>	<b>66,9</b>	46,0	-4,41	-1,06
Wise <i>et al.</i> , 2020	<b>OROV F</b>	23	60,8	<b>39,1</b>	<b>-6,34</b>	0,67
	<b>Ec2 R</b>	20	58,2	42,5	<b>-9,28</b>	0,83
	<b>OROV P</b>	<b>30</b>	<b>68,0</b>	43,3	-3,90	-0,86

Fonte: elaborada pelo próprio autor

**Tabela XI** – Cross dimers formados entre todos os *primers* e sondas com seus respectivos valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ )

Sequência primária	Sequência secundária	$\Delta G$ (kcal.mole-1)
DENV-1 F	YFVP	-6,69
	MAYVFNR	-9,87
	WEE10,248	-11,01
	Simbu_F	-6,11
	OROV P	-6,69
DENV1-4 R	CHIKV 874	-10,71
	CHIKV 961	-6,21
DENV1-4 P	CHIKV 874	-6,69
	SLE2487c	-11,97
	N2	-7,82
ZIKV-F	10589	-12,59
	Chik_NSP_VIC_MGB	-8,58
	INEID-VEEV probe	-8,92
	CHIKV-R	-9,92
ZIKV-R	CHIKV-P	-10,82
	SLE2487c	-9,19
	WNENV-forward	-6,37
	WEEV-1 P	-7,93
	EEEV probe	-7,93
ZIKV-P	WNENV-probe	-9,6
	N1	-6,59
	905C	-6,21
	Flavi all probe 3 mix - 3	-7,81
	WEEV-1F	-6,68
SLE2420	F2A	-16,09
	EEE9459c	-9,54
SLE2444-probe	WNENV-reverse	-10,05
	Flavi all probe 3 mix - 2	-9,76
	VEEV probe	-8,16
	ME forward	-10,05
	MAYVFNP	-7,05
	EEE9459c	-13,15
	D4P	-9,77
	N1	-6,35
WNENV-forward	OROV Probe-Yc	-15,28
	OROV Probe-Rc	-15,28

	CHIKV-F	-6,44
WNENV- <i>reverse</i>	R4A	-11,01
	AlphaVIR966R	-7,33
	WEE 10,314c	-8,24
	Flavi all S	-6,50
	VEEV <i>reverse</i> 1	-11,37
WNENV- <i>probe</i>	VEEV <i>reverse</i> 2	-11,37
	CHIKV 874	-11,23
	R2A	-8,45
	AlphaVIR966F	-8,45
mFU1	ROCV/NS5F	-10,13
	AlphaVIR966F	-8,33
	Chik_NSP_VIC_MGB	-6,58
CFD2	OROV <i>Forward-S</i>	-9,76
	OROV P	-9,76
	D3P	-6,94
	N1	-9,31
	834	-9,69
SLEVP	ROCV/NS5R	-10,96
	Flavi all <i>probe</i> 3 mix - 3	-12,76
	CHIK-NS5-R	-11,27
	OROV P	-7,06
WNVP	ME <i>reverse</i>	-6,44
	CHIKV 874	-8,41
	905C	-11,50
	ROCV/NS5R	-6,01
	VEEV <i>probe</i>	-9,76
YFVP	ME <i>forward</i>	-9,76
	R2A	-10,03
	Chik_NSP_For	-16,81
	INEID-VEEV <i>probe</i>	-12,48
JEVP	ROCV/NS5F	-11,73
	MAYVFNF	-11,55
	WEEV-1F	-6,59
D1P	OROV_FNF	-7,21
	OROV_FNP	-7,42
	OROV <i>Reverse</i>	-8,20
	834	-6,69
D2P	ROCV/NS5F	-9,68
	CHIK-NS5-R	-9,79

	MAYVFNF	-8,19
	WEE 10,314c	-6,30
	Simbu_F	-9,79
	OROV P	-9,79
D3P	<i>Probe Den II/IV</i>	-8,53
	Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	-8,54
	WEEV-1F	-9,75
	WEE10,248	-6,68
D4P	905C	-12,72
	R2A	-8,07
	CHIK-NS5-R	-7,58
	INEID-VEEV <i>probe</i>	-11,14
	Simbu_F	-8,66
	OROV P	-8,66
N2	WEEV-1 P	-9,98
	<i>PROBE 857</i>	-11,84
	EEE9391	-8,70
834	WEEV-1 R	-8,07
	VEEV <i>probe</i>	-8,64
	ME <i>forward</i>	-9,98
<i>PROBE 857</i>	WEE 10,271 <i>probe</i>	-11,84
	Simbu_F	-7,51
	OROV P	-6,24
10589	EEEV <i>probe</i>	-8,42
	CHIKV 874	-6,69
	MAYVFNP	-6,57
<i>Probe DEN I/III</i>	ROCV/NS5F	-10,13
	CHIKV 874	-6,69
	CHIK-NS5-R	-9,53
	MAYVFNP	-6,57
10699c	WEEV-1 R	-6,68
	CHIKV 874	-11,63
	VEEV <i>reverse 1</i>	-6,90
DEN4 F	VEEV <i>reverse 2</i>	-6,90
	WEE 10,314c	-6,50
	WEEV-1 P	-6,37
Flavi all <i>probe 3 mix - 2</i>	MAYVFNR	-9,50
	Chik_NSP_For	-13,06
	ME <i>forward</i>	-6,62
Flavi all <i>probe 3 mix - 3</i>	CHIKV 874	-10,88

	MAYVFNF	-7,07
	Chik_NSP_Rev	-12,47
Flavi all S2	VEEV <i>reverse</i> 1	-9,14
	VEEV <i>reverse</i> 2	-9,14
CHIKV-F	F2A	-16,42
	CHIK-NS5- <i>probe</i>	-11,97
CHIKV-R	CHIKV 899	-7,71
	P1	-12,51
	OROV <i>Probe-Yc</i>	-8,31
CHIKV-P	WEEV-1 P	-7,48
	R4A	-11,01
	EEE.9414 <i>probe</i>	-7,48
WEEV-1F	Simbu_CladeAP	-6,78
	OROV_FNP	-9,02
WEEV-1 R	CHIKV 874	-6,68
	R2A	-10,02
	R3A	-10,02
	R4A	-10,02
	AlphaVIR966R	-8,54
WEEV-1 P	EEE9391	-6,44
	OROV <i>Probe-Rc</i>	-7,96
VEEV <i>forward</i> 1	Simbu_F	-7,82
VEEV <i>forward</i> 2	Simbu_F	-7,82
VEEV <i>reverse</i> 1	AlphaVIR966F	-36,36
	EEE.9414 <i>probe</i>	-9,41
VEEV <i>reverse</i> 2	AlphaVIR966F	-33,9
	EEE.9414 <i>probe</i>	-9,41
VEEV <i>probe</i>	EEE.9414 <i>probe</i>	-7,58
	Simbu_F	-10,14
EEEV <i>probe</i>	Simbu_F	-8,20
CHIKV 874	EEE9391	-7,74
	OROV F	-11,81
CHIKV 961	Chik_NSP_VIC_MGB	-8,18
	Simbu_R	-5,02
CHIKV 899	Chik_NSP_For	-6,91
	OROV Reverse	-6,85
R2A	MAYVFNP	-6,72
R4A	MAYVFNP	-6,72
CHIK-NS5-R	EEE.9414 <i>probe</i>	-8,77

	Chik_NSP_Rev	-11,71
MAYV_FNR	Simbu_F	-7,63
	OROV_FNF	-9,76
	OROV_FNR	-11,15
	WEE10,248	-9,76
MAYV_FNP	OROV_FNF	-6,57
	OROV_FNR	-6,57
EEE9391	Simbu_R	-7,31
EEE9459c	Simbu_CladeAP	-6,53
WEE10,248	OROV F	-7,39
WEE 10,314c	OROV_FNP	-8,96
	OROV F	-8,96
WEE 10,271 <i>probe</i>	OROV Forward-S	-6,44
Simbu_F	OROV P	-8,29
Simbu_CladeAP	Simbu_CladeBP	-33,02
	OROV Forward-S	-34,88
OROV_FNR	OROV Forward-K	-34,88
	OROV P	-26,97

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O mix de sonda Flavi all *probe* 3 mix foi subdividido em Flavi all *probe* 3 mix-1, Flavi all *probe* 3 mix-2 e Flavi all *probe* 3 mix-3 para a análise *in silico*.

A **Tabela XII** apresenta as RT-qPCR propostas neste estudo, os formatos *singleplex* e *multiplex*, os respectivos vírus e as referências dos oligonucleotídeos utilizados, definidos com base nas análises *in silico* realizadas.

**Tabela XII -** RT-qPCR propostas neste estudo, formatos *singleplex* e *multiplex*, referência dos oligonucleotídeos utilizados e os respectivos vírus-alvos, baseados nas análises *in silico*

Ensaio	Vírus	Referência
<i>Multiplex</i>	DENV-1 e DENV-3	Dyer; Chisenhall; Mores, 2007
<i>Multiplex</i>	DENV-2 e DENV-4	Dyer; Chisenhall; Mores, 2007
<i>Multiplex</i>	JEV e ROCV	Chao; Davis; Chang, 2007 e Henriques, 2009
<i>Multiplex</i>	SLEV e WNV	Brault; Fang; Reisen, 2015

<i>Singleplex</i>	YFV	Chao; Davis; Chang, 2007
<i>Multiplex</i>	ZIKV e CHIKV	Álvarez-Díaz <i>et al.</i> , 2021
<i>Multiplex</i>	WEEV e EEEV	Vina-Rodriguez <i>et al.</i> , 2016
<i>Singleplex</i>	VEEV	Vina-Rodriguez <i>et al.</i> , 2016
<i>Multiplex</i>	OROV e MAYV	Naveca <i>et al.</i> , 2017

Fonte: elaborado pelo próprio autor

#### 4.4 Validação experimental por RT-qPCR

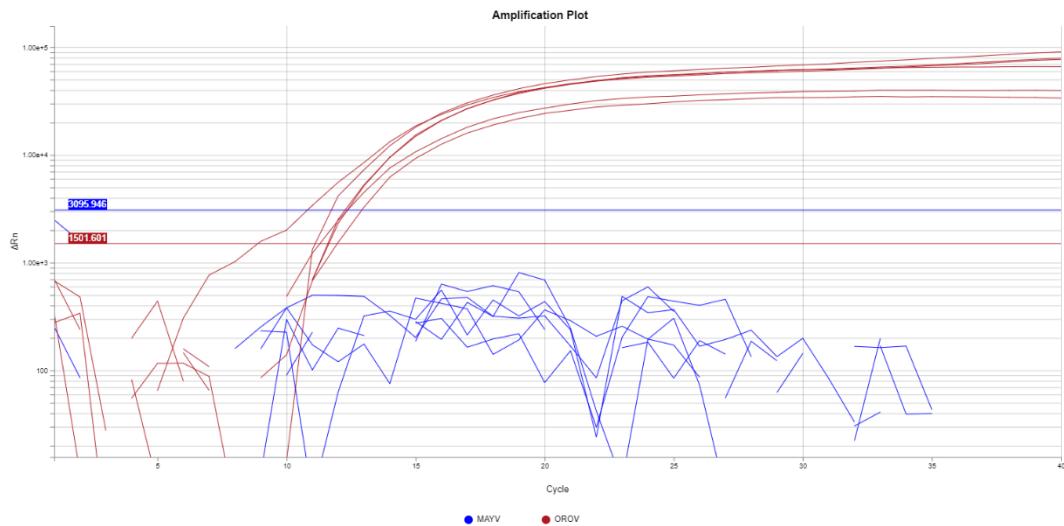
Os *primers* e sondas descritos por Naveca *et al.* (2017) foram utilizados para a validação experimental de reações de RT-qPCR *singleplex* e *multiplex* para detecção de OROV e MAYV utilizando triplicatas de diferentes cepas virais, incluindo OROV, MAYV, DENV-4, CHIKV, ZIKV, YFV e CN, para verificar a amplificação e a especificidade das reações. Conforme o esperado, houve amplificação específica nos ensaios *singleplex* e *multiplex* para a cepa de OROV (**Figura I**), MAYV\_selvagem (**Figura II**) e MAYV\_nanoluc (**Figura III**). Para as amostras testadas, incluindo DENV-4 (**Figura IV**), ZIKV (**Figura V**), YFV (**Figura VI**), e CN (**Figura VII**) não houve amplificação em nenhum dos ensaios, evidenciando a especificidade das reações.

Para CHIKV (**Figura VIII**) houve uma amplificação (seta vermelha) no ensaio *singleplex* para OROV, no entanto, essa amplificação não pode ser considerada uma amplificação específica, já que o *software* não atribuiu valor de ciclo de quantificação (Cq), o qual foi registrado como indeterminado. Para a obtenção da especificidade de uma técnica de amplificação, é necessário prevenir ou reduzir a formação de estruturas secundárias. Essas estruturas competem com as amplificações específicas, gerando amplificações inespecíficas (Garafutdinov; Galimova; Sakhabutdinova, 2020). Conforme descrito anteriormente, o *primer forward* OROV\_FNF e a sonda OROV\_FNP, utilizadas na reação, apresentaram valores altos de  $\Delta G$  (-12,90 e -6,34 kcal/mol, respectivamente) nas análises *in silico*. Esses valores favorecem a formação de dímeros no ensaio, o que pode ter comprometido a reação de amplificação.

Além disso, não houve amplificação sigmoidal considerada padrão de PCR. Um gráfico padrão de PCR é representado por uma curva sigmoidal, ou curva em formato de S, com quatro fases representativas: linha de base, exponencial, linear e platô. A primeira fase é chamada de fase de linha de base, ou *baseline*, na qual o sinal de fluorescência é muito baixo devido a pouca quantidade de produto, logo, a *baseline* é definida para eliminar os ruídos de fundo. A segunda fase, ou fase exponencial é a fase em que a quantidade de produto de PCR dobra a cada ciclo, logo, à medida que o produto aumenta, a fluorescência também aumenta, ultrapassando o ruido de fundo. O limiar (*threshold*) é estabelecido acima da *baseline* e dentro da fase exponencial (Bivins *et al.*, 2021). Já o Cq corresponde ao número de ciclos no qual a curva de amplificação ultrapassa o *threshold*, sendo o Cq inversamente proporcional a quantidade de ácido nucléico alvo na amostra, ou seja, valores mais baixos do Cq indicam maior quantidade de ácido nucléico alvo na amostra (Bivins *et al.*, 2021; Quan; Sauzade; Brouzes, 2018). A fase linear ocorre quando os reagentes estão se esgotando, reduzindo a eficiência de amplificação da reação. A

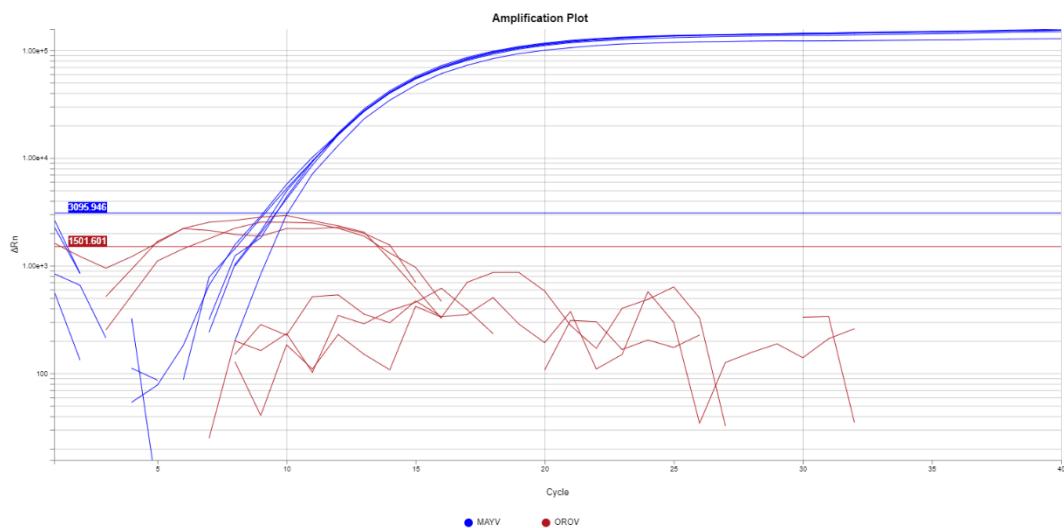
última fase, chamada de platô, é marcada pela saturação da reação, na qual os reagentes se esgotam e não há mais produto sendo amplificado (Quan; Sauzade; Brouzes, 2018).

