

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
CENTRO DE PESQUISA EM VIROLOGIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA MOLECULAR

MICHELLI ROMANOLI PERSONA

**Estudo comparativo entre testes sorológicos para o diagnóstico específico da
infecção pelo vírus zika**

Ribeirão Preto

2018

MICHELLI ROMANOLI PERSONA

**Estudo comparativo entre testes sorológico para diagnóstico específico da
infecção pelo vírus zika**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Persona, Michelli Romanoli

Estudo comparativo entre testes sorológico para diagnóstico específico da infecção pelo vírus zika. Ribeirão Preto, 2018.

45 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica médica.

Orientador: Benedito Antônio Lopes da Fonseca

1. Zika vírus (ZIKV). 2. Reação cruzada. 3. Diagnóstico

Nome: PERSONA, Michelli Romanoli

Título: Estudo comparativo entre testes sorológico para diagnóstico específico da infecção pelo vírus zika

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter provido a oportunidade, junto ao aprendizado, durante esta fase.

Agradeço aos meus pais, Claudio Luiz Persona e Rosélia Valim Romanoli Persona, pelo integral apoio, compreensão e carinho.

Agradeço ao João Galharde por ter me apresentado ao Laboratório de Virologia Molecular.

Agradeço ao Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca por ter possibilitado meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada, professor, especialmente pelo amparo que me forneceu em 2013, que Deus conserve seu coração sempre humanitário.

Agradeço aos companheiros de trabalho do Laboratório de Virologia Molecular, Danillo Lucas Alves Espósito, Beatriz dos Santos Ribeiro, Taline Monteiro Klein, Jonathan Moraes, Flavia Masson de Moraes e Marcela Carolina Pardini Ferreira. Agradeço ao Flávio Lauretti, assim como aos companheiros do Centro de Pesquisa em Virologia, em especial, Talita Bianca Gagliardi.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Por fim agradeço ao Émerson Quirino de Oliveira pelo apoio, amizade e boa vontade que sempre me atendeu.

RESUMO

PERSONA, Michelli Romanoli. **Estudo comparativo entre testes sorológico para diagnóstico específico da infecção pelo vírus zika.** 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Laboratório de Virologia Molecular, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

No Brasil a confirmação do primeiro caso de febre zika, resultante da infecção pelo vírus zika (ZIKV), foi no primeiro semestre de 2015, na região nordeste. Os achados característicos eram de uma doença que apresentava sintomas semelhantes aos sintomas causados pelo vírus dengue (DENV), porém mais amenos, sendo inicialmente denominada de “Síndrome *Dengue-Like*”. Além desta semelhança no quadro clínico, ZIKV e os DENV são arboviroses endêmicas no Brasil e pertencem à mesma família viral, sendo muito próximos filogeneticamente, resultando em uma forte reação cruzada entre os anticorpos induzidos por estas infecções. O diagnóstico específico para o ZIKV requer cuidados uma vez que o DENV circula há muito mais tempo no Brasil e muitas pessoas já são imunes para, no mínimo, um sorotipo da doença. Desta forma, anticorpos contra os DENV nos testes sorológicos podem reagir inespecificamente contra o ZIKV, originando um resultado falso-positivo. As maneiras para diferenciar as duas doenças são o isolamento e a detecção do RNA viral durante a fase aguda da doença e dos anticorpos neutralizantes durante a fase de convalescença. Atualmente com a escassez de testes registrados pela ANVISA e a dificuldade em diferenciar as duas viroses usando testes sorológicos, amostras bem caracterizadas e confirmadas quanto à infecção pelo ZIKV foram utilizadas para o teste de comparação com vários kits comerciais aprovados ou não pela ANVISA, para detecção de anticorpos. Estas amostras também foram testadas por um ensaio soro-molecular padronizado e desenvolvido no Laboratório de Virologia Molecular.

Palavras-chave: Zika vírus (ZIKV). Reação cruzada. Diagnóstico.

ABSTRACT

PERSONA, Michelli Romanoli. **Comparative study between serological testes for the specific diagnosis of zika vírus infection.** 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Laboratório de Virologia Molecular, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

In Brazil, the first case of zika fever, resulting from zika virus (ZIKV) infection, was confirmed in the first half of 2015, in the northeast region. The characteristic findings were of a disease that presented symptoms similar to the symptoms caused by dengue viruses (DENV), but milder, being initially called "Dengue-Like Syndrome". Although this similarity in the clinical presentation, ZIKV and (DENV) are arboviruses endemic in Brazil and belonging to the same viral family, being very close phylogenetically, and resulting in a strong cross-reaction between the antibodies induced by these infections. The specific diagnosis for ZIKV requires careful evaluation since DENV has been circulating much longer in Brazil and many people are already immune to at least one serotype of the disease. Thus, the antibodies against DENV may react non-specifically against ZIKV in serological tests, resulting in a false-positive result. The ways to differentiate the two diseases are the isolation and detection of viral RNA during the acute phase of the disease and the neutralizing antibodies during the convalescent phase. Actually, with the scarcity of tests registered by ANVISA and the difficulty in differentiating the two viruses using serological tests, well-characterized and confirmed samples for ZIKV infection were used for the comparison of several commercial kits for detection of antibodies approved or not by ANVISA. These samples were tested by a standardized serum-molecular assay developed at the Molecular Virology Laboratory.

Keywords: Zika vírus (ZIKV). Cross-reaction. Diagnosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Gerais	14
3.2. Específicos	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Amostras e cepa viral.....	15
4.2. Cultivo celular	15
4.3. Estoque viral	16
4.4. Curva padrão de PFU	16
4.5. Curva de replicação viral	17
4.6. Extração de RNA viral	17
4.7. RT-PCR em tempo real.....	18
4.8. Titulação viral.....	18
4.9. Ensaio de neutralização por redução de placas.....	19
4.10. Ensaio imuno-enzimático – ELISA.....	21
4.11. Ensaio soro-molecular	22
4.12. Testes imunocromatográficos	22
4.13. Teste de sensibilidade e especificidade	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1. Confirmação molecular.....	25
5.2. Titulação viral.....	25
5.3. Curva de replicação viral	26
5.4. Curva padrão de PFU	27
5.5. Classificação das amostras utilizadas.....	28
5.6. Ensaio de neutralização por redução de placas.....	29
5.7. Análise sorológica – ELISA	30
5.8. Testes imunocromatográficos	31
5.9. Ensaio soro-molecular	32
5.10. Teste de sensibilidade e especificidade	33
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	41

1. INTRODUÇÃO

O vírus zika (ZIKV) foi isolado em 1947 na Floresta Ziika, Uganda, durante um projeto de pesquisa usando macacos *Rhesus* como animais sentinelas para o estudo do vírus da Febre Amarela (YFV), e em 1948 foi isolado de mosquitos do gênero *Aedes* (DICK *et al.*, 1952).