**Figura I** – Curvas de amplificação de OROV nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



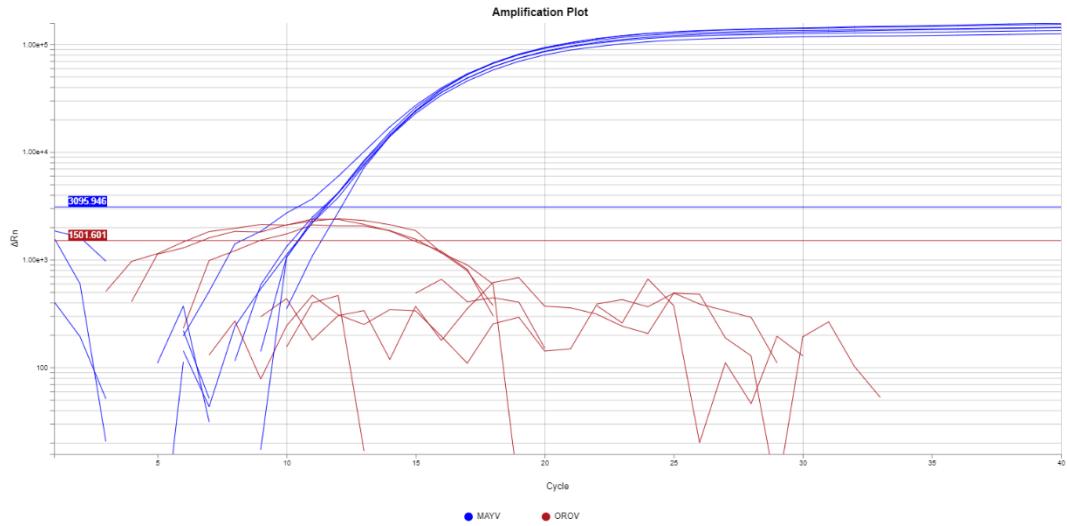
Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura II** – Curvas de amplificação de MAYV \_selvagem nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



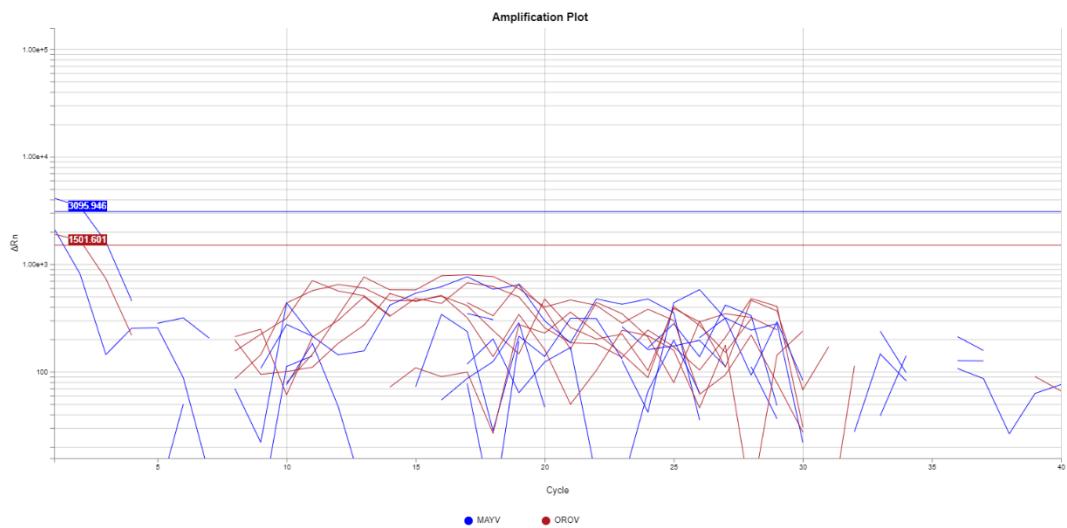
Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura III** - Curvas de amplificação de MAYV \_nanoluc nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



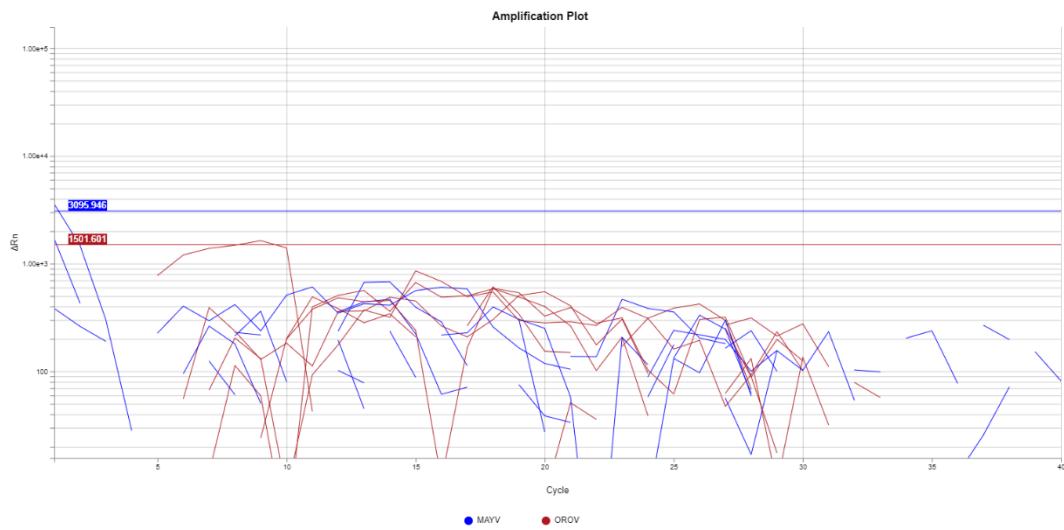
Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura IV** – Curva de amplificação de DENV-4 nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



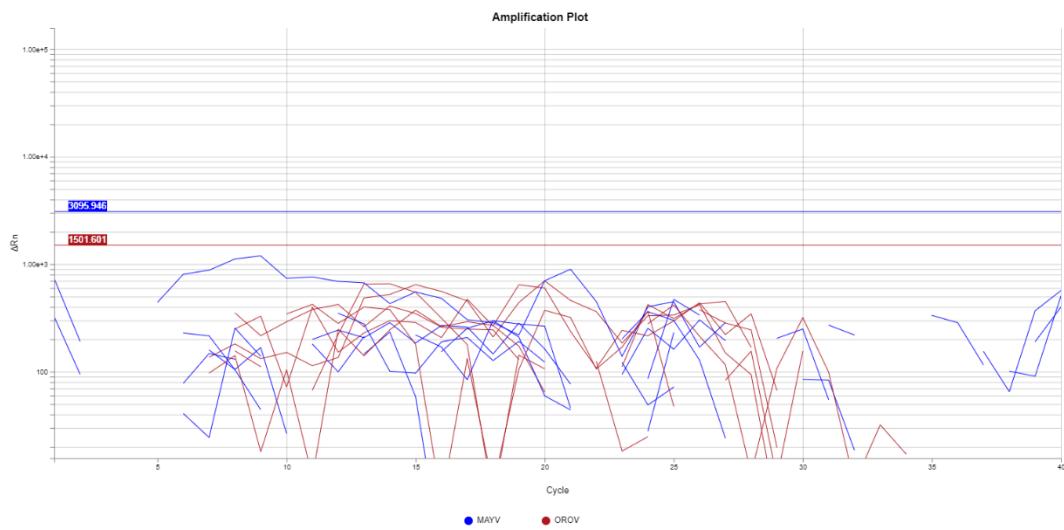
Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura V** – Curva de amplificação de ZIKV nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura VI** – Curva de amplificação de YFV nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



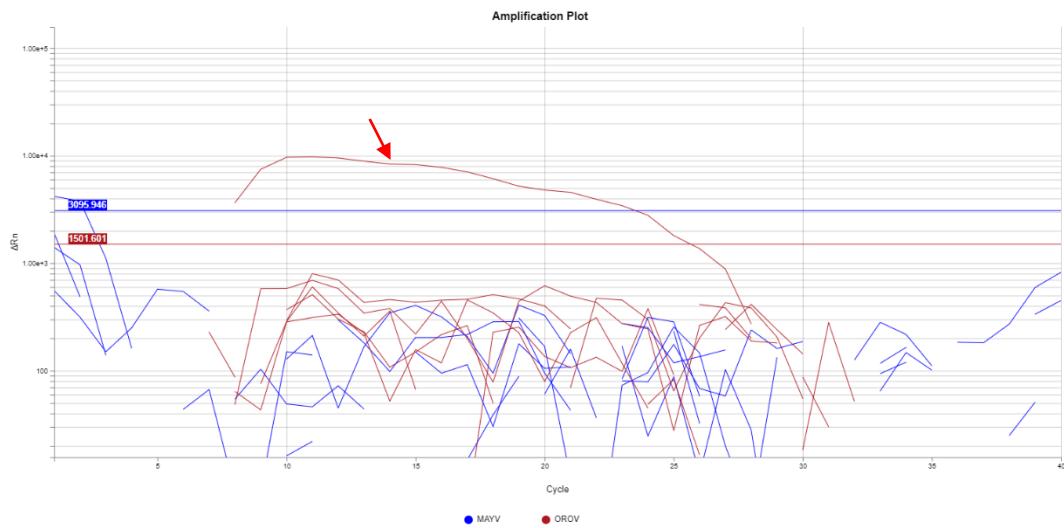
Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura VII** – Curva de amplificação de CN nos ensaios *singleplex* e *multiplex*



Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

**Figura VIII** – Curvas de amplificação de CHIKV para as reações *singleplex* e *multiplex*



Fonte: Dados gerados no equipamento *QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System*

Os valores de Cq para as triplicatas foram anotados e os valores médios utilizados para comparar as reações *singleplex* e *multiplex* (**Tabela XII**), sendo que estes apresentaram pouca diferença, evidenciando que a reação *multiplex* não comprometeu a eficiência do ensaio.

**Tabela XIII** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* para OROV e MAYV utilizando o protocolo descrito por Naveca *et al.* (2017). As reações foram testadas contra cepas de OROV, MAYV\_N, MAYV\_S, DENV-4, CHIKV, ZIKV, YFV e CN

<b>Vírus</b>	<b>Singleplex (Cq médio)</b>		<b>Multiplex (Cq médio)</b>	
	<b>OROV</b>	<b>MAYV</b>	<b>OROV</b>	<b>MAYV</b>
OROV	11,85	-	11,78	-
MAYV_N	-	13,35	-	12,92
MAYV_S	-	11,05	-	11,03
DENV-4	-	-	-	-
CHIKV	-	-	-	-
ZIKV	-	-	-	-
YFV	-	-	-	-
CN	-	-	-	-

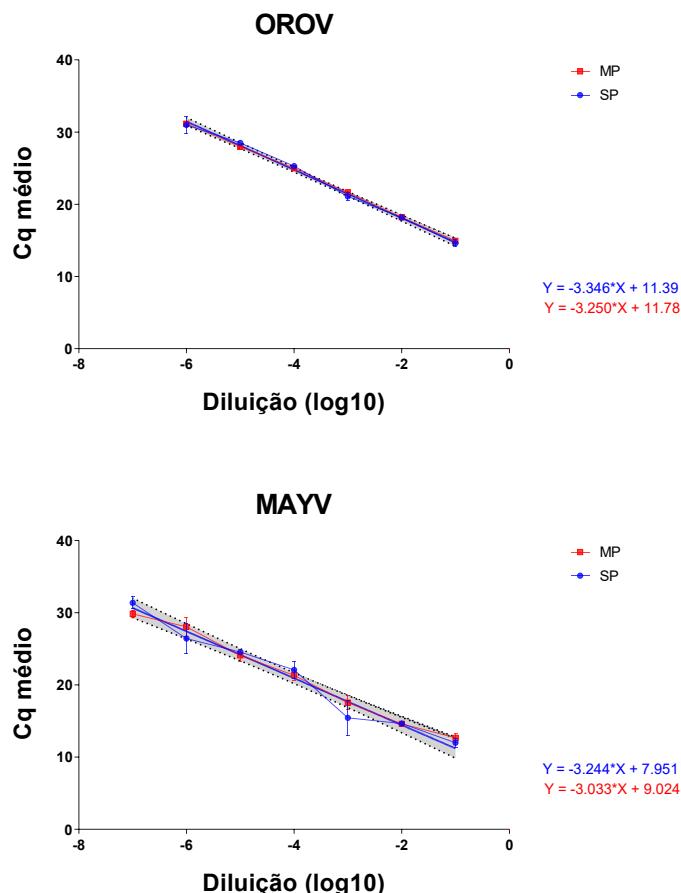
Fonte: elaborada pelo próprio autor

Notas: O símbolo (-) indica Cq não determinado;

MAYV\_N corresponde à amostra de MAYV\_nanoluc, enquanto MAYV\_S refere-se à amostra de MAYV\_selvagem.

Para a construção da curva padrão foram realizados ensaios *singleplex* e *multiplex* utilizando amostras em triplicatas de OROV e MAYV\_selvagem diluídas seriadamente ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). As curvas padrão obtidas a partir das diluições seriadas de OROV e MAYV são apresentadas na **Figura VIII**. Nota-se que quanto menor a diluição menor é o Cq, ou seja, que para amostras com maior carga viral o número de ciclos necessários para que a curva de amplificação ultrapasse o *threshold* é menor. Os Cqs de OROV, apresentados na **Tabela XIII**, mostraram pouca diferença entre os ensaios *singleplex* e *multiplex* (menores que 1,0), evidenciando que o ensaio *multiplex* possibilita resultados semelhantes ao *singleplex*. Além disso, em nenhum dos dois ensaios houve amplificação do alvo nas diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , mostrando que os ensaios possuem um limite de detecção semelhante para amostras muito diluídas.

**Figura VIII** - Curvas padrão obtidas a partir de diluições seriadas do RNA de OROV (A) e MAYV (B) em reações *singleplex* e *multiplex*. Os valores de Cq médio foram plotados em função do log10 da diluição, e a regressão linear foi utilizada para o cálculo da eficiência de amplificação



Fonte: *GraphPad Prism 8* (versão 8.0.2)

**Tabela XIV** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* com amostras de OROV submetidas a oito diluições

Diluição	Singleplex (Cq médio)	Multiplex (Cq médio)
10 <sup>-1</sup>	14,60	14,95
10 <sup>-2</sup>	18,16	18,21
10 <sup>-3</sup>	21,09	21,63
10 <sup>-4</sup>	25,28	25,01
10 <sup>-5</sup>	28,50	27,98
10 <sup>-6</sup>	30,98	31,17
10 <sup>-7</sup>	-	-
10 <sup>-8</sup>	-	-

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica Cq não determinado

Já os Cq de MAYV, apresentados na **Tabela XIV**, mostraram diferenças um pouco maiores entre os ensaios *singleplex* e *multiplex*, principalmente nas diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  ( $>1,0$ ). Supõe-se que a diferença entre os ensaios na diluição de  $10^{-3}$  seja devido a variabilidade experimental, já que os valores de Cq antes e depois entre os ensaios estão próximos. No entanto, na diluição de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  as diferenças podem ser devido às elevadas diluições das amostras, que podem afetar a sensibilidade de ensaios *multiplex*. Além disso, em nenhum dos dois ensaios houve amplificação do alvo na diluição de  $10^{-8}$ , evidenciando que os ensaios possuem um limite de detecção semelhante para amostras muito diluídas.