O primeiro caso humano descrito foi durante uma epidemia de icterícia na Nigéria em 1954, onde o ZIKV foi isolado de um paciente com suspeita de febre amarela (MACNAMARA, 1954).

Existem alguns casos relatados na Indonésia durante o ano de 1977-1978 em que sete pacientes foram infectados pelo ZIKV. O vírus parecia ter sumido de circulação quando em 2007, na Micronésia, houve um surto da infecção por este vírus que resultou em quarenta e nove pacientes infectados (DUFFY *et al.*, 2009). Em outubro de 2013, ele reapareceu na Polinésia Francesa em uma epidemia onde quase trezentos pacientes foram infectados (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014; OLSON *et al.*, 1981).

No Brasil, não se tem a data exata de introdução do ZIKV. Apesar do primeiro caso da doença ter sido notificado durante o mês de maio de 2015, na região Nordeste do país, há evidências de que o vírus foi introduzido, no final do ano de 2013. Esta teoria é fundamentada pelas análises filogenéticas e a técnica do relógio molecular. A primeira resultou em semelhanças entre o sequenciamento dos ZIKV amostrado no Brasil com a cepa que circulou, no final de 2013, na Polinésia Francesa, enquanto que a segunda possibilitou uma relação entre a taxa de mutação do vírus com o tempo necessário para a divergência da cepa viral. Esta técnica estimou a entrada do vírus no final de 2013, período que apresentou um significativo aumento do número de viajantes oriundos de países afetados pelo vírus. (FARIA *et al.*, 2016; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015).

A doença foi primeiramente notificada como uma doença exantemática caracterizada como uma “Síndrome *Dengue-Like*” devido a semelhança com o quadro clínico característico da dengue (ZANLUCA *et al.*, 2015). Entretanto, em abril desse mesmo ano o ZIKV foi caracterizado como o protagonista dos casos de

doença febril aguda, tendo até o mês de julho de 2016 no Brasil, quase 80 mil casos confirmados e mais de 165 mil casos suspeitos da doença, de acordo com a Organização Pan Americana de Saúde / Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS, 2017).

O ZIKV e o DENV são arbovírus, termo utilizado para vírus que são transmitidos por artrópodes, sendo que no caso destes, são transmitidos por mosquitos hematófagos (FAUCI & MORENS, 2016).

Eles pertencem ao mesmo gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, seus materiais genéticos são compostos por uma simples fita de RNA de polaridade positiva, com o tamanho de aproximadamente 11 kb. Estes vírus possuem elevada propensão para mutações, característica inerente do complexo enzimático RNA polimerase, resultando na variabilidade genética que é vista através da existência dos quatro sorotipos do vírus dengue, DENV-1 a -4 (HOLMES & TWIDDY, 2003). Seus genomas são traduzidos em uma poliproteína que é clivada em sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e três proteínas estruturais, sendo estas: a proteína C (constitui o capsídeo viral que envolve a fita de RNA); a proteína E (formando o envelope que está relacionado com a montagem, ligação, entrada e fusão viral) e a proteína pré-membrana / membrana (o peptídeo prM é uma proteína precursora da membrana que forma um complexo com a proteína E que impede a fusão prematura do vírus com a membrana da célula hospedeira) (HADDOW *et al.*, 2012; HOLMES & TWIDDY *Op.cit.*; UMAREDDY *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2016).

Dentre as proteínas virais mais imunogênicas dos flavivírus estão: a proteína de envelope (E) e as proteínas de membrana (peptídeo prM e M), ambas envolvidas no desencadeamento da resposta imune, tanto para ZIKV quanto para DENV. A glicoproteína de envelope de ambos os vírus é dividida em três domínios importantes para o processo de neutralização e reação cruzada. Para o ZIKV são estes: o domínio I (DI) domínio central da proteína, domínio II (DII) e domínio III (DIII), sendo que todos os domínios apresentam altas afinidades contra diferentes anticorpos específicos. Para o DENV, estudos com camundongos mostraram que entre os domínios I e II existem epítomos que geram reação cruzada moderada entre os sorotipos, mas que é o domínio III que gera neutralização específica, semelhante

ao ZIKV (GUZMAN *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2008; MURREL *et al.*, 2011; SHAWAN *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2011; ZHAO *Op. cit.*).

Um dos mecanismos de neutralização da partícula viral envolve a resposta humoral, na qual um antígeno é reconhecido pelo sistema imunológico e, desse reconhecimento, os linfócitos B sofrem diferenciação se transformando em células especializadas na secreção de anticorpos (plasmócitos) e linfócitos B de memória. Os anticorpos são específicos para o antígeno reconhecido, caracterizando-o como neutralizante, e desta forma podem auxiliar no “*clearance*” viral por intermédio da fagocitose do vírus (DEEPAK *et al.*, 2002; GUZMAN *Op. cit.*).

Durante a primeira infecção pelo DENV, o anticorpo IgG contra a proteína de envelope e a proteína precursora de membrana, ao ser produzido, promove proteção a longo prazo contra o sorotipo infectante. Estes mesmos anticorpos IgG neutralizantes provenientes da primeira infecção, *in vitro*, reagem contra outros sorotipos, a curto prazo, porém não promovem a neutralização correta do antígeno. Este mecanismo é conhecido como reação cruzada e por não promover a neutralização devida do vírus heterólogo, em alguns casos, propicia o aumento da infecção *in vitro* (GUZMAN *Op. cit.*).

Estudos revelam que muitos anticorpos humanos apresentam esta característica. Pacientes vacinados contra o vírus vacinal da febre amarela (17D YFV) e que foram infectados com o vírus da encefalite japonesa (JEV), apresentaram aumentos consideráveis na quantidade de anticorpos específicos IgM e IgG contra YFV. Isto mostra que dentro do gênero *Flavivirus*, anticorpos contra certos grupos fazem reação cruzada contra outros (MAKINO *et al.*, 1994).

Em relação ao ZIKV, não se sabe muito sobre seus mecanismos imunológicos, no entanto, estudos revelaram que a transmissão passiva de anticorpos IgG específico para proteínas do envelope é eficiente em modelo animal, no qual os filhotes cujas mães foram imunizadas apresentaram a capacidade de neutralizar cepas diferentes do ZIKV (LAROCCA *et al.*, 2016).

Na doença causada pelo ZIKV, assim como em outras arboviroses, o tempo a partir da entrada do vírus na corrente sanguínea até o adoecimento do paciente é chamado período de incubação que dura entre 3 a 12 dias. Neste período o vírus

permanece alojado nas células hospedeiras, realizando vários processos para sua replicação. Por ser um período de início, porém no âmbito celular, o hospedeiro fica isento dos sintomas até o vírus começar a circular na corrente sanguínea. Após a identificação do sistema imunológico devido à quantidade de vírus circulantes, iniciam-se os sintomas que marcam a fase aguda da doença com duração entre 3 a 6 dias. Estes sintomas são: exantema maculopapular, febre, indisposição, artralgia, mialgia e conjuntivite, de acordo com OPAS/OMS (2017). Durante esta fase, é possível fazer o diagnóstico específico para ZIKV por RT-PCR em tempo real (*reverse transcription polymerase chain reaction*), uma vez que esta fase corresponde ao período que ainda se tem vírus ou seu RNA circulando na corrente sanguínea do paciente (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015).

Iniciado no período de viremia a produção principal é a do anticorpo IgM, que inicia após alguns dias do início dos sintomas e perdura por, normalmente, três meses. Em estudos de pacientes com ZIKV, este anticorpo foi detectado após 3 dias do início dos sintomas, enquanto que a neutralização por este anticorpo foi eficiente em, aproximadamente, 5 dias. Passado este período, inicia-se a fase de convalescença onde o principal anticorpo a ser produzido é o IgG, que é produzido após 10 dias, aproximadamente, e se mantém por anos. Trabalhos analisaram em soro de pacientes infectados com o ZIKV em ambas as fases da doença e concluíram que, da fase aguda até a convalescente, existe um aumento de 4 vezes mais na quantidade de anticorpos (CHARREL *et al.*, 2016; HAYES, 2009; OLSON *et al.*, 1981).

O material de análise usado durante a fase aguda é preferencialmente o soro, no entanto, outros materiais biológicos podem ser utilizados, como: plasma, urina, líquido cefalorraquidiano, fluido amniótico, sêmen e saliva, segundo a OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). O uso da saliva é vantajoso por ser uma coleta pouco invasiva em casos de recém-nascidos, além de permitir a detecção viral na primeira semana após o início dos sintomas e permitir um título viral superior ao do soro. No entanto o período de detecção viral utilizando a saliva é menor quando comparado com o uso da urina, que perdura entre 10 a 20 dias após o início dos sintomas (GOURINAT *et al.*, 2015; MUSSO *et al.*, 2015).

Na fase de convalescença, o diagnóstico deve ser feito com ensaios sorológicos, que no caso irá detectar a presença ou ausência de anticorpos contra o ZIKV. As ferramentas mais viáveis, nesta fase da doença são os imunoenaios enzimáticos, preferencialmente o ensaio de imuno-adsorção enzimática - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), e o ensaio de neutralização por redução de placas, sendo este último o mais específico (HAYES, 2009).

Para atender a demanda, o Ministério da Saúde distribuiu para o Sistema Único de Saúde (SUS) o único teste registrado até o momento, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para detecção rápida e qualitativa de anticorpo contra ZIKV em pacientes que tenham os sintomas com mais de 5 dias. Este teste é o Zika IgG/IgM Combo (BahiaFarma – Saúde e Desenvolvimento) que é um kit imunocromatográfico que implica em um dispositivo contendo dois cassetes no qual cada um detectará um tipo de anticorpo, IgM e IgG contra o ZIKV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Sendo assim, o fato de anticorpos contra o DENV reconhecer o ZIKV, faz com que o diagnóstico contra ZIKV necessite de mais cuidados uma vez que o DENV, por circular há mais tempo no Brasil, fez muitas pessoas apresentarem anticorpos para, no mínimo um sorotipo da doença. Segundo a OPAS/OMS (2017) e o Ministério da Saúde (1016), em 2016, no Brasil houve mais de 272 mil casos confirmados para o DENV e quase 1 milhão e 500 mil casos suspeitos.

2. JUSTIFICATIVA

A dificuldade para diagnosticar corretamente a infecção pelo ZIKV no Brasil se dá pelo grande número de pessoas que já foram infectadas por algum sorotipo dos DENV, já que ambos os vírus são circulantes no Brasil. Por serem vírus próximos filogeneticamente, os anticorpos contra os DENV do soro de um paciente podem interagir com o ZIKV e resultar em reações cruzadas em ensaios imunoenzimáticos, impossibilitando a definição de qual vírus estaria causando a doença.

O fato do período de viremia do ZIKV ser curto dificulta a análise molecular por RT-PCR em tempo real, que atualmente é a ferramenta mais apropriada para o diagnóstico correto da doença, quando coletado o material biológico no tempo certo. Passado este período, os testes mais viáveis são os sorológicos que detectam a presença ou ausência de anticorpos contra o vírus circulante na corrente sanguínea do paciente. Como colocado anteriormente, através destes ensaios um paciente que tenha tido infecção pelo DENV pode apresentar resultado falso positivo para ZIKV devido aos testes pouco específicos existentes no mercado.