**Tabela XV** – Valores médios de Cq para os ensaios *singleplex* e *multiplex* com amostras de MAYV\_selvagem submetidas a oito diluições

Vírus	<i>Singleplex</i> (Cq médio)	<i>Multiplex</i> (Cq médio)
$10^{-1}$	11,98	12,67
$10^{-2}$	14,64	14,61
$10^{-3}$	15,44	17,55
$10^{-4}$	22,07	21,3
$10^{-5}$	24,54	24,08
$10^{-6}$	26,43	28,04
$10^{-7}$	31,37	29,84
$10^{-8}$	-	-

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica Cq não determinado

A curva padrão foi plotada com os valores de Cq médio das reações *singleplex* e *multiplex* com amostras de OROV e MAYV em função do  $\log_{10}$  da diluição, e a regressão linear foi utilizada para o cálculo da eficiência da amplificação. Para a construção da curva padrão, os parâmetros considerados foram *slope*, intercepto,  $R^2$  e eficiência. O *slope*, ou inclinação da curva, é a medida da taxa de variação do valor de Cq por variação na diluição logarítmica. A eficiência da reação, ou seja, a taxa na qual as moléculas alvo são amplificadas por ciclo de PCR é calculada a partir do *slope*(Sahoo *et al.*, 2022). O *slope* ideal é de -3,32, indicando 100% de eficiência na reação, no entanto, a faixa de -3,1 e -3,58, ou seja, 110% a 90% de eficiência também são consideradas aceitáveis (Bivins *et al.*, 2021; Sahoo *et al.*, 2022). Os valores de  $R^2$ , usados para avaliar a qualidade da determinação da eficiência e devem variar de 0,98 a 1,00, sendo esse valor afetado pela precisão das triplicatas, e valores baixos indicam erros nos experimentos, como pipetagem, condição das reações, variação do equipamento, entre outros (Bivins *et al.*, 2021). O intercepto em y fornece a sensibilidade teórica do ensaio,

correspondendo ao valor de Cq médio quando x=0, ou seja, quando não há diluição da amostra (Bivins *et al.*, 2021; Sahoo *et al.*, 2022).

A **Tabela XV** indica os *slopes* das curvas de RT-qPCR dos ensaios *singleplex* e *multiplex* para OROV e MAYV. Os ensaios de OROV, tanto *singleplex* quanto *multiplex*, e o ensaio *singleplex* de MAYV estão dentro da faixa ideal, apresentando bons valores de *slope* e eficiência de reação. No entanto, o ensaio *multiplex* de MAYV apresentou um valor fora da faixa ideal de *slope* e eficiência, o que já era esperado devido as variações do Cq médio entre os ensaios *singleplex* e *multiplex* de MAYV. Os valores de R<sup>2</sup> estão dentro da faixa ideal, exceto o ensaio *singleplex* de MAYV, indicando variação experimental na precisão das triplicatas. Os valores de intercepto nos ensaios *singleplex* e *multiplex* de OROV estão próximos, indicando que o ensaio *multiplex* manteve valores semelhantes de Cq, quando comparado ao ensaio *singleplex*, na detecção do alvo para as amostras. Já os valores de intercepto para os ensaios de MAYV apresentam diferenças, sendo o ensaio *singleplex* 7,95 e o *multiplex* 9,03. Logo, no ensaio *multiplex* a curva de amplificação atinge o *threshold* em um número maior de ciclos, resultando em uma detecção mais tardia do alvo.

**Tabela XVI** – Parâmetros da curva padrão dos ensaios *singleplex* e *multiplex* de OROV e MAYV

Virus	Formato	Slope	Intercepto	R <sup>2</sup>	Eficiência (%)
OROV	<i>Singleplex</i>	-3,35	11,39	1,00	99,01
OROV	<i>Multiplex</i>	-3,25	11,78	1,00	103,07
MAYV	<i>Singleplex</i>	-3,24	7,95	0,97	103,37
MAYV	<i>Multiplex</i>	-3,03	9,03	0,99	113,67

Fonte: *GraphPad Prism 8* (versão 8.0.2)

Uma limitação do presente estudo é a ausência de um controle interno. O controle interno é fundamental para o diagnóstico molecular e são necessários para evitar resultados falso negativos, aumentando a confiabilidade do teste. Ele consiste em um fragmento de DNA que é amplificado junto com o alvo, e a sua presença durante a amplificação do alvo comprova que as etapas de processamento, extração e amplificação do material genético foram feitas de maneira correta (Sachadyn; Kur, 1998). Logo, em ensaios futuros será incorporado um controle interno, a fim de melhorar a confiabilidade do ensaio.

Com relação às reações *singleplex*, elas podem ser consideradas vantajosas já que apenas um alvo é amplificado por reação, o que facilita o esboço do ensaio e a otimização das

condições para apenas um conjunto de *primers* e sondas (Mas-Carrió *et al.*, 2025). No entanto, o ensaio *multiplex* permite a amplificação de múltiplos alvos por reação no mesmo período, o que auxilia em laboratórios clínicos e de diagnósticos, reduzindo o tempo e os custos (Mas-Carrió *et al.*, 2025; Parker *et al.*, 2015).

Devido a uma série de fatores, como globalização, mudanças climáticas e atividades antropogênicas, múltiplos arbovírus estão disseminados globalmente, com maior disponibilidade de hospedeiros e maior adequação ambiental para circulação (Oliveira *et al.*, 2025). Eles predominam nas regiões tropicais e subtropicais, além de compartilharem vetores comuns e possuírem sintomas sobrepostos, como febre, erupções cutâneas e artralgia, o que dificulta ainda mais o diagnóstico clínico (Daudt-Lemos *et al.*, 2025). Atualmente, o OROV e MAYV estão sendo cada vez mais reconhecidos como arbovírus com potencial para causar futuras epidemias (Mattar *et al.*, 2025). OROV se disseminou rapidamente para áreas como Bolívia, Brasil, Colômbia e Peru durante surtos que ocorreram entre o final de 2023 e 2024, além de afetar ambientes antes não contaminados (Lin *et al.*, 2025). O MAYV circula no Brasil desde a década de 1980, com aumento na notificação de casos humanos nos últimos anos (Krokovsky *et al.*, 2023). Apesar do OROV ser uma ameaça, ainda há escassez de dados de investigação nas redes de vigilância, medidas de controle e tecnologias para o desenvolvimento de vacinas, diagnósticos e terapias antivirais (Lin *et al.*, 2025). Situação essa que também ocorre com o MAYV, considerado um arbovírus negligenciado, não havendo medidas profiláticas, estratégias antivirais, preventivas e de tratamento para a doença (Andreolla *et al.*, 2025; Marques *et al.*, 2024). Logo, são necessários testes de diagnósticos específicos e simultâneos, como a RT-qPCR *multiplex*, para distinguir as infecções causadas pelo MAYV e OROV de outras arboviroses, além de complementar a vigilância epidemiológica com dados de investigação para as diversas regiões do Brasil.

## 5 CONCLUSÃO

A partir desse estudo, utilizando diferentes instrumentos de bioinformática, foi possível realizar a análise *in silico* e a seleção de oligonucleotídeos, previamente descritos na literatura, para detecção de *Orthoflavivirus*, *Alphavirus* e a espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*. Além disso, a partir da análise *in silico* foi possível estabelecer os melhores oligonucleotídeos

para cada vírus alvo, e propor reações de RT-qPCR nos formatos *singleplex* ou *multiplex* para cada um.

Avaliando experimentalmente os *primers* e sondas descritos por Naveca *et al.*, 2017, pode-se observar que os ensaios *singleplex* e *multiplex* de RT-qPCR foram capazes de detectar os alvos OROV e MAYV de maneira específica, com valores semelhantes de *slope*, *intercept*,  $R^2$  e eficiência de amplificação, com poucas alterações nos ensaios de MAVY. O ensaio *multiplex* possibilita resultados muito semelhantes quando comparados ao ensaio *singleplex*, além de possibilitar a amplificação de múltiplos alvos por reação, sendo mais rápido e com custo menor, auxiliando em laboratórios clínicos e de diagnóstico. Logo, com testes de diagnósticos específicos e simultâneos, como a RT-qPCR *multiplex* para OROV e MAYV, será possível distinguir as infecções causadas por essas arboviroses, além de complementar a vigilância epidemiológica de diversas regiões do Brasil.

## REFERÊNCIAS

- ABDOULLAH, Bedia *et al.* Seroprevalence of Alphaviruses (Togaviridae) among Urban Population in Nouakchott, Mauritania, West Africa. **Viruses**, v. 15, n. 7, p. 1588, 20 jul. 2023.
- AKTER, Runa *et al.* Approaches of dengue control: vaccine strategies and future aspects. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 29 fev. 2024.
- ÁLVAREZ-DÍAZ, Diego Alejandro *et al.* An updated RT-qPCR assay for the simultaneous detection and quantification of chikungunya, dengue and zika viruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104967, set. 2021.
- ALZAHRANI, Nabeel *et al.* Delayed by Design: Role of Suboptimal Signal Peptidase Processing of Viral Structural Protein Precursors in Flaviviridae Virus Assembly. **Viruses**, v. 12, n. 10, p. 1090, 26 set. 2020.
- ANDREOLLA, Ana Paula *et al.* Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1787, 16 ago. 2022.
- ANDREOLLA, Ana Paula *et al.* Identification and Characterization of Antiviral Activity of Synthetic Compounds Against Mayaro Virus. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 5, p. 717, 13 maio 2025.
- ANTONIOU, Evangelia *et al.* Congenital Zika Syndrome and Disabilities of Feeding and Breastfeeding in Early Childhood: A Systematic Review. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 601, 22 fev. 2023.
- AZAR, Sasha R. *et al.* Epidemic Alphaviruses: Ecology, Emergence and Outbreaks. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1167, 1 ago. 2020.
- BANDA, Cecilia; SAMANTA, Debopam. **Eastern Equine Encephalitis**. [S.l.: S.n.]
- BARBOSA COSTA, Galileu *et al.* Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1029, 5 nov. 2019.
- BIVINS, Aaron *et al.* Variability in RT-qPCR assay parameters indicates unreliable SARS-CoV-2 RNA quantification for wastewater surveillance. **Water Research**, v. 203, p. 117516, set. 2021.
- BRASIL. Monitoramento das arboviroses urbanas: semanas epidemiológicas 1 a 35 de 2023. Ministério da SaúdeSecretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente , , 22 nov. 2023.**
- BRASIL. Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024. Ministério da SaúdeSecretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente , , 4 jul. 2024.**
- BRAULT, A. C.; FANG, Y.; REISEN, W. K. Multiplex qRT-PCR for the Detection of Western Equine Encephalomyelitis, St. Louis Encephalitis, and West Nile Viral RNA in Mosquito

Pools (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 491–499, 1 maio 2015.

BURPO, Fred Jhon. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. **Biochemistry**, p. 1–12, 1 jan. 2001.

CAMARÃO, A. A. R. *et al.* Development and analytical validation of a group-specific RT-qPCR assay for the detection of the Simbu serogroup orthobunyaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 271, p. 113685, set. 2019.

CARRERA, Jean-Paul *et al.* Real-time RT-PCR for Venezuelan equine encephalitis complex, Madariaga, and Eastern equine encephalitis viruses: application in human and mosquito public health surveillance in Panama. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 61, n. 12, 19 dez. 2023.

CHANCEY, Caren *et al.* The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–20, 2015.

CHAO, Day-Yu; DAVIS, Brent S.; CHANG, Gwong-Jen J. Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 584–589, fev. 2007.

CHEN, Shun *et al.* Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 291, 7 out. 2017.

CHUKWUEMEKA, Prosper Obed *et al.* In silico design and validation of a highly degenerate primer pair: a systematic approach. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 72, dez. 2020.

COIMBRA, Terezinha Lisieux Moraes *et al.* Molecular characterization of two rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in São Paulo state, Brazil and the development of a one-step rt-pcr assay for diagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 89–94, abr. 2008.

CÔRTEZ, Nelson *et al.* Integrated control strategies for dengue, Zika, and Chikungunya virus infections. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 18 dez. 2023.

COSTA, Aline Gonçalves. **Caracterização molecular do isolado viral AR115: evidência da circulação de vírus do sorogrupo Gamboa no sudeste do Brasil**. Dissertação de Mestrado em Virologia—Ananindeua: Instituto Evandro Chagas, 2018.

COSTA, Érica Azevedo *et al.* West Nile Virus in Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 896, 15 jul. 2021.

COSTA, Jéssica; FERREIRA, Eugénio C.; SANTOS, Cledir. COVID-19, Chikungunya, Dengue and Zika Diseases: An Analytical Platform Based on MALDI-TOF MS, IR Spectroscopy and RT-qPCR for Accurate Diagnosis and Accelerate Epidemics Control. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 708, 30 mar. 2021.

COSTA, Lourrany Borges *et al.* Epidemiology and Economic Burden of Chikungunya: A Systematic Literature Review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 6, p. 301, 31 maio 2023.

DAUDT-LEMOS, Matheus *et al.* Rising Incidence and Spatiotemporal Dynamics of Emerging and Reemerging Arboviruses in Brazil. **Viruses**, v. 17, n. 2, p. 158, 24 jan. 2025.

DE AMORIN VILHARBA, Bruna Luiza *et al.* Disease burden of congenital Zika virus syndrome in Brazil and its association with socioeconomic data. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11882, 23 jul. 2023.

DE LIMA CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 5 maio 2022.

DE OLIVEIRA FIGUEIREDO, Poliana *et al.* Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016–2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1233, 30 out. 2020.

DE SOUZA, William M. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Peribunyaviridae 2024. **Journal of General Virology**, v. 105, n. 11, 7 nov. 2024.

DESAI, Angel N. *et al.* Oropouche virus: A re-emerging arbovirus of clinical significance. **IJID Regions**, v. 13, p. 100456, dez. 2024.

DIAGNE, Cheikh Tidiane *et al.* Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738, 8 set. 2020.

DYER, J.; CHISENHALL, D. M.; MORES, C. N. A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 145, n. 1, p. 9–13, out. 2007.

ESPOSITO, Danillo Lucas Alves; FONSECA, Benedito Antonio Lopes da. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, set. 2017.

FUJITA, Dennis Minoru *et al.* Dengue and climate changes: Increase of DENV-1 in São Paulo/Brazil – 2023. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 56, p. 102668, nov. 2023.

GARAFUTDINOV, Ravil R.; GALIMOVA, Aizilya A.; SAKHABUTDINOVA, Assol R. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. **Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 39, n. 9, p. 1251–1269, 1 set. 2020.

GARDINI SANCHES PALASIO, Raquel *et al.* Zika, chikungunya and co-occurrence in Brazil: space-time clusters and associated environmental–socioeconomic factors. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 18026, 21 out. 2023.

GIANCHECCHI, Elena *et al.* Yellow Fever: Origin, Epidemiology, Preventive Strategies and Future Prospects. **Vaccines**, v. 10, n. 3, p. 372, 27 fev. 2022.

GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika Virus Infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 181–203, 24 jan. 2023.

GIRY, Claude *et al.* Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 164, 24 dez. 2017.

GODINHO, Igor Pereira *et al.* Insights into the expansion of Oropouche virus in Brazil: epidemiological and environmental aspects. **Experimental Biology and Medicine**, v. 250, 24 jul. 2025.

GOLOSOVA, Olga *et al.* Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses. **PeerJ**, v. 2, p. e644, 4 nov. 2014.

GRABENSTEIN, John D.; TOMAR, Aditya Singh. Global geotemporal distribution of chikungunya disease, 2011–2022. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 54, p. 102603, jul. 2023.

GUBLER, Duane J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, jul. 2002.

GUZMÁN-TERÁN, Camilo *et al.* Venezuelan equine encephalitis virus: the problem is not over for tropical America. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 19, 19 dez. 2020.

**HENRIQUES, D. F. INFECÇÃO PERSISTENTE PELOS FLAVIVÍRUS ILHÉUS E ROCIO EM HAMSTERS DOURADOS JOVENS (MESOCRICETUS AURATUS).**  
Dissertação de Mestrado em Doenças Tropicais—Belém: Universidade Federal do Pará , 28 ago. 2009.

HUANG, Zhiwei *et al.* Vaccine development for mosquito-borne viral diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 12 maio 2023.

ISLAM, Mohammed Alimul *et al.* A Novel Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8281, 5 nov. 2020.

IVERSSON, Lygia Busch. Aspectos da epidemia de encefalite por arbovírus na região do Vale do Ribeira, S. Paulo, Brasil, no período de 1975 a 1978. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, n. 1, p. 9–35, mar. 1980.

IVERSSON, Lygia Busch; COIMBRA, Terezinha Lisieux Moraes. Encefalite na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período pós-epidêmico de 1978 a 1983: situação do diagnóstico etiológico e características epidemiológicas. **Revista de Saúde Pública**, v. 18, n. 4, p. 323–332, ago. 1984.

KANAN, Mohammed *et al.* Genetic variants associated with dengue hemorrhagic fever. A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection and Public Health**, v. 17, n. 4, p. 579–587, abr. 2024.

KHAN, Muhammad Bilal *et al.* Dengue overview: An updated systemic review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, n. 10, p. 1625–1642, out. 2023.

KROKOVSKY, Larissa *et al.* Dynamic of Mayaro Virus Transmission in Aedes aegypti, Culex quinquefasciatus Mosquitoes, and a Mice Model. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 799, 21 mar. 2023.

KUMAR, Balvinder *et al.* Zoonotic Viral Diseases of Equines and Their Impact on Human and Animal Health. **The Open Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 80–98, 31 ago. 2018.

LICÍNIO, Christiane O. L.; AYRES, Flávio M. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021.

LIN, Siyu *et al.* Oropouche virus: molecular virological characteristics and research progress of a neglected arbovirus. **Virology Journal**, v. 22, n. 1, p. 393, 8 dez. 2025.

LORENZ, Todd C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, 22 maio 2012.

MALIK, Sumira *et al.* Yellow fever virus, a mosquito-borne flavivirus posing high public health concerns and imminent threats to travellers – an update. **International Journal of Surgery**, v. 109, n. 2, p. 134–137, fev. 2023.

MANSUY, Jean-Michel *et al.* Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 4, p. 284–287, dez. 2018.

MARINHO, Mikaela dos Santos *et al.* Development and validation of Mayaro virus with luciferase reporter genes as a tool for antiviral assays. **Heliyon**, v. 10, n. 13, p. e33885, jul. 2024.

MARQUES, Rafael Elias *et al.* Current challenges in the discovery of treatments against Mayaro fever. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 28, n. 5, p. 345–356, 3 maio 2024.

MARTINS-FILHO, Paulo Ricardo; CARVALHO, Thialla Andrade; DOS SANTOS, Cliomar Alves. Spatiotemporal Epidemiology of Oropouche Fever, Brazil, 2015–2024. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 10, out. 2024.

MAS-CARRIÓ, Eduard *et al.* Multiplex vs . singleplex assay for the simultaneous identification of the three components of avian malaria vector-borne disease by DNA metabarcoding. **PeerJ**, v. 13, p. e19107, 18 mar. 2025.

MATTAR, Salim *et al.* The next arbovirus epidemic in Latin America and beyond: A question of when, not if – Mayaro, Oropouche, Usutu or Disease X? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 64, p. 102818, mar. 2025.

MHAMADI, Moufid *et al.* Rapid On-Site Detection of Arboviruses by a Direct RT-qPCR Assay. **Biosensors**, v. 13, n. 12, p. 1035, 16 dez. 2023.

- MILHIM, Bruno H. G. A. *et al.* Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 957, 29 ago. 2020.
- MONDINI, Adriano *et al.* Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 40, n. 1, p. 84–86, set. 2007.
- MUSTAFA, M. S. *et al.* Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, jan. 2015.
- MWALIKO, Caroline *et al.* Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 1, p. 21–39, 2 jan. 2021.
- NATRAJAN, Muktha S.; ROJAS, Alejandra; WAGGONER, Jesse J. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, jun. 2019.
- NAVECA, Felipe Gomes *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510–513, jul. 2017.
- OKONECHNIKOV, Konstantin; GOLOSOVA, Olga; FURSOV, Mikhail. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, v. 28, n. 8, p. 1166–1167, 15 abr. 2012.
- OLIVEIRA, Maria Eduarda dos Santos Pereira de *et al.* Evaluation of the Impact of Coinfection and Superinfection on Chikungunya and Mayaro Viruses' Replication in Aedes aegypti. **Microorganisms**, v. 13, n. 9, p. 2165, 17 set. 2025.
- OLSON, Robert D. *et al.* Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D678–D689, 6 jan. 2023.
- OWCZARZY, R. *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server, p. W163–W169, 19 maio 2008.
- PABBARAJU, Kanti *et al.* Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, p. 66–71, out. 2016.
- PARKER, Jayme *et al.* Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143164, 16 nov. 2015.
- PATEL, Pranav *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 58, 14 dez. 2013.
- PAUVOLID-CORRÊA, Alex. **ESTUDO SOBRE ARBOVÍRUS EM POPULAÇÕES DE EQÜINOS E ARTRÓPODES NA SUB-REGIÃO DA NHECOLÂNDIA NO PANTANAL**

**DE MATO GROSSO DO SUL.** Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária—Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2008.

PESCARINI, Julia M. *et al.* Dengue, Zika, and Chikungunya viral circulation and hospitalization rates in Brazil from 2014 to 2019: An ecological study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 7, p. e0010602, 27 jul. 2022.

PIELNAA, Paul *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34–42, abr. 2020.

PORWAL, Sejal *et al.* Mysterious Oropouche virus: Transmission, symptoms, and control. **Infectious Medicine**, v. 4, n. 2, p. 100177, jun. 2025.

QUAN, Phenix-Lan; SAUZADE, Martin; BROUZES, Eric. dPCR: A Technology Review. **Sensors**, v. 18, n. 4, p. 1271, 20 abr. 2018.

RATNAYAKE, Oshani C. *et al.* The buzz in the field: the interaction between viruses, mosquitoes, and metabolism. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 26 abr. 2023.

RICCÒ, Matteo *et al.* (Re-)Emergence of Oropouche Virus (OROV) Infections: Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Viruses**, v. 16, n. 9, p. 1498, 22 set. 2024.

ROCCO, Iray M. *et al.* St. Louis encephalitis vírus: first isolation from a human in São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–285, out. 2005.

ROJAS, Alejandra *et al.* Real-time RT-PCR for the detection and quantitation of Oropouche virus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 96, n. 1, p. 114894, jan. 2020.

ROMANO-LIEBER, Nicolina S.; IVERSSON, Lygia B. Inquérito soroepidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 236–242, jun. 2000.

ROY, Sudipta Kumar; BHATTACHARJEE, Soumen. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687–702, out. 2021.

SACHADYN, P.; KUR, J. The construction and use of a PCR internal control. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, n. 5, p. 259–262, out. 1998.

SADEGHIEH, Tara *et al.* Yellow fever virus outbreak in Brazil under current and future climate. **Infectious Disease Modelling**, v. 6, p. 664–677, 2021.

SAHOO, Sunanda *et al.* An analysis of the standard curve parameters of cytomegalovirus, BK virus and hepatitis B virus quantitative polymerase chain reaction from a clinical virology laboratory in eastern India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 81–85, jan. 2022.

- SAIVISH, Marielena Vogel *et al.* Rocio Virus: An Updated View on an Elusive Flavivirus. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2293, 16 nov. 2021.
- SALVATO, Richard Steiner. Re-emergence of Oropouche virus as a novel global threat. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 8, p. 100406, 2025.
- SCACHETTI, Gabriel C. *et al.* Re-emergence of Oropouche virus between 2023 and 2024 in Brazil: an observational epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 166–175, fev. 2025.
- SCHNYDER, Jenny L. *et al.* Long-term immunity following yellow fever vaccination: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Global Health**, jan. 2024.
- SILVA, Tércia Moreira Ribeiro da *et al.* Yellow fever vaccination before and during the covid-19 pandemic in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 45, 13 jun. 2022.
- SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.
- SIMON, Leslie V.; KONG, Erwin L.; GRAHAM, Charles. **St Louis Encephalitis**. [S.l.: S.n.]
- SOCHA, Wojciech *et al.* Vector-Borne Viral Diseases as a Current Threat for Human and Animal Health—One Health Perspective. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 11, p. 3026, 27 maio 2022.
- SONI, Suha *et al.* Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. **Cureus**, 11 jul. 2023.
- STROMBERG, Zachary R. *et al.* Vaccine Advances against Venezuelan, Eastern, and Western Equine Encephalitis Viruses. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 273, 3 jun. 2020.
- TAIWAN ADVANCED NANOTECH INC. **TANBead Nucleic Acid Extraction Kit**. TaiwanAdvanced Nanotech Inc., , 2024.
- THORNTON, Brenda; BASU, Chhandak. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145–154, 28 mar. 2011.
- TILSTON-LUNEL, Natasha L. Oropouche Virus: An Emerging Orthobunyavirus. **Journal of General Virology**, v. 105, n. 10, 1 out. 2024.
- TUELLS, Jose; HENAO-MARTÍNEZ, Andrés F.; FRANCO-PAREDES, Carlos. Yellow Fever: A Perennial Threat. **Archives of Medical Research**, v. 53, n. 7, p. 649–657, nov. 2022.
- VAN LEUR, Sophie Wilhelmina *et al.* Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 31 dez. 2021.

VARGHESE, Jano; DE SILVA, Imesh; MILLAR, Douglas S. Latest Advances in Arbovirus Diagnostics. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1159, 28 abr. 2023.

VINA-RODRIGUEZ, Ariel *et al.* A Quantitative Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of *Venezuelan equine encephalitis virus* Utilizing a Universal Alphavirus Control RNA. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

VU, David M.; JUNGKIND, Donald; ANGELLE DESIREE LABEAUD. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, jun. 2017.

WANG, Penghua; ZHANG, Rong. Chikungunya Virus and (Re-) Emerging Alphaviruses. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 779, 24 ago. 2019.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, fev. 2010.

WISE, Emma L. *et al.* Oropouche virus cases identified in Ecuador using an optimised qRT-PCR informed by metagenomic sequencing. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007897, 21 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 2 dez. 2025.

XAVIER, Joilson *et al.* Increased interregional virus exchange and nucleotide diversity outline the expansion of chikungunya virus in Brazil. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 4413, 21 jul. 2023.

XIMENES, Julio César Martins; BRAGA, Maria Luisa Mobilio. Desenvolvimento in silico de método diagnóstico multiplex para pneumonias. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. e5323, 22 set. 2025.

ZHANG, Wenrong *et al.* A Review of Pathogens Transmitted by the Container-Inhabiting Mosquitoes, *Aedes Albopictus*, A Global Public Health Threat. **China CDC Weekly**, v. 5, n. 44, p. 984–990, 2023.

**APÊNDICE A – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS *Orthoflavivirus***

Vírus	Nome	Cepa	Número do acesso	Tamanho (pB)	Ano	País de isolamento	Hospedeiro
DENV-1	dengue virus type 1 CX52VSP22	CX52VSP22	PP626441	10599	2022	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 13501/BR-PE/10	13501/BR-PE/10	JX669463	10735	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 1	-	FJ850070	10677	2000	Brasil	Humano
	Dengue virus 1	-	FJ850093	10690	2008	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 DF01-HUB01021093	DF01-HUB01021093	FJ384655	10735	-	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 14985/BR-PE/10	14985/BR-PE/10	JX669466	10737	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 21814/BR-PE/96	21814/BR-PE/96	JX669467	10737	1996	Brasil	Humano
	dengue virus type 1 CX88KKRS22	CX88KKRS22	PP626442	10634	2022	Brasil	Humano
	dengue virus type 1 DENV-1/TO-UFT242979	DENV-1/TO-UFT-242979	OR518255	10644	2021	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 DENV1BR/SJRP/484/2012	DENV1 BR/SJRP/484/2012	KP188543	10917	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 1	-	FJ850075	10683	2002	Brasil	Humano
	Dengue virus 1	-	AB519681	10735	2001	Brasil	Humano
	Dengue virus 1	-	FJ850090	10673	2007	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 DENV1BR/SJRP/509/2012	DENV1 BR/SJRP/509/2012	KP188544	10917	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 40604/BR-PE/97	40604/BR-PE/97	JX669468	10736	1997	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 13671/BR-PE/10	13671/BR-PE/10	JX669464	10736	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 12898/BR-PE/10	12898/BR-PE/10	JX669462	10737	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 9808/BR-PE/10	9808/BR-PE/10	JX669461	10736	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 1 41111/BR-PE/97	41111/BR-PE/97	JX669469	10736	1997	Brasil	Humano

Dengue virus 1 13861/BR-PE/10	13861/BR-PE/10	JX669465	10736	2010	Brasil	Humano	
dengue virus type 2 BS71	BS71	PP546320	10723	2022	Brasil	Humano	
Dengue virus type 2 C2_2019_DENV2	C2_2019_DENV-2	OQ101603	10725	2019	Brasil	Humano	
Dengue virus type 2 Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200010	Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200010	OP941841	10706	2022	Brasil	Humano	
Dengue virus type 2 Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200012	Fiocruz-ILMD-FVSRCP_AR2200012	OP941843	10711	2022	Brasil	Humano	
Dengue virus 2 161	161	MW577810	10701	2019	Brasil	Humano	
Dengue virus 2 193	193	MW577839	10715	2019	Brasil	Humano	
Dengue virus 2 DENV2-5_SP194589	DENV2-5_SP194589	OK605761	10723	2000	Brasil	Humano	
Dengue virus 2 162	162	MW577811	10722	2019	Brasil	Humano	
DENV-2	Dengue virus 2 166	166	MW577813	10725	2019	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 167	167	MW577814	10716	2019	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 168	168	MW577815	10725	2019	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 169	169	MW577816	10724	2019	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 51347/BR-PE/98	51347/BR-PE/98	JX669485	10723	1998	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 14905/BR-PE/10	14905/BR-PE/10	JX669477	10723	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 3275/BR-PE/95	3275/BR-PE/95	JX669480	10723	1995	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 47913/BR-PE/98	47913/BR-PE/98	JX669484	10723	1998	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 3337/BR-PE/95	3337/BR-PE/95	JX669482	10726	1995	Brasil	Humano
	Dengue virus 2 87086/BR-PE/02	87086/BR-PE/02	JX669488	10724	2002	Brasil	Humano
Dengue virus 2 72144/BR-PE/00	72144/BR-PE/00	JX669487	10723	2000	Brasil	Humano	
Dengue virus 2 57135/BR-PE/99	57135/BR-PE/99	JX669486	10724	1999	Brasil	Humano	
Dengue virus 3 603/BR-PE/06	603/BR-PE/06	JX669496	10709	2006	Brasil	Humano	
Dengue virus 3 85469/BR-PE/02	85469/BR-PE/02	JX669490	10707	2002	Brasil	Humano	