Este trabalho investiga a especificidade e sensibilidade de alguns testes não aprovados e o teste Zika IgG/IgM Combo (BahiaFarma – Saúde e Desenvolvimento), aprovado pela ANVISA, junto com um ensaio soro-molecular desenvolvido e padronizado no Laboratório de Virologia Molecular, a fim de comparar os valores mais adequados para poder diferenciar corretamente a infecção pelo ZIKV.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

- Comparar a sensibilidade e especificidade entre os testes comerciais para detecção de anticorpo contra o ZIKV, e entre um ensaio soro-molecular desenvolvido no Laboratório de Virologia Molecular, visando o diagnóstico correto para o ZIKV, em pacientes que apresentam anticorpos contra o DENV e os que não apresentam anticorpos contra nenhum destes dois vírus.

3.2. Específicos

- Testar kits comerciais, imunocromatográficos e de ELISA, quanto a detecção de anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV em soros de pacientes, e comparar a sensibilidade e especificidade dos testes;
- Padronizar um novo ensaio soro-molecular e comparar sua sensibilidade e especificidade em dois valores diferentes de *cut-off*, a fim de testar a viabilidade do ensaio para o diagnóstico específico do ZIKV.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras e cepa viral

As amostras de soros utilizadas neste trabalho são amostras já existentes em nosso laboratório, repassadas pela Secretaria da Saúde para o Laboratório de Virologia Molecular, usados em projetos anteriores. Também foram usadas amostras de gestantes da cidade de Ribeirão Preto, durante o ano de 2016.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP (Ofício nº 3038/2006/1.428.859-2016). Todos os pacientes foram informados adequadamente sobre os objetivos do trabalho, tendo a opção de não participarem da amostragem, e foram incluídos no projeto após assinarem um termo de consentimento livre-esclarecido.

A cepa viral utilizada neste trabalho foi ZikaSPH2015, isolada de um paciente do estado de São Paulo, Brasil (CUNHA *et al.* 2016).

4.2. Cultivo celular

As células utilizadas para este trabalho foram células Vero (linhagem isolada de células epiteliais de rim de macaco verde africano).

Estas células foram mantidas em meio MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)) suplementados com soro bovino fetal a 10% (Cultilab), em estufa incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

Para os ensaios, as células foram lavadas com solução salina-fosfato tamponada pH 7.3 – PBS [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM)] e acrescidas de Tripsina (2,5 g/l) / EDTA (250 mg/l) (Cultilab) para soltar a monocamada de células em contato com garrafa de cultura, para que estas células fossem utilizadas nos ensaios.

A viabilidade celular foi analisada na presença de azul de tripan a 0,2% em câmara de Neubauer espelhada com uma lamínula para a contagem em microscópio ótico.

4.3. Estoque viral

Para a realização dos ensaios deste trabalho, foi feito um estoque do ZIKV e titulado por plaqueamento. Para isto, células Vero foram semeadas em garrafas de cultivo até a formação do tapete celular para infecção com o vírus. Em onze tubos foram acrescentados 450 µl do meio nestas condições, para 50 µl do vírus no primeiro ponto. A partir deste, foram passados 50 µl para todos os outros tubos, sendo esta a diluição decimal. Cada diluição foi usada para infectar dois poços da placa, e os dois poços restantes foram usados como o controle de células. Após a adsorção viral por 1 hora a 37°C, sem descartar o inóculo, foi completado com meio de manutenção MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)), suplementado com 2% de soro bovino fetal. A coleta para o estoque foi feita quando as células apresentaram efeitos citopáticos. O conteúdo da garrafa foi transferido para tubos e centrifugados a 10.000 rpm e a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos novos resfriados, acrescentado 20% de soro bovino fetal, aliquotados em crio-tubos e mantidos em freezer -80°C.

O estoque foi realizado com três passagens do ZIKV em células Vero, no qual foi titulado pelo ensaio de formação de placa (PFU – *plaque forming unit*).

4.4. Curva padrão de PFU

Para a obtenção da curva padrão, foi feita uma diluição seriada na proporção 1:10 do RNA viral extraído do controle positivo já titulado por PFU. A diluição foi feita em água ultra pura para cada ponto da curva. A curva contém sete pontos no qual o ponto mais concentrado apresenta 1.000.000 cópias do RNA enquanto que o ponto mais diluído, 1 cópia.

4.5. Curva de replicação viral

Uma placa de poliestireno com 24 poços foi semeada com células Vero e incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período as células foram infectadas, em duplicatas, com 0,1 MOI (*Multiplicity Of Infection*) de ZIKV diluídos em meio MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)), sem soro fetal bovino. Esta proporção de MOI corresponde a quantidade de partículas virais em relação ao número de células, no caso, usamos uma proporção de 1 partícula viral para cada 10 células. Após a adsorção viral de 1 hora a 37°C em estufa com 5% de CO₂, foram feitas três lavagens com solução salina-fosfato tamponada pH 7.3 – PBS [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM)] e acrescentado meio de manutenção MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)) suplementados com soro fetal bovino a 2% (Cultilab)).

Os pontos foram coletados no intervalo de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas. Cada ponto foi centrifugado a 8.000 rpm por 5 minutos, para eliminar células soltas e, em seguida, extraído RNA viral para a análise por RT-PCR em tempo real.

4.6. Extração de RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, California, USA), na presença de RNA carregador, que além de otimizar a afinidade do RNA viral com a membrana de ligação, protege o RNA de degradação. A extração foi feita de acordo com as recomendações do fabricante, no qual partiu-se de um volume inicial de 140 µl da amostra, seguido de etapas de lise, precipitação e lavagens do RNA viral, finalizando com a eluição deste RNA em um volume final de 60 µl de água livre de RNase.

4.7. RT-PCR em tempo real

As reações foram montadas a partir do kit QuantiNova™ Probe RT-PCR Kit – Qiagen, em um termociclador Mastercycler® Realplex4 (Eppendorf).

A reação foi feita de acordo com o recomendado pelo fabricante: 3 µL de RNA, 5 µL do reagente 2x Probe RT-PCR Master Mix, 0,1 µL do reagente QN Probe RT-Mix, 0,125 µL dos oligonucleotídeos e da sonda (10 pmol) e água livre de RNase para completar o volume final de 10 µL. As condições de amplificação foram baseadas em: temperatura para a transcrição reversa onde o RNA servirá como um molde para a síntese de cDNA (50°C por 10 minutos); temperatura de ativação da polimerase e inativação da RT (95°C por 1 minuto); 40 ciclos com a temperatura de desnaturação da dupla fita (95°C por 15 segundos), temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão da nova fita (60°C por 45 segundos).

Tabela 1- Sequência dos *primers* e sonda utilizadas neste trabalho, junto com a localização de pareamento de cada um.

ZIKV-E <i>Forward</i>	5'1222AAGTTTGCATGCTCCAAGAAAAT12443'
ZIKV-E Sonda	5'FAM1246ACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGA1268TAMRA3'
ZIKV-E <i>Reverse</i>	5'1293CAGCATTATCCGGTACTCCAGAT12713'

Os resultados foram reportados tendo como base o valor de CT (*cycle threshold*), que corresponde ao número de ciclos em que é atingido o limiar da detecção da fluorescência emitida pelo fluoróforo liberado durante a reação de PCR em tempo real.

4.8. Titulação viral

A titulação viral se deu por ensaio de formação de placa (PFU – *plaque forming unit*), no qual uma placa de poliestireno com 24 poços foi semeada com células Vero e quando a formação de uma monocamada celular era evidente foi feita a infecção.

A infecção foi feita em duplicata, com diluições decimais do vírus em meio MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)), sem soro fetal bovino. Em onze tubos foram acrescentados 450 µl do meio nestas condições, para 50 µl do vírus no primeiro ponto. A partir deste, foram passados 50 µl para todos os outros tubos, sendo esta a diluição decimal. Cada diluição foi usada para infectar dois poços da placa, e os dois poços restantes foram usados como o controle de células.

A adsorção viral que ocorreu por 1 hora a 37°C, o tapete celular foi lavado com solução salina-fosfato tamponada pH 7.3 – PBS [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM)] e acrescentado de meio “overlay” (carboximetilcelulose sódica) suplementado com 3% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina com antimicótico. Este meio semi-sólido impede que a progênie viral ao sair da célula infectada se espalhe, alcançando desta forma apenas as células vizinhas o que gera uma placa de lise na monocamada de células.

O ensaio permaneceu em estufa incubadora a 37°C com 5% de CO₂ até a formação das placas de lise que, para o ZIKV demorou de 4 a 5 dias. Após este tempo as células foram fixadas com formaldeído 10%, durante 20 minutos em temperatura ambiente em *shaker* horizontal com rotação de 150 RPM e corada com cristal violeta a 2%.

Cada placa de lise corresponde, em geral, uma partícula viral, desta forma, a contagem é feita a partir da diluição que corresponde a menor média da duplicata, extrapolada para o volume de inóculo para 1 ml, resultando em unidades formadoras de plaque - PFU/ml.

4.9. Ensaio de neutralização por redução de placas

O ensaio de neutralização por redução de placa (PRNT – *Plaque Reduction Neutralization Test*) foi feito a partir da incubação de uma monocamada de células Vero, com complexo vírus-anticorpo.

O soro do paciente ficou incubado a 56°C por 1 hora para inativação do sistema complemento, após isto foi feita uma diluição seriada 1:20 para o volume final de 200 µl em meio MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)) sem soro bovino fetal.

O ZIKV foi diluído em meio gelado MEM (Cultilab) contendo 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)) sem soro bovino fetal, de maneira que contivesse entre 30 a 50 unidades formadoras de placa (PFU) em um volume final de 200 µl. O vírus e cada diluição do soro foram homogeneizados e incubados a 4°C *overnight*, sendo esta uma condição otimizada no Laboratório de Virologia Molecular para esta técnica. O controle negativo se deu pela ausência de anticorpo.

As condições de adsorção viral a um tapete celular com confluência de 90% foram de 1 hora em estufa incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

Após isto, o tapete foi lavado com solução salina-fosfato tamponada pH 7.3 – PBS [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM)], e adicionado meio semi-sólido com carboximetilcelulose sódica – média viscosidade (Sigma – Aldrich) suplementado com 3% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab), que permaneceu por 4 a 5 dias.

Com o aparecimento de placas de lise, as células foram fixadas com formaldeído 10%, durante 20 minutos em temperatura ambiente em *shaker* horizontal com rotação de 150 RPM. O fixador foi retirado e o tapete celular foi corado com cristal violeta a 2%.

O resultado se deu por uma comparação entre o número de placas do controle de vírus (vírus sem anticorpo) e as diluições do soro, usando um fator 50% de redução de placas (PRNT₅₀), ou seja, o título de anticorpo foi aquele no qual a diluição do anticorpo promoveu 50% de neutralização. O valor de PRNT₅₀ para cada paciente foi estimado pelo *software* GraphPadPrism6.

4.10. Ensaio imuno-enzimático – ELISA

Para detecção de anticorpo IgM e IgG contra o ZIKV e anticorpos anti-NS1 de DENV, foi realizado um ensaio de imuno-adsorção enzimática - ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), com os kits: ZIKV IgM e ZIKV IgG da DIA.PRO (Diagnostic BioProbes Srl) com anticorpos policlonais humano, e com o kit PLATELIA™ DENGUE NS1 AG (BIO-RAD), que utiliza anticorpos monoclonais para a captura do antígeno NS1 de DENV. Ambos os kits foram executados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para os kits DIA.PRO, a placa já sensibilizada com antígeno purificado do vírus foi acrescida de soro de pacientes diluídos, sendo esta a primeira incubação no qual o anticorpo de interesse, estando presente, se liga ao antígeno. Após as lavagens para a retirada do que não se ligou ao antígeno, é dado início a segunda incubação onde é adicionado o anti-anticorpo de interesse, que por sua vez é marcado com a enzima peroxidase. Esta enzima catalisa a oxidação provocada pelo peróxido de hidrogênio e é ativada na presença de um substrato cromogênico, emitindo sinais ópticos proporcionais a quantidade existente do anticorpo conjugado com a enzima.

Diferentemente, o kit PLATELIA™ DENGUE NS1 AG, a placa já sensibilizada com anticorpos monoclonais é acrescida das amostras de soro diluídas no conjugado (anticorpos monoclonais anti-NS1 ligados à peroxidase). Após a única incubação, são realizadas as lavagens e adicionado uma solução que induz a reação de coloração enzimática.

As leituras da densidade óptica foram feitas em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 450nm para a leitura e de 620 - 630nm de filtro de referência.