	Dengue virus 3 95016/BR-PE/02	95016/BR-PE/02	KC425219	10707	2002	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 BR DEN3 95-04	DEN3 95-04	EF629366	10707	-	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 DENV3/BR/D3LIMHO/2006	DENV3/BR/D3LIMHO/2006	JN697379	10696	2006	Brasil	Humano
	Dengue virus type 3 Fiocruz-ILMD LACENRR-AR2300001	Fiocruz-ILMD-LACENRR-AR2300001	OQ706226	10697	2023	Brasil	Humano
DENV-3	Dengue virus 3 424/BR-PE/06	424/BR-PE/06	JX669508	10708	2006	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 411/BR-PE/06	411/BR-PE/06	JX669504	10707	2006	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 418/BR-PE/06	418/BR-PE/06	JX669505	10707	2006	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 314/BR-PE/06	314/BR-PE/06	JX669503	10707	2005	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 145/BR-PE/04	145/BR-PE/04	JX669495	10707	2004	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 423/BR-PE/06	423/BR-PE/06	JX669507	10707	2006	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 101905/BR-PE/03	101905/BR-PE/03	JX669489	10709	2003	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 283/BR-PE/05	283/BR-PE/05	JX669502	10705	2005	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 263/BR-PE/05	263/BR-PE/05	JX669501	10707	2005	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 161/BR-PE/04	161/BR-PE/04	JX669499	10707	2004	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 255/BR-PE/05	255/BR-PE/05	JX669497	10709	2005	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 129/BR-PE/04	129/BR-PE/04	JX669498	10707	2004	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 339/BR-PE/05	339/BR-PE/05	JX669493	10709	2005	Brasil	Humano
	Dengue virus 3 81257/BR-PE/02	81257/BR-PE/02	JX669491	10708	2002	Brasil	Humano
DENV-4	Dengue virus 4	-	KU513441	10650	2013	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 BR005AM_2011	BR005AM_2011	KT794007	10649	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 Br246RR/10	Br246RR/10	JN983813	10649	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV4- 2_BE_H_403714	DENV4-2_BE_H_403714	OK605768	10649	1982	Brasil	Humano

	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR20_TVP17906/2012	DENV-4/MT/BR20_TVP17906/2012	KJ579244	10649	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR91_TVP17968/2012	DENV-4/MT/BR91_TVP17968/2012	KJ596672	10649	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H778494	H778494	JQ513335	10604	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H778887	H778887	JQ513337	10604	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H780556	H780556	JQ513342	10604	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H780571	H780571	JQ513344	10604	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H781363	H781363	JQ513345	10604	2011	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 BR/SJRP/610/2013	BR/SJRP/610/2013	KP188563	10654	2013	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 BR/SJRP/580/2012	BR/SJRP/580/2012	KP188562	10649	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR27_TVP17913/2012	DENV-4/MT/BR27_TVP17913/2012	KJ579247	10650	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR24_TVP17910/2012	DENV-4/MT/BR24_TVP17910/2012	KJ579246	10649	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H775222	H775222	JQ513334	10604	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H772846	H772846	JQ513330	10604	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 H772852	H772852	JQ513331	10604	2010	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR23_TVP17909/2012	DENV-4/MT/BR23_TVP17909/2012	KJ579245	10649	2012	Brasil	Humano
	Dengue virus 4 DENV-4/MT/BR9_TVP17895/2012	DENV-4/MT/BR9_TVP17895/2012	KJ579242	10649	2012	Brasil	Humano
JEV	Japanese encephalitis virus 826309	826309	PP336430	10961	1982	Índia	Humano
	Japanese encephalitis virus Muar	Muar	HM596272	10988	1952	Malásia	Humano
	Japanese encephalitis virus NCCP 43279 variant	NCCP 43279 variant	PP582382	10851	2015	Coréia do Sul	Humano

Japanese encephalitis virus TWN/2022-EV-H0004/2022	TWN/2022-EV-H0004/2022	PQ584053	10965	2022	-	Humano
Japanese encephalitis virus strain VN 113	VN 113	KU705228	10983	1979	Vietnã	Humano
Japanese encephalitis virus Vellore P20778-T	Vellore P20778-T	KT239164	10977	-	Índia	Humano
Japanese encephalitis virus JEV/Taiwan/H10100739/H/2012	JEV/Taiwan/H10100739/H/2012	KF667324	10914	2016	Taiwan	Humano
Japanese encephalitis virus C17	C17	KX945367	10961	2016	Angola	Humano
Japanese encephalitis virus JEV1805M	JEV1805M	MN639770	10988	2018	China	Humano
Japanese encephalitis virus NX1889	NX1889	MT134112	10967	2018	China	Humano
Japanese encephalitis virus NIMH/IND/AS/DBR/19/401C	NIMH/IND/AS/DBR/19/401C	ON379063	10570	2019	Índia	Humano
Japanese encephalitis virus NIMH/IND/AS/DBR/19/759C	NIMH/IND/AS/DBR/19/759C	ON379069	10526	2019	Índia	Humano
Japanese encephalitis virus JEV/Human/NT_Tiwi Islands/2021	JEV/Human/NT_Tiwi Islands/2021	OM867669	10949	2021	Austrália	Humano
Japanese encephalitis virus NIMH/IND/AS/DBR/19/762C	NIMH/IND/AS/DBR/19/762C	ON379070	10849	2019	Índia	Humano
Japanese encephalitis virus NIMH/IND/AS/DBR/19/324S	NIMH/IND/AS/DBR/19/324S	ON379077	10545	2019	Índia	Humano
Japanese encephalitis virus CNS138/9 JEV-M	CNS138/9 JEV-M	PV210295	10963	1999	Malásia	Humano
Japanese encephalitis virus CNS138/9 JEV-V	CNS138/9 JEV-V	PV210294	10963	1999	Malásia	Humano

	Japanese encephalitis virus VIDRL03/VIC/22	VIDRL03/VIC/22	PV666603	10771	2022	Austrália	Humano
	Japanese encephalitis virus JEV001/NSW/22	JEV001/NSW/22	PV666574	10231	2022	Austrália	Humano
	Japanese encephalitis virus MBC134	MBC134	PP057999	10289	2018	Espanha	-
ROCV	Rocio virus	-	LF621703	397	-	-	Patente
	Rocio virus	-	DI450456	397	-	-	Patente
	Rocio virus	-	HW822071	397	-	-	Patente
	Rocio virus	-	JC303442	397	-	-	Patente
	Rocio virus	-	LG018117	397	-	-	Patente
	Rocio virus	-	AF372409	397	-	-	Patente
	Rocio virus H-34675	H-34675	AF013397	1035	-	-	-
	Rocio virus SPH 34675	SPH 34675	NC_040776	10794	-	-	-
	Rocio virus SPH 34675	SPH 34675	AY632542	10794	-	-	-
	Rocio virus SpH 34675	SpH 34675	AY498851	550	-	Brasil	-
	Rocio virus SPAn 37630	SPAn 37630	AY739902	816	-	Brasil	-
	Rocio virus SPH 37623	SPH 37623	AY739903	816	-	Brasil	-
	Rocio virus SPH 37623	SPH 37623	AY739905	864	-	Brasil	-
	Rocio virus SPAn 37630	SPAn 37630	AY739904	864	-	Brasil	-
	Rocio virus SP H 34675	SP H 34675	AF246795	274	-	Brasil	-
	Rocio virus SPH 34675	SPH 34675	MF461639	10794	-	Brasil	Humano
	Rocio virus SPH 34675	SPH 34675	EU074009	232	-	Brasil	-
	Rocio virus GYN/2022/human	GYN/2022/human	MW446949	776	2012	Brasil	Humano
	Rocio virus	Rocio virus	MT891158	779	-	Brasil	Humano
	Rocio virus	Rocio virus	MT891159	189	-	Brasil	Humano

SLEV	Saint Louis encephalitis virus USA/CA/2016/human/UC-1	USA/CA/2016/human/UC-1	KY825743	10834	2016	Estados Unidos	Humano
	Saint Louis encephalitis virus FLU3632	FLU3632	KF589299	10839	2006	Peru	Humano
	Saint Louis encephalitis virus SLEV/GIII/BuenosAires/Arg/001/20 13	SLEV/GIII/BuenosAires/Arg/001/2013	MN413675	10710	2013	Argentina	Humano
	Saint Louis encephalitis virus BeH355964	BeH355964	KM267635	10892	1978	Brasil	Humano
	Saint Louis encephalitis virus 3488	3488	MW074966	10290	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus 3489	3489	MW074967	10290	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus 6206	6206	MW075050	10290	2018	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus 6162	6162	MW075051	10290	2018	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus 5652	5652	MW075052	10290	2018	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus IMPR570	IMPR570	MN233313	10349	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus KERN245	KERN245	MN233314	10408	2018	Estados Unidos	Mosquito
Saint Louis encephalitis virus Palenque-A770		Palenque-A770	JQ957869	10938	2008	México	Mosquito

	Saint Louis encephalitis virus COAV3064	COAV3064	MN233308	10316	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus tOGHz32t	tOGHz32t	MW075036	10290	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus 6qGt3unV	6qGt3unV	MW075037	10290	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus DozoGzzF	DozoGzzF	MW075042	10290	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus FRWS650	FRWS650	MN233310	10317	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus DLNO229	DLNO229	MN233309	10392	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus BUCO327	BUCO327	MN233307	10345	2017	Estados Unidos	Mosquito
	Saint Louis encephalitis virus RT280	RT280	MN233306	10430	2017	Estados Unidos	Mosquito
WNV	West Nile virus 1	1	DQ164198	11029	2002	Estados Unidos	Humano
	West Nile virus 2	2	DQ164205	11029	2002	Estados Unidos	Humano
	West Nile virus	-	DQ164199	11029	2003	Estados Unidos	Humano
	West Nile virus ARC1-12	ARC1-12	KM012184	11029	2012	Estados Unidos	Humano
	West Nile virus ARC3-12	ARC3-12	KM012185	11029	2012	Estados Unidos	Humano

West Nile virus ARC6-12	ARC6-12	KM012187	11029	2012	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL4-11	BSL4-11	JQ700438	11016	2011	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL08-12	BSL08-12	KM012171	11029	2012	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL08-13	BSL08-13	OK573267	10901	-	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL24-11	BSL24-11	JQ700441	11029	2011	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL26-11	BSL26-11	JQ700442	11029	2011	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL40-12	BSL40-12	OK573279	11071	-	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL42-12	BSL42-12	OK573278	11054	-	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL53-12	BSL53-12	KM012172	11029	2012	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL107-12	BSL107-12	KM012178	11029	2012	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL140-12	BSL140-12	KM012180	11029	2012	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL145-12	BSL145-12	OK573270	10871	-	Estados Unidos	Humano
West Nile virus BSL221-12	BSL221-12	OK573269	11046	-	Estados Unidos	Humano

	West Nile virus NY2001-6263	NY2001-6263	KJ786934	11026	2001	Estados Unidos	Humano
	West Nile virus BSL178-12	BSL178-12	KM012181	11029	2012	Estados Unidos	Humano
	Yellow fever virus PR6021-2017	PR6021-2017	OP508715	10802	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus H326	H326	MN643085	10689	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus H333	H333	MN643087	11007	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus H320	H320	MN643084	11007	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus SP25/BRA/2019	SP25/BRA/2019	MZ604857	10850	2019	Brasil	Humano
	Yellow fever virus es-2487	es-2487	MF170970	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus 3925	3925	MF170968	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus rj1930	rj1930	MF170969	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus YFV003FIG	YFV003FIG	MK583147	10946	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus YFV072FIG	YFV072FIG	MK583178	10945	2018	Brasil	Humano
YFV	Yellow fever virus YFV048FIG	YFV048FIG	MK583168	10993	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus YFV041FIG	YFV041FIG	MK583164	10999	2018	Brasil	Humano
	Yellow fever virus 282	282	MF170976	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus 1555	1555	MF170975	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus 3919	3919	MF170973	10236	2017	Brasil	Humano
	Yellow fever virus hYFV/Brazil/SP-IAL-810/2023	hYFV/Brazil/SP-IAL-810/2023	OR052147	10760	2023	Brasil	Humano
	Yellow fever vírus YFV/LEIAL4888/BRA/2025	YFV/LEIAL4888/BRA/2025	PV563867	10858	2025	Brasil	Humano
	Yellow fever vírus YFV/LEIAL4889/BRA/2025	YFV/LEIAL4889/BRA/2025	PV563868	10858	2025	Brasil	Humano

	Yellow fever virus YFV/LEIAL4884/BRA/2025	YFV/LEIAL4884/BRA/2025	PV563865	10858	2025	Brasil	Humano
	Yellow fever virus YFV/LEIAL4887/BRA/2025	YFV/LEIAL4887/BRA/2025	PV563866	10858	2025	Brasil	Humano
	Zika virus Paraiba_01	Paraiba_01	KX280026	10807	2015	Brasil	Humano
	Zika virus ZIKV_P17_C	ZIKV_P17_C	MW123922	10639	2016	Brasil	Humano
	Zika virus ZIKV_P17_H	ZIKV_P17_H	MW123923	10651	2016	Brasil	Humano
	Zika virus ZikaSPH2015	ZikaSPH2015	KU321639	10676	2015	Brasil	Humano
	Zika virus BeH815744	BeH815744	KU365780	10662	2015	Brasil	Humano
	Zika virus BeH819966	BeH819966	KU365779	10662	2015	Brasil	Humano
	Zika virus Natal RGN	Natal RGN	KU527068	10808	2015	Brasil	Humano
	Zika virus 15261	15261	MF073358	10807	2015	Brasil	Humano
	Zika virus 15098	15098	MF073359	10807	2015	Brasil	Humano
	Zika virus 20120F1/BrazilGO/2015	20120F1/BrazilGO/2015	OQ338852	10672	2015	Brasil	Humano
ZIKV	Zika virus ZIKV/Homo_sapiens/Brazil/2016/ZB RY1	ZIKV/Homo_sapiens/Brazil/2016/ZBRY 1	KY559025	10010	2016	Brasil	Humano
	Zika virus BR_SJRP1840	BR_SJRP1840	KY441403	10623	2016	Brasil	Humano
	Zika virus Zika virus/H.sapiens wt/BRA/2016/FC-DQ42D1-URI	Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/FC- DQ42D1-URI	KY014320	10751	2016	Brasil	Humano
	Zika virus Zika virus/H.sapiens- wt/BRA/2016/FC-DQ28D1-URI	Zika virus/H.sapiens-wt/BRA/2016/FC- DQ28D1-URI	KY014317	10752	2016	Brasil	Humano
	Zika virus RIO-BM1	RIO-BM1	KY272991	10807	2016	Brasil	Humano
	Zika virus 20408F1/BrazilGO/2016	20408F1/BrazilGO/2016	OQ338853	10693	2016	Brasil	Humano
	Zika virus 17829	17829	KR872956	10727	2015	Brasil	Humano
	Zika virus GO56	GO56	OL423663	10385	2018	Brasil	Humano

Zika virus 1609_16	1609_16	MT439642	10627	2016	Brasil	Humano
Zika virus 2012_16	2012_16	MT439644	10627	2016	Brasil	Humano

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica dados não informados pelos autores.