4.11. Ensaio soro-molecular

Foi padronizado no Laboratório de Virologia Molecular (FMRP-USP) um ensaio que utiliza o ensaio de imuno-absorção enzimática (ELISA de captura) e quantificação de carga viral por RT-PCR em tempo real.

Para isto uma placa de poliestireno foi sensibilizada com anticorpo anti IgM humano na diluição 1:1000 fazendo uso do tampão carbonato pH9.6 [(Na₂CO₃ 15mM) e (NaHCO₃ 34,88mM)] para o volume final de 100 µl/poço. Após a incubação a 4°C *overnight*, a placa foi lavada três vezes com 300 µl/poço de PBS-T [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM) e 0,05% Tween 20]. O bloqueio foi por 1 hora a 37°C com 200 µl/poço de PBS-T com 5% de leite desnatado e, novamente foi lavada três vezes com PBS-T.

Primeiramente as amostras de soro foram diluídas 1:500 e na segunda repetição, os soros foram diluídos 1:1000 em PBS-T com 1% de leite desnatado para o volume final de 100 µl/poço. Os soros, nas duas diluições, foram incubados por 1 hora a 37°C e então a placa foi lavada três vezes com PBS-T.

Na segunda incubação, o ZIKV foi preparado em PBS-T com 3% de leite desnatado, para uma concentração de 10³ PFU/poço em um volume final de 100 µl/poço. A placa foi novamente incubada nas mesmas condições e lavada, cuidadosamente, seis vezes com PBS-T.

Por fim, foi adicionado 200 µl/poço de PBS [(NaCl 137mM), (KCl 27mM), (Na₂HPO₄ 10mM), (KH₂PO₄ 2mM)] e raspado para a retirada do complexo vírus-anticorpo, em seguida foi feita a extração de RNA e RT-PCR em tempo real para quantificar a carga viral. Para o controle negativo, foi usado um soro negativo para o ZIKV.

4.12. Testes imunocromatográficos

Foram feitos testes comerciais de detecção de anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV em soro humano.

Os kits utilizados foram Quick Profile™ Zika Vírus IgG/IgM Combo Test (LumiQuick Diagnostics. Inc.); e Zika IgG/IgM Combo (BahiaFarma – Saúde e Desenvolvimento), ambos os kits foram executados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Estes testes imunocromatográficos são testes qualitativos, compostos por cassetes, cuja membrana de nitrocelulose é dividida em pequenas bandas de interesse. Cada banda contém: antígenos do ZIKV específicos; anticorpos anti-IgM ou anti-IgG humanos associados com ouro coloidal (corante insolúvel); e uma banda controle que apresenta anticorpos monoclonais anti-IgG. Ao colocar o soro positivo no dispositivo, os anticorpos reagem com a banda dos antígenos ou com os anticorpos da linha controle, validando o teste. Adicionado o tampão, ocorre a reação do conjugado (anticorpos anti-IgM ou anti-IgG com o ouro coloidal) e o complexo antígeno com o anticorpo do paciente, resultando em 15 minutos, uma banda corada correspondendo positividade para o anticorpo testado.

4.13. Teste de sensibilidade e especificidade

Para a construção dos gráficos e para as análises estatísticas foi utilizado *software* GraphPadPrism6, e os testes de propriedades como: sensibilidade, especificidade e valores preditivos, foram feitos segundo Stuart (2004).

A sensibilidade corresponde à probabilidade do teste ser positivo para uma amostra de paciente que realmente apresente a doença. O seu cálculo é feito pela razão entre: o número de amostras de pacientes com a doença que foram discriminadas positivas pelo teste, com o número total de amostras com a doença.

A especificidade indica a probabilidade do teste ser negativo para uma amostra de paciente que não apresente a doença, e seu cálculo é feito pela razão entre: o número de amostras de pacientes que não possuem a doença e que foram discriminadas negativas pelo teste, com o número total de amostras sem a doença.

O valor preditivo positivo (PPV – *Positive Predictive Value*) indica a chance de o indivíduo ter a doença quando o teste apresentar resultado positivo, ou seja, o

verdadeiro positivo. O seu cálculo é feito pela razão entre: o número de amostras de pacientes que possuem a doença e que resultaram positivas pelo teste, com o número total das amostras que este mesmo teste discriminou positivas.

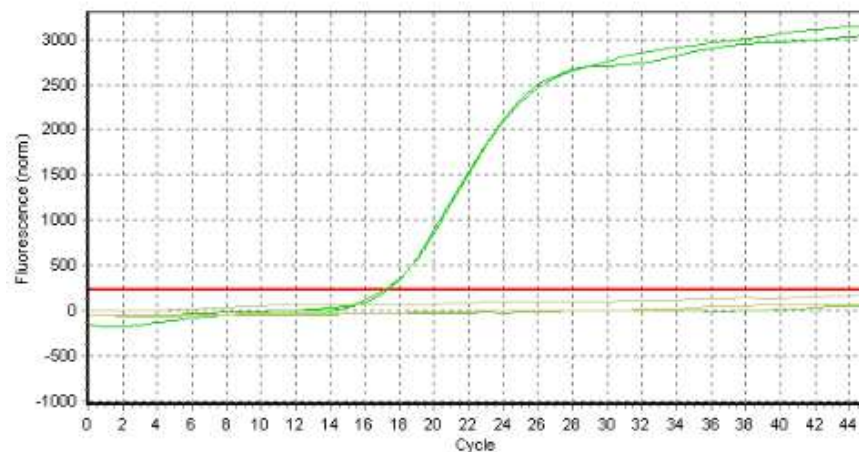
O valor preditivo negativo (NPV – *Negative Predictive Value*) indica a chance de o indivíduo não apresentar a doença quando o resultado do teste for negativo, ou seja, o verdadeiro negativo. O seu cálculo é feito pela razão entre: o número de amostras de pacientes que não possuem a doença e que resultaram negativas pelo teste, com o número total das amostras que este mesmo teste discriminou negativas.

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação molecular

A confirmação das amostras e do estoque viral, se deu pela técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando sonda e *primers* específicos para detectar RNA do ZIKV de linhagens asiáticas. Estes *primers* são homólogos para a região da proteína de envelope do vírus (PIKE *et al.*, 2014).

Figura 1- Perfil do controle positivo do ZIKV.