**APÊNDICE B – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS *Alphavirus***

Vírus	Nome	Cepa	Número do acesso	Tamanho (pB)	Ano	País de isolamento	Hospedeiro
CHIKV	Chikungunya virus CHKV_Brazil/SP/IAL/NS10096/2021	CHKV_Brazil/SP/IAL/NS10096/2021	OL898708	11675	2021	Brasil	Humano
	Chikungunya virus MT06	MT06	MH823668	11811	2017	Brasil	Humano
	Chikungunya virus 7C	7C	MH000705	11362	2016	Brasil	Humano
	Chikungunya virus CHIKV-23 08288/2019	CHIKV-23 08288/2019	MT933051	11193	2019	Brasil	Humano
	Chikungunya virus FV01	FV01	MK993756	11704	2016	Brasil	Humano
	Chikungunya virus FV02	FV02	MK993757	11719	2016	Brasil	Humano
	Chikungunya virus P83	P83	OP964989	10946	2022	Brasil	Humano
	Chikungunya virus P22	P22	OP964951	10946	2022	Brasil	Humano
	Chikungunya virus CHKV_Brazil/SP/IAL/NGS_659H/2023	CHKV_Brazil/SP/IAL/NGS_659H/2023	OR064030	11237	2023	Brasil	Humano
	Chikungunya virus RNA48713	RNA48713	OQ616994	11442	2022	Brasil	Humano
CHIKV CHIKV MG 270-22-RED 2022-02-04 270-22-RED 2022-02-04	Chikungunya virus CHKV_8	CHKV_8	OQ616991	11393	2023	Brasil	Humano
	Chikungunya virus CHIKV CHIKV MG 270-22-RED 2021-12-13 25-22-RED 2021-12-13	CHIKV CHIKV MG 270-22-RED 2021-12-13 25-22-RED 2021-12-13	OQ759835	11176	2022	Brasil	Humano
	Chikungunya virus CHIKV CHIKV MG 25-22-RED 2021-12-13 25-22-RED 2021-12-13	CHIKV CHIKV MG 25-22-RED 2021-12-13 25-22-RED 2021-12-13	OQ759836	11177	2021	Brasil	Humano

	Chikungunya virus						
	CHIKV CHIKV BA BC42 2022-04-28 BC42 2022-04-28	CHIKV BA BC42 2022-04-28	OQ759696	11140	2022	Brasil	Humano
	Chikungunya virus						
	CHIKV CHIKV MG 571-22-RED 2022-03-03 571-22-RED 2022-03-03	CHIKV MG 571-22-RED 2022-03-03	OQ759837	11224	2022	Brasil	Humano
	Chikungunya virus Coxipo	Coxipo	OK562600	11848	2018	Brasil	Humano
	Chikungunya virus HGU	HGU	OK562599	11794	2018	Brasil	Humano
	Chikungunya virus #19S	#19S	PP336998	10924	2019	Brasil	Humano
	Chikungunya virus #196	#196	PP337000	10924	2019	Brasil	Humano
	Chikungunya virus CX9MJNS22	CX9MJNS22	PP681186	11787	2022	Brasil	Humano
EEEV	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientB-MB-2004-MA	EEEV_PatientB-MB-2004-MA	OQ709267	11624	2004	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientB-T-MA-2004	EEEV_PatientB-T-MA-2004	OQ709269	11598	2004	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientB-SC-2004-MA	EEEV_PatientB-SC-2004-MA	OQ709268	11596	2004	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus EEEV/Homo sapiens/USA/RICHE/1951	EEEV/Homo sapiens/USA/RICHE/1951	KJ469603	11697	1951	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientA-B-1938-MA	EEEV_PatientA-B-1938-MA	OQ709265	11606	1938	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus Decuir	Decuir	KU059747	11711	1947	Estados Unidos	Humano

Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientE-MB-2019-MA	EEEV_PatientE-MB-2019-MA	OQ709277	11647	2019	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientD-SC-2012-MA	EEEV_PatientD-SC-2012-MA	OQ709274	11438	2012	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientC-TL-2004-MA	EEEV_PatientC-TL-2004-MA	OQ709270	11588	2004	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV/H.sapiens/USA/V105- 00210/2005	EEEV/H.sapiens/USA/V105- 00210/2005	KP282670	11628	2005	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus Eastern Equine Encephalitis virus/ARG-LL	Eastern Equine Encephalitis virus/ARG-LL	MK028841	11222	-	-	Humano
Eastern equine encephalitis virus Eastern Equine Encephalitis virus/76V- 25343	Eastern Equine Encephalitis virus/76V-25343	MK028842	11414	-	-	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientD-FL-2012-MA	EEEV_PatientD-FL-2012-MA	OQ709272	11627	2012	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV/H.sapiens/USA/R131399b/20 19	EEEV/H.sapiens/USA/R131399b/20 19	MT782295	11694	2019	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV/H.sapiens/USA/R131399a/201 9	EEEV/H.sapiens/USA/R131399a/201 9	MT782294	11704	2019	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV/Homo sapiens/USA/VEL0900006201/2009	EEEV/Homo sapiens/USA/VEL0900006201/2009	KX000164	11679	2009	Estados Unidos	Humano
Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientE-T-2019-MA	EEEV_PatientE-T-2019-MA	OQ709279	11578	2019	Estados Unidos	Humano

	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientD-MB-2012-MA	EEEV_PatientD-MB-2012-MA	OQ709273	11622	2012	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus EEEV_PatientF-H-2020-MA	EEEV_PatientF-H-2020-MA	OQ709280	11549	2020	Estados Unidos	Humano
	Eastern equine encephalitis virus R135167b	R135167b	OR988088	11681	2023	Estados Unidos	Humano
MAYV	Mayaro virus BeAr20290	BeAr20290	KT754168	11226	1960	Brasil	Mosquito
	Mayaro virus BeAr757954	BeAr757954	KY618130	11550	2011	Brasil	Mosquito
	Mayaro virus BeH744141	BeH744141	KY618137	11381	2008	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH744173	BeH744173	KY618138	11381	2008	Brasil	Humano
	Mayaro virus IQU2950	IQU2950	MK573243	11206	2000	Peru	Humano
	Mayaro virus IQT4235	IQT4235	MK070491	11413	1997	Peru	Humano
	Mayaro virus Homo sapiens/Venezuela-1/2016	Homo sapiens/Venezuela-1/2016	MK288026	11441	2016	Venezuela	Humano
	Mayaro virus OBS2209	OBS2209	MK573242	11206	1995	Peru	Humano
	Mayaro virus BR/SJRP/LPV01/2015	BR/SJRP/LPV01/2015	KT818520	11438	2014	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH343155	BeH343155	MK573244	11206	1978	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH506151	BeH506151	MK573241	11206	1991	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH407	BeH407	MK573238	11224	1955	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH743921	BeH743921	KY618136	11381	2008	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH792430	BeH792430	KY618140	11480	2012	Brasil	Humano
	Mayaro virus BeH758762	BeH758762	KY618139	11365	2009	Brasil	Humano
	Mayaro virus Acre27	Acre27	KM400591	11273	2004	Brasil	Humano
	Mayaro virus BR-18	BR-18	OP628214	11411	2018	Brasil	Humano
	Mayaro virus RR402	RR402	PP339762	10902	2021	Brasil	Humano

	Mayaro virus RR58	RR58	PP339763	11060	2021	Brasil	Humano
	Mayaro virus RR424	RR424	PP339764	11060	2020	Brasil	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 252603/Panama/2013	252603/Panama/2013	OR644782	11443	2013	Panamá	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 8131	8131	DQ390224	11412	-	Peru	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 258263 F1/Panama/2015	258263 F1/Panama/2015	OR644784	11444	2015	Panamá	Mosquito
	Venezuelan equine encephalitis virus Peru_4856	Peru_4856	PQ513527	11448	2021	-	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus Peru_3350	Peru_3350	PP700505	11444	2020	-	Humano
VEEV	Venezuelan equine encephalitis virus E1/68	E1/68	KU059754	11518	1968	Venezuela	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 247427/Panama/2010	247427/Panama/2010	OR644807	11446	2010	Panamá	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 278697/Panama/2022	278697/Panama/2022	OR644789	11427	2022	Panamá	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus 258379/Panama/2015	258379/Panama/2015	OR644785	11442	2015	Panamá	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PAN/485029/2001/ID	VEEV/Homo sapiens/PAN/485029/2001/ID	KC344474	11439	2001	Panamá	Humano
	Venezuelan equine encephalitis virus TC-83	TC-83	MZ399798	11446	2017	Estados Unidos	Humano

Venezuelan equine encephalitis virus TC-83	TC-83	MZ399799	11446	2017	Estados Unidos	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo_sapiens/PER/CFI2256/2 013	VEEV/Homo_sapiens/PER/CFI2256/ 2013	MF590066	11412	2013	Peru	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PAN/212857/2003/ID	VEEV/Homo sapiens/PAN/212857/2003/ID	KC344475	11414	2003	Panamá	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PAN/481460/2000/ID	VEEV/Homo sapiens/PAN/481460/2000/ID	KC344510	11419	2000	Panamá	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PAN/484551/2001/ID	VEEV/Homo sapiens/PAN/484551/2001/ID	KC344511	11387	2001	Panamá	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PER/FSE507/2000/ID	VEEV/Homo sapiens/PER/FSE507/2000/ID	KC344522	11412	2000	Peru	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PER/02-2720- 98/1998/ID	VEEV/Homo sapiens/PER/02-2720- 98/1998/ID	KC344504	11174	1998	Peru	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PAN/474590/1997/ID	VEEV/Homo sapiens/PAN/474590/1997/ID	KC344473	11429	1997	Panamá	Humano
Venezuelan equine encephalitis virus VEEV/Homo sapiens/PER/IQT1724/1995/ID	VEEV/Homo sapiens/PER/IQT1724/1995/ID	KC344490	11418	1995	Peru	Humano

WEEV	Western equine encephalitis virus R0PV00384A	R0PV00384A	KJ554991	11476	2005	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus Fleming	Fleming	MN477208	11521	1983	Estados Unidos	Humano
	Western equine encephalitis virus EQ237_2024	EQ237_2024	PP669617	11407	2023	Brasil	Cavalo
	Western equine encephalitis virus EQ1090_2023	EQ1090_2023	PP544260	11418	2023	Brasil	Cavalo
	Western equine encephalitis virus McMillan	McMillan	GQ287640	11510	1941	Canadá	Humano
	Western equine encephalitis virus R7973	R7973	OQ184867	11485	1975	Estados Unidos	Humano
	Western equine encephalitis virus R02PV003422B	R02PV003422B	KJ554990	11482	2005	Estados Unidos	Humano
	Western equine encephalitis virus R02PV001807A	R02PV001807A	KJ554989	11485	2002	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus R02PV002957B	R02PV002957B	KJ554988	11478	2002	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus IMPR441	IMPR441	KJ554978	11485	1992	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus PV02808A	PV02808A	KJ554977	11476	1990	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus Imperial	Imperial	GQ287641	11509	2005	Estados Unidos	Mosquito
	Western equine encephalitis virus PV72102	PV72102	KJ554986	11476	1997	Estados Unidos	Mosquito

Western equine encephalitis virus CNTR34	CNTR34	KJ554984	11486	1993	Estados Unidos	Mosquito
Western equine encephalitis virus Montana-64	Montana-64	GQ287643	11508	1967	Estados Unidos	Cavalo
Western equine encephalitis virus 71V1658	71V1658	GQ287645	11508	1971	Estados Unidos	Cavalo
Western equine encephalitis virus 85- 452NM	85-452NM	GQ287647	11509	1985	Estados Unidos	Mosquito
Western equine encephalitis virus 93A79	93A79	KJ554983	11478	1993	Estados Unidos	Mosquito
Western equine encephalitis virus 93A27	93A27	KJ554981	11486	1992	Estados Unidos	Mosquito
Western equine encephalitis virus AG80-646	AG80-646	NC_075015	11562	1980	Argentina	Mosquito

Fonte: elaborada pelo próprio autor

Nota: O símbolo (-) indica dados não informados pelos autores.

**APÊNDICE C – SEQUÊNCIAS GENÔMICAS *Orthobunyavirus oropoucheense***

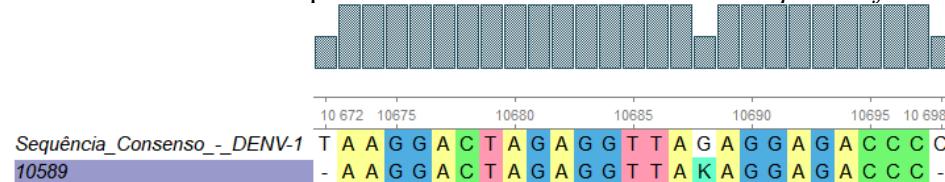
Vírus	Nome	Cepa	Número do acesso	Tamanho	Ano	País de isolamento	Hospedeiro
OROV	Oropouche virus 3436/Brazil/2024	3436/Brazil/2024	PQ381540	674	2024	Brasil	Humano
	Oropouche virus 3489/Brazil/2024	3489/Brazil/2024	PQ381541	669	2024	Brasil	Humano
	Oropouche virus 4431/Brazil/2024	4431/Brazil/2024	PQ381560	690	2024	Brasil	Humano
	Oropouche virus BeAn19991	BeAn19991	KP052852	958	1960	Brasil	Preguiça-de-três-dedos
	Oropouche virus BeH 504514	BeH 504514	PQ801464	946	1991	Brasil	Humano
	Oropouche virus BeH505764	BeH505764	PP357050	946	1991	Brasil	Humano
	Oropouche virus BeH759529	BeH759529	KP691620	946	2009	Brasil	Humano
	Oropouche virus LACENAM_ILMD_3022FSM	LACENAM_ILMD_3022FSM	PP154044	824	2023	Brasil	Humano
	Oropouche virus BrSa16007	BrSa16007	MG591459	653	2017	Brasil	Humano
	Oropouche virus ILMD_TF29	ILMD_TF29	PP154170	944	2015	Brasil	Humano
	Oropouche virus LACENAC_ILMD_0093	LACENAC_ILMD_0093	PP154167	824	2023	Brasil	Humano
	Oropouche virus LACENAC_ILMD_0096	LACENAC_ILMD_0096	PP154164	823	2023	Brasil	Humano
	Oropouche virus LACENAM_ILMD_0160ISS	LACENAM_ILMD_0160ISS	PP154134	823	2023	Brasil	Humano
	Oropouche virus LACENAM_ILMD_0165GAS	LACENAM_ILMD_0165GAS	PP154131	822	2023	Brasil	Humano

Oropouche virus LACENAM_ILMD_2068TNM	LACENAM_ILMD_2068TNM	PP154128	824	2022	Brasil	Humano
Oropouche virus LACENRR_ILMD_0628MJG	LACENRR_ILMD_0628MJG	PP153981	823	2022	Brasil	Humano
Oropouche virus LVM_ILMD_ZCD067	LVM_ILMD_ZCD067	PP153977	823	2022	Brasil	Humano
Oropouche virus LVM_ILMD_ZCD103	LVM_ILMD_ZCD103	PP153975	824	2023	Brasil	Humano
Oropouche virus LVM_ILMD_ZCD123	LVM_ILMD_ZCD123	PP153966	823	2023	Brasil	Humano
Oropouche virus PMOH 682431	PMOH 682431	MG747590	948	2004	Brasil	Humano

Fonte: elaborada pelo próprio autor

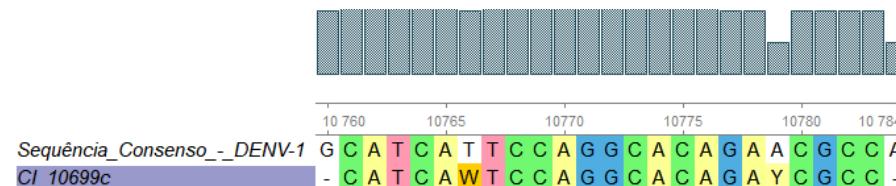
## APÊNDICE D – ALINHAMENTO DENV-1 COM PRIMERS E SONDAS

**Figura IX** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-1 com o *primer forward* 10589



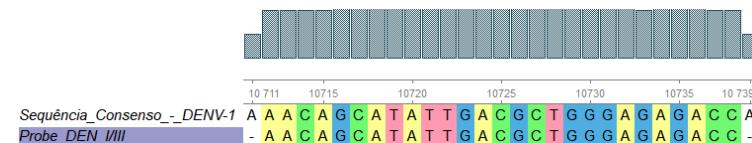
Fonte: Unipro UGENE

**Figura X** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-1 com o *primer reverse* 10699c



Fonte: Unipro UGENE

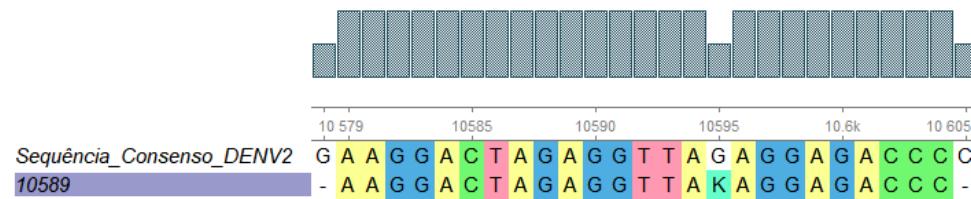
**Figura XI** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-1 com a sonda *Probe DEN I/III*



Fonte: Unipro UGENE

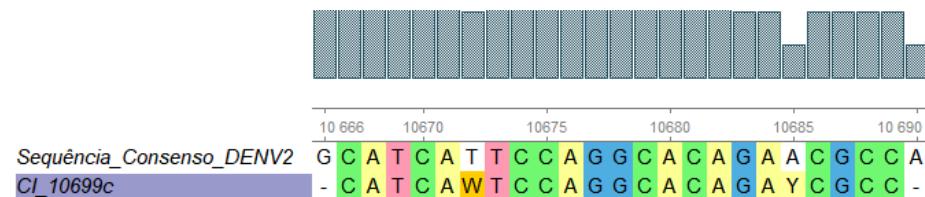
## APÊNDICE E – ALINHAMENTO DENV-2 COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XII** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-2 com o *primer forward* 10589



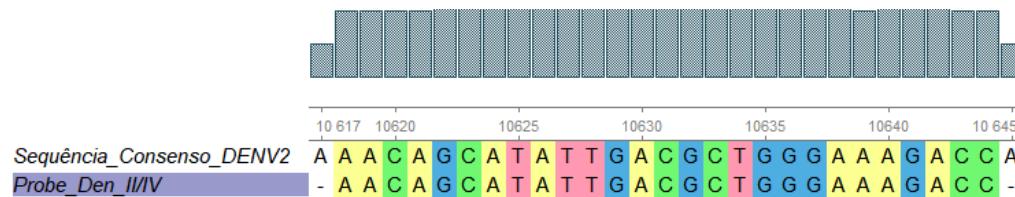
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XIII** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-2 com o *primer reverse* 10699c



Fonte: Unipro UGENE

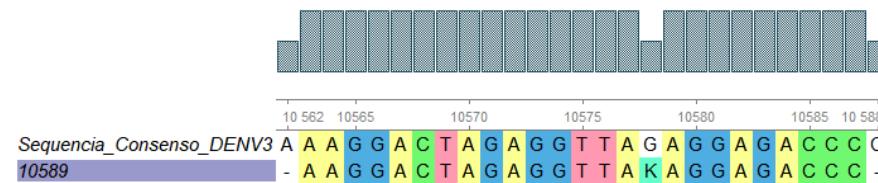
**Figura XIV** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-2 com a sonda *Probe DEN II/IV*



Fonte: Unipro UGENE

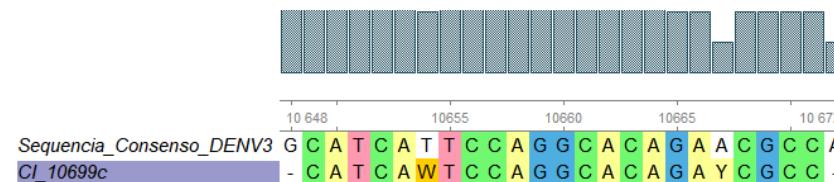
## APÊNDICE F – ALINHAMENTO DENV-3 COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XV** - Alinhamento da sequência consenso de DENV-3 com o *primer forward* 10589



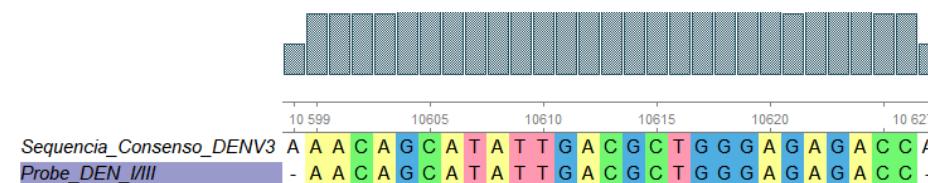
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XVI** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-3 com o *primer reverse* 10699c



Fonte: Unipro UGENE

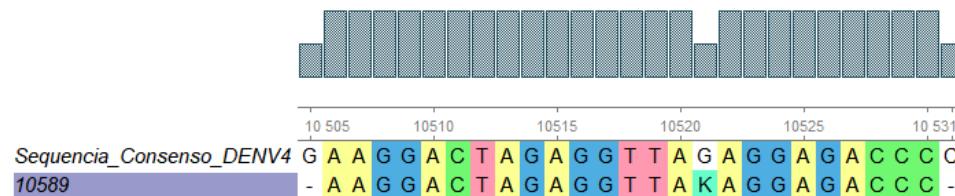
**Figura XVII** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-3 com a sonda *Probe DEN I/III*



Fonte: Unipro UGENE

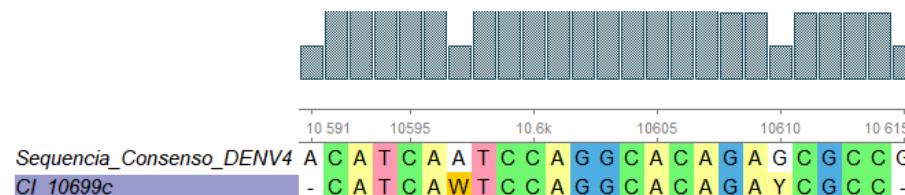
## APÊNDICE G – ALINHAMENTO DENV-4 COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XVIII** - Alinhamento da sequência consenso de DENV-4 com o *primer forward* 10589



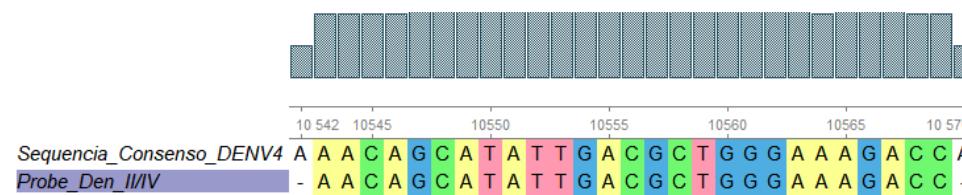
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XIX** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-4 com o *primer reverse* 10699c



Fonte: Unipro UGENE

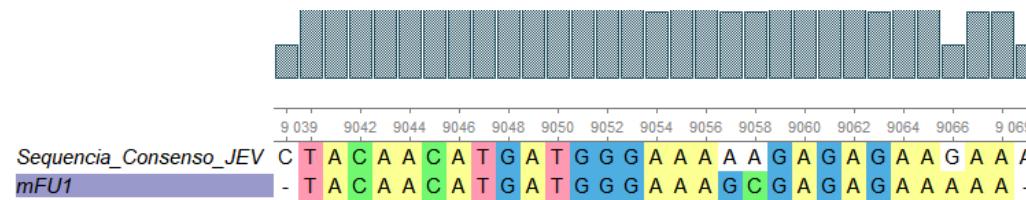
**Figura XX** – Alinhamento da sequência consenso de DENV-4 com a sonda *Probe DEN II/IV*



Fonte: Unipro UGENE

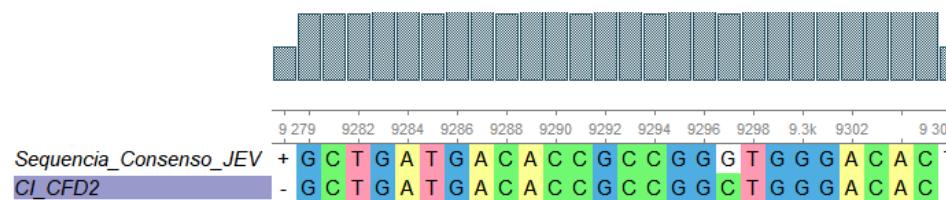
## APÊNDICE H – ALINHAMENTO JEV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XXI** - Alinhamento da sequência consenso de JEV com o *primer forward* mFUI.



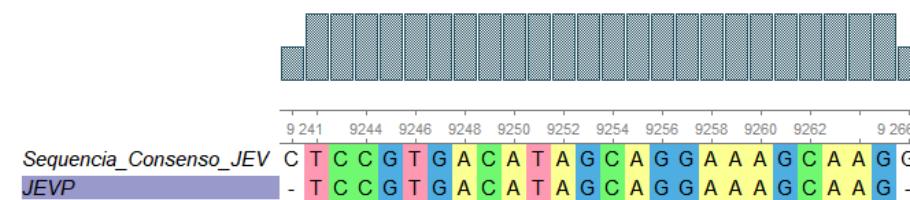
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXII** – Alinhamento da sequência consenso de JEV com o *primer reverse* CFD2.



Fonte: Unipro UGENE

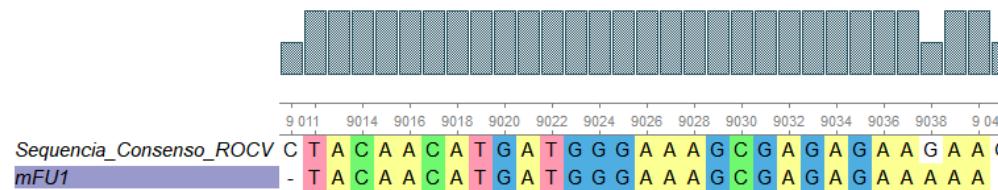
**Figura XXIII** – Alinhamento da sequência consenso de JEV com a sonda JEV-P.



Fonte: Unipro UGENE

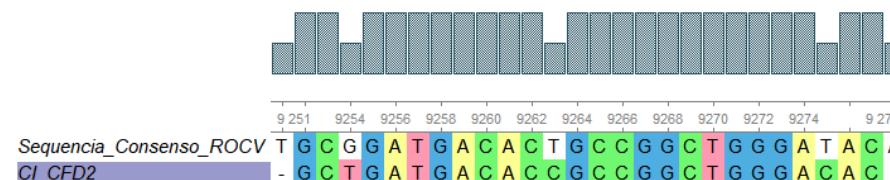
## APÊNDICE I – ALINHAMENTO ROCV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XXIV** - Alinhamento da sequência consenso de ROCV com o *primer forward* mFU1



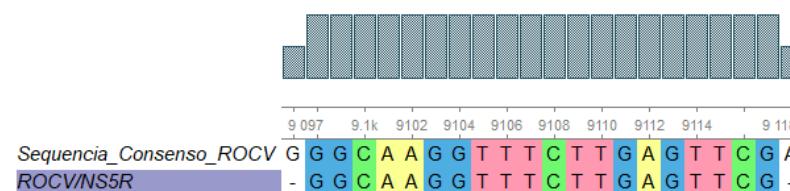
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXV** - Alinhamento da sequência consenso de ROCV com o *primer reverse* CFD2



Fonte: Unipro UGENE

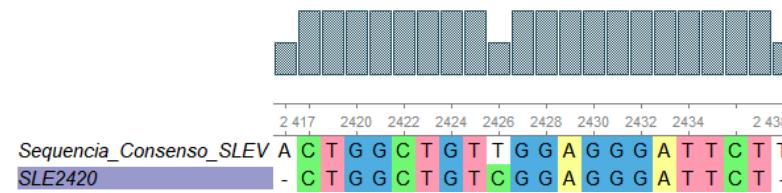
**Figura XXVI** – Alinhamento da sequência consenso de ROCV com a sonda ROCV/NS5R



Fonte: Unipro UGENE

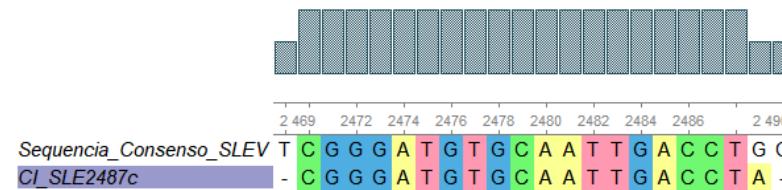
## APÊNDICE J – ALINHAMENTO SLEV COM *PRIMERS* E SONDAS

**Figura XXVII** - Alinhamento da sequência consenso de SLEV com o *primer forward* SLE2420



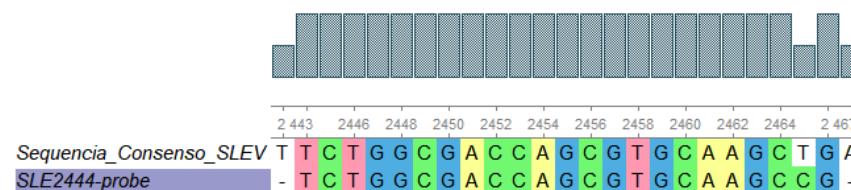
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXVIII** - Alinhamento da sequência consenso de SLEV com o *primer reverse* SLE2487c



Fonte: Unipro UGENE

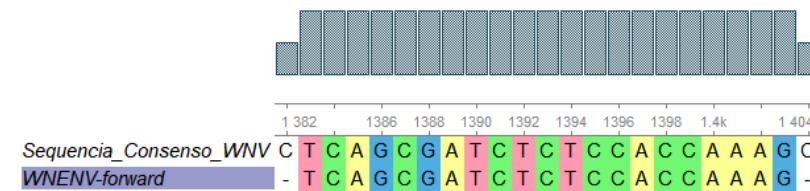
**Figura XXIX** - Alinhamento da sequência consenso de SLEV com a sonda SLE444-probe



Fonte: Unipro UGENE

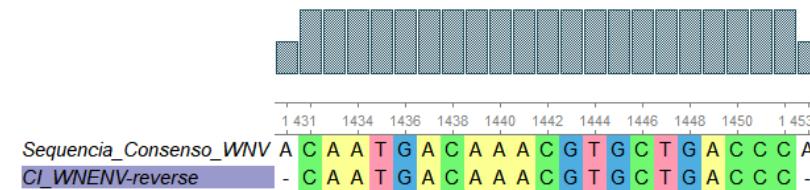
## APÊNDICE K – ALINHAMENTO WNV COM *PRIMERS* E SONDAS

**Figura XXX** - Alinhamento da sequência consenso de WNV com o *primer forward* WNENV-forward



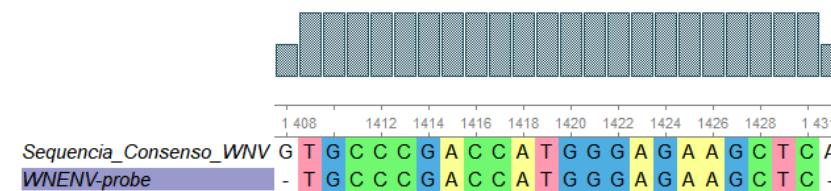
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXXI** - Alinhamento da sequência consenso de WNV com o *primer reverse* WNENV-reverse



Fonte: Unipro UGENE

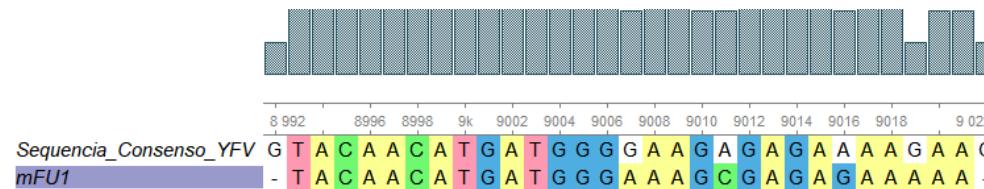
**Figura XXXII** - Alinhamento da sequência consenso de WNV com a sonda WNENV-probe