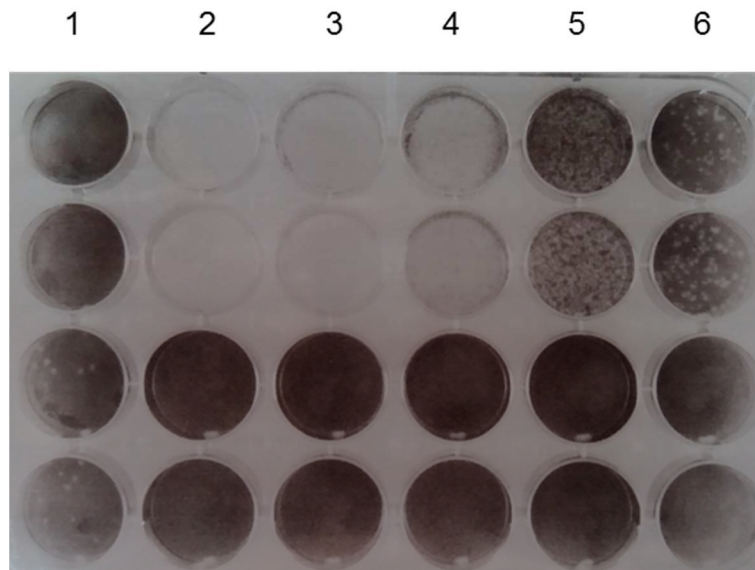


Fonte: Atual estudo. A figura mostra a relação da intensidade de fluorescência por ciclo. Enquanto o controle negativo não cruza o *threshold* (indicando a não-contaminação), o controle positivo cruza no ciclo 17.

5.2. Titulação viral

A titulação viral do estoque foi realizada com o ensaio de formação de placa - PFU, no qual placas de lise individualizadas e visíveis foram contadas, como mostra a figura 2, alcançando o título de $4 \cdot 10^7$ PFU/ml.

Figura 2- Perfil da titulação viral por formação de placa de lise (PFU).



Fonte: atual estudo. A figura ilustra uma placa de 24 poços, no qual os dois primeiros poços da coluna 1, correspondem o controle negativo de vírus, e a partir dos primeiros poços da coluna 2, correspondem diluições seriadas 1:10. Todos os pontos foram feitos em duplicata.

5.3. Curva de replicação viral

Para entender a cinética do ZIKV, avaliar os melhores dias de coletas e para padronizar futuras técnicas, foi realizado uma curva de replicação com 12 pontos e feita com MOI 0.1. Os pontos coletados foram feitos em intervalo de 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas, de acordo com a figura 3.

Figura 3- Perfil da curva de replicação do ZIKV, relacionando o número de cópias do RNA viral com o tempo de coleta.



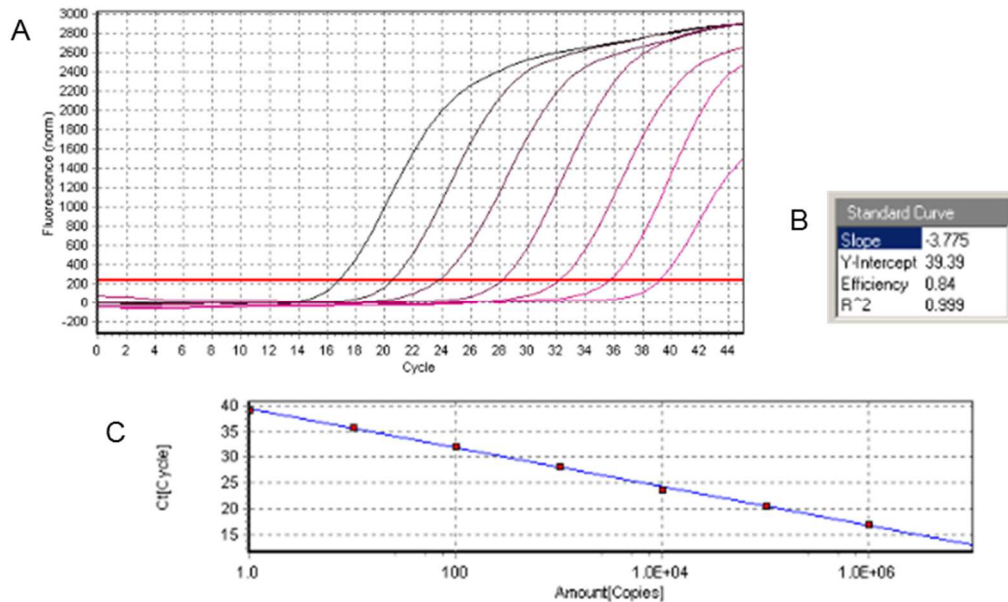
Fonte: atual estudo. O eixo Y representa o número de cópias e no eixo X, o tempo de coleta em horas. O primeiro (eixo Y) representa o título do estoque, o ponto 0 representa o input (quantidade de vírus inoculado). A diminuição da quantidade de vírus até 6 horas representa o período de eclipse (no qual os vírus se encontram dentro das células que estão infectando). O platô ocorre com 48 horas após a infecção.

O primeiro ponto (eixo Y) da curva corresponde o título do estoque viral que foi inoculado. Após as lavagens para retirada de possíveis vírus que não tenham entrado nas células foi coletado imediatamente o ponto 0, que corresponde o *input* (inóculo). Até o terceiro ponto (6 horas) é notado uma diminuição brusca da carga viral, e esta queda é denominada como eclipse viral, pois corresponde ao período que a maioria das partículas virais entram nas células, ficando apenas as partículas não infecciosas ou degradadas para fora. A partir de então os outros pontos foram coletados e, em 48 horas a curva atinge um platô.

5.4. Curva padrão de PFU

A curva padrão de PFU apresentou um coeficiente de correlação (valor de R^2) potencialmente bom ($R^2 = 0.99$), enquanto que o *slope* (coeficiente angular), que é uma medida que compara no decorrer dos ciclos a quantidade de ácido nucleico final e inicial, apresentou um valor pouco mais negativo do que -3.32.

Figura 4- Análise da curva padrão do ZIKV. A- curva de amplificação; B- padronização da curva; C- valores do ciclo de limiar de fluorescência.