Fonte: Unipro UGENE

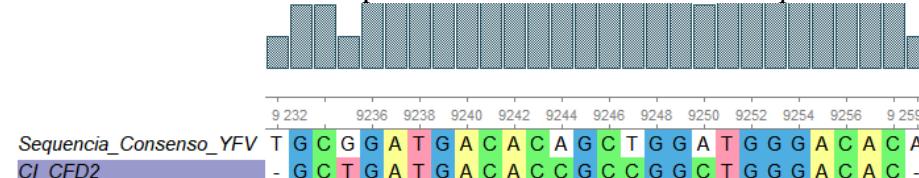
## APÊNDICE L – ALINHAMENTO YFV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XXXIII** - Alinhamento da sequência consenso de YFV com o *primer forward* mFU1



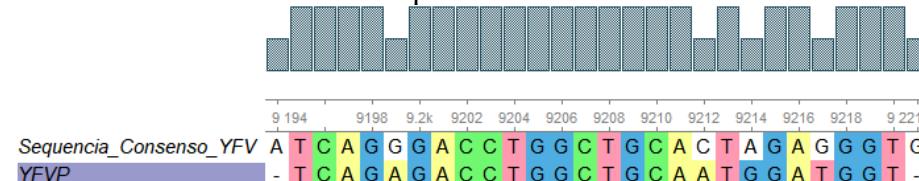
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXXIV** - Alinhamento da sequência consenso de YFV com o *primer reverse* CFD2



Fonte: Unipro UGENE

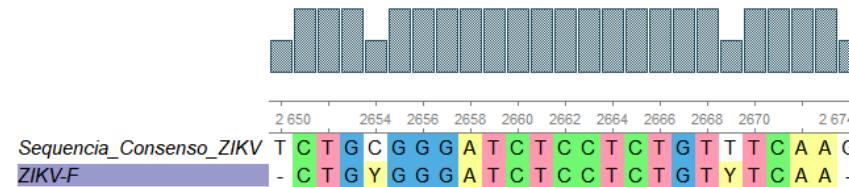
**Figura XXXV** - Alinhamento da sequência consenso de YFV com a sonda YFVP



Fonte: Unipro UGENE

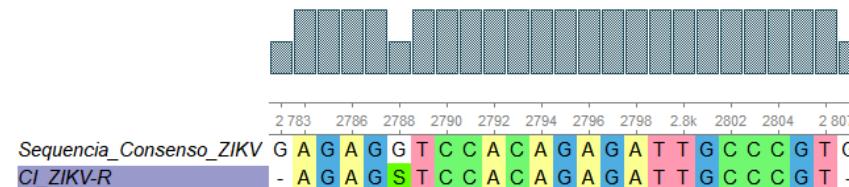
## APÊNDICE M – ALINHAMENTO ZIKV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XXXVI** - Alinhamento da sequência consenso de ZIKV com o *primer forward* ZIKV-F



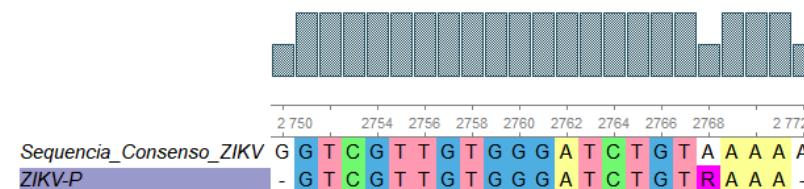
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XXXVII** - Alinhamento da sequência consenso de ZIKV com o *primer reverse* ZIKV-R



Fonte: Unipro UGENE

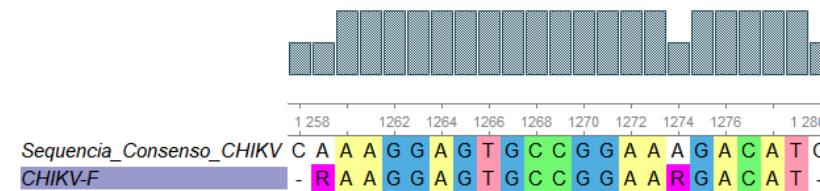
**Figura XXXVIII** - Alinhamento da sequência consenso de ZIKV com a sonda ZIKV-P



Fonte: Unipro UGENE

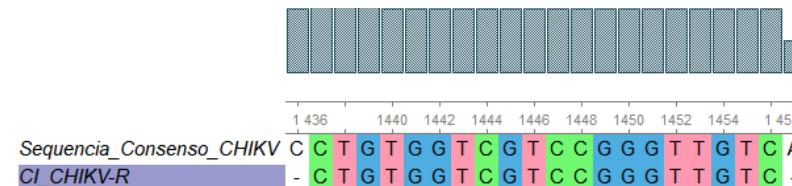
## APÊNDICE N – ALINHAMENTO CHIKV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XXXIX** - Alinhamento da sequência consenso de CHIKV com o *primer forward* CHIKV-F



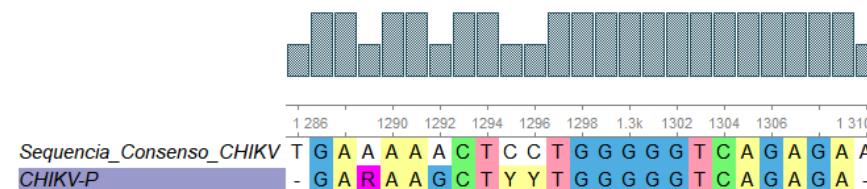
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XL** - Alinhamento da sequência consenso de CHIKV com o *primer reverse* CHIKV-R



Fonte: Unipro UGENE

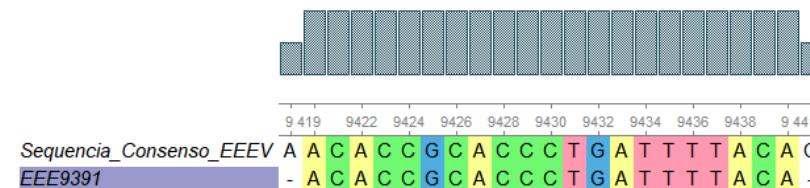
**Figura XLI** - Alinhamento da sequência consenso de CHIKV com a sonda CHIKV-P



Fonte: Unipro UGENE

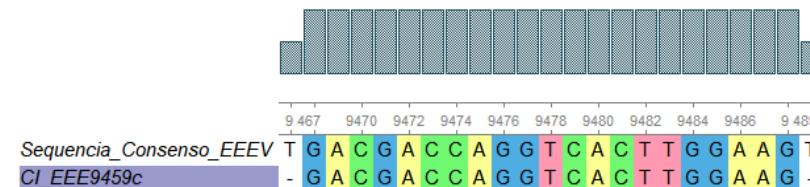
## APÊNDICE O – ALINHAMENTO EEEV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XLII** - Alinhamento da sequência consenso de EEEV com o *primer forward* EEE9391



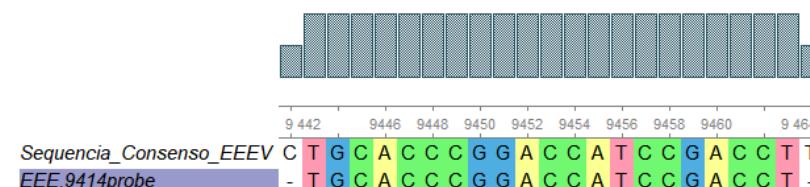
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XLIII** - Alinhamento da sequência consenso de EEEV com o *primer reverse* EEE9459c



Fonte: Unipro UGENE

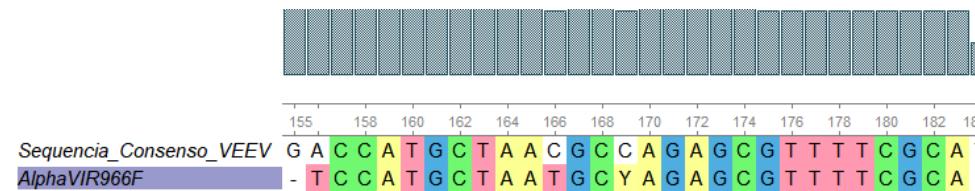
**Figura XLIV** - Alinhamento da sequência consenso de EEEV com a sonda EEE.9414probe



Fonte: Unipro UGENE

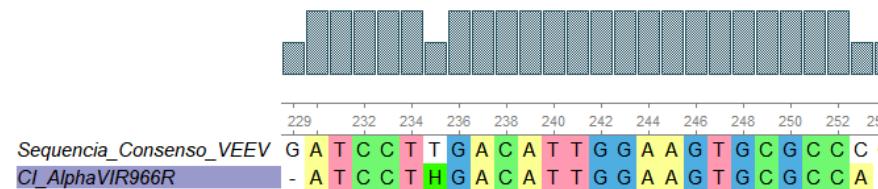
## APÊNDICE P – ALINHAMENTO VEEV COM *PRIMERS* E SONDAS

**Figura XLV** - Alinhamento da sequência consenso de VEEV com o *primer forward* AlphaVIR966F



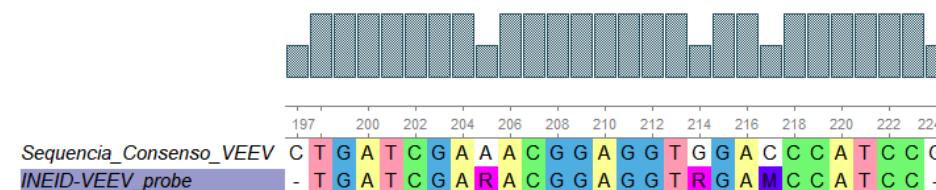
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XLVI** - Alinhamento da sequência consenso de VEEV com o *primer reverse* AlphaVIR966R



Fonte: Unipro UGENE

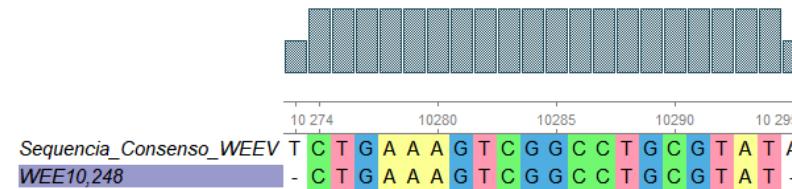
**Figura XLVII** - Alinhamento da sequência consenso de VEEV com a sonda INEID-VEEV\_probe



Fonte: Unipro UGENE

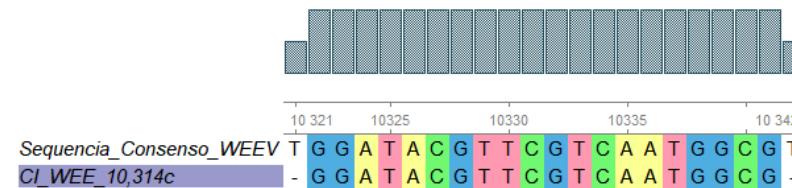
## APÊNDICE Q – ALINHAMENTO WEEV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura XLVIII** - Alinhamento da sequência consenso de WEEV com o *primer forward* WEE10,248



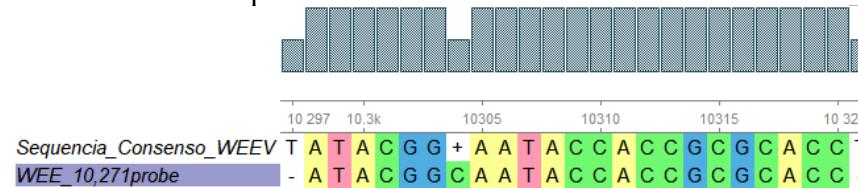
Fonte: Unipro UGENE

**Figura XLIX** - Alinhamento da sequência consenso de WEEV com o *primer reverse* WEE\_10,314c



Fonte: Unipro UGENE

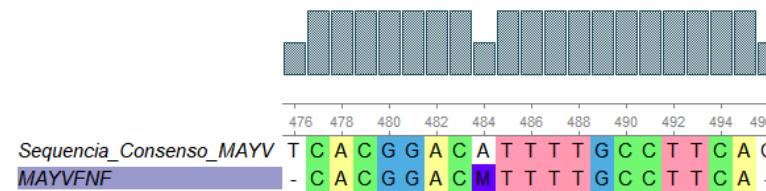
**Figura L** - Alinhamento da sequência consenso de WEEV com a sonda WEE\_10,271probe



Fonte: Unipro UGENE

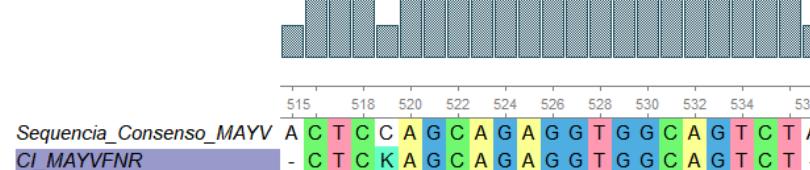
## APÊNDICE R – ALINHAMENTO MAYV COM PRIMERS E SONDAS

**Figura LI** - Alinhamento da sequência consenso de MAYV com o *primer forward* MAYVFNF



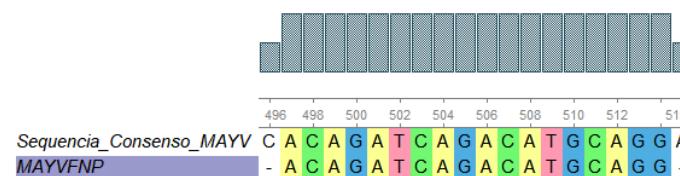
Fonte: Unipro UGENE

**Figura LII** - Alinhamento da sequência consenso de MAYV com o *primer reverse* MAYVFNR



Fonte: Unipro UGENE

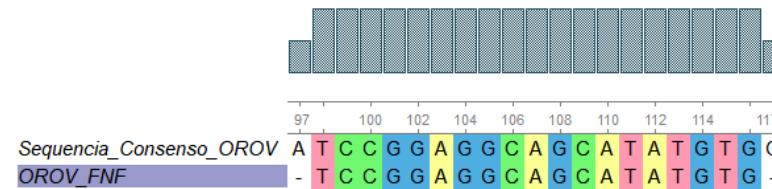
**Figura LIII** - Alinhamento da sequência consenso de MAYV com a sonda MAYVFNP



Fonte: Unipro UGENE

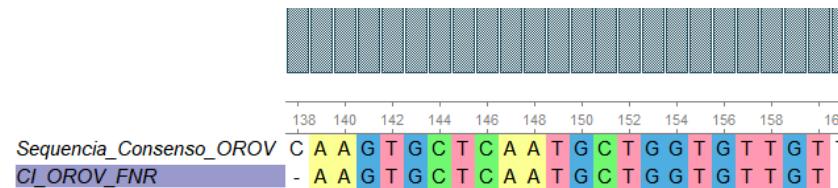
## APÊNDICE S – ALINHAMENTO OROV COM *PRIMERS* E SONDAS

**Figura LIV** - Alinhamento da sequência consenso de OROV com o *primer forward* OROV\_FNF



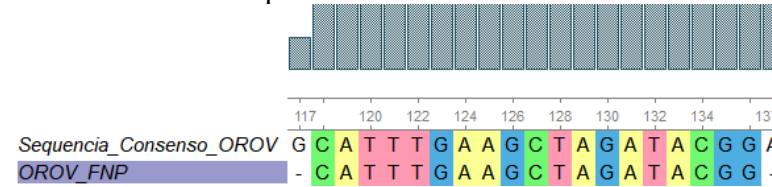
Fonte: Unipro UGENE

**Figura LV** - Alinhamento da sequência consenso de OROV com o *primer reverse* OROV\_FNR



Fonte: Unipro UGENE

**Figura LVI** - Alinhamento da sequência consenso de OROV com a sonda OROV\_FNP



Fonte: Unipro UGENE