Fonte: atual estudo. A- Curva de amplificação da reação de RT-PCR em tempo real utilizando diluições seriadas decimais do RNA, de acordo com a titulação por PFU. B- valores da inclinação da reta, intersecção, eficiência da reação e correlação. C- curva padrão com o valor de Ct (ciclo do limiar de fluorescência) no eixo Y e o número de cópias no eixo X.

5.5. Classificação das amostras utilizadas

Para uma análise prévia, foram utilizadas algumas amostras para o ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT), totalizando 17 soros de pacientes. Estas amostras existentes no Laboratório de Virologia Molecular, estavam bem caracterizadas e confirmadas clínica e laboratorialmente. Dentre estas, seis amostras eram de pacientes na fase aguda de dengue, indicado pela presença do anticorpo IgM contra DENV, além da confirmação clínica. As onze amostras, foram amostras subsequentes às amostras positivas para ZIKV, confirmadas por RT-PCR em tempo real, negativas para o anticorpo IgM contra DENV e clinicamente confirmados, indicando que a febre zika era a infecção no momento da coleta.

Para a comparação entre os kits comerciais e o ensaio soro-molecular desenvolvido no Laboratório de Virologia Molecular, foram utilizadas 91 amostras bem caracterizadas.

Para o controle negativo foram utilizadas 10 amostras de soro negativos na detecção de anticorpos IgM e IgG contra o vírus dengue, através do ensaio imunoenzimático. Estas amostras controles referem-se ao ano de 2011, período em que o ZIKV não circulava no Brasil. Referente ao mesmo ano, foram utilizadas 40 amostras positivas pelo mesmo ensaio, para anticorpo IgM e IgG contra o DENV e 41 amostras positivas para o ZIKV, coletadas em 2016 e caracterizadas como descrito anteriormente. Este último subgrupo representa as amostras subsequentes às amostras ZIKV-positivas por RT-PCR em tempo real, e ao mesmo tempo, resultaram negativas para o antígeno NS1 de DENV, indicando que no período da coleta, a infecção era causada pelo ZIKV.

5.6. Ensaio de neutralização por redução de placas

O ensaio de neutralização por redução de placa permitiu analisar a presença ou ausência de anticorpo e o título de anticorpo neutralizante contra o ZIKV.

Neste ensaio prévio, foram utilizadas 17 amostras classificadas conforme descrito anteriormente: DENV positivo e ZIKV positivo. Para o agrupamento das amostras entre os dois vírus com o valor de PRNT₅₀, foram escolhidos três valores de *cut-off* para melhor análise. O motivo desta avaliação foi a tentativa de definição da melhor diluição do anticorpo capaz de diferenciar as duas infecções.

Tabela 2- O número de amostras dentro de cada grupo viral que conseguiram neutralizar 50% do ZIKV de acordo com estes três valores de *cut-off*.

	1:500	1:750	1:1000
Amostras DENV positivas (6)	2	0	0
Amostras ZIKV positivas (11)	10	7	5

Das amostras positivas para o DENV, apenas duas conseguiram neutralizar o ZIKV, e esta neutralização se deu na menor diluição do soro. Já no subgrupo das amostras ZIKV positivas, quase que metade da amostragem neutralizou o vírus em títulos acima de 1000, na maior diluição do soro.

5.7. Análise sorológica – ELISA

Para a análise do ensaio sorológico, as 91 amostras, já caracterizadas quanto a presença de anticorpo IgM e IgG contra o ZIKV, foram testadas com o kit da marca DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl. O motivo foi avaliar se este teste discriminaria, dentre os subgrupos amostrais, os resultados falsos.

Tabela 3- Número de amostras, dentro de cada subgrupo, que foi classificada positiva, segundo o kit.

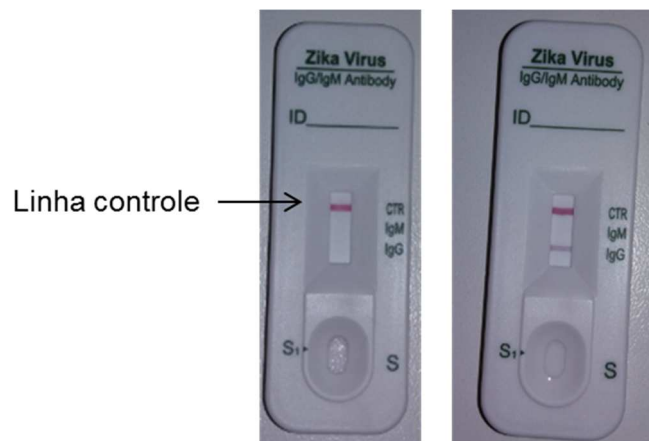
	IgM	IgG
Controle negativo (10 amostras)	0	0
IgM e IgG contra DENV (40 amostras)	0	3
Amostras 2 ^a às positivas ZIKV (41 amostras)	19	33

Quanto ao anticorpo IgM contra ZIKV, o kit testado não discriminou como sendo positiva nenhuma amostra de dengue, enquanto que o anticorpo IgG contra ZIKV discriminou positiva três amostras de dengue.

5.8. Testes imunocromatográficos

Para a detecção de anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV, foram analisadas duas marcas comerciais de testes rápidos de acordo com as recomendações dos fabricantes. Após estes ensaios, foi realizado o teste de propriedades para cada marca.

Figura 5- Dispositivo para análise dos anticorpos.



Fonte: atual estudo. Este dispositivo possibilita a análise qualitativa simultaneamente para dois anticorpos. A linha controle indica a validação do teste, com o bom funcionamento dos reagentes, e abaixo dela as linhas correspondentes presentes ou ausentes anticorpos IgM e IgG.

Os resultados obtidos pelo kit Quick Profile™ Zika Vírus IgG/IgM Combo Test (LumiQuick Diagnostics. Inc.) e para o kit Zika IgG/IgM Combo BahiaFarma são mostrados na tabela 4.

Tabela 4- A quantidade de amostras, dentro de cada subgrupo, que foi classificada quanto a presença ou ausência dos anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV.

		IgM	IgG
	Controle negativo (10 amostras)	1	0
LumiQuick	IgM e IgG contra DENV (40 amostras)	10	1
	Amostras 2 ^a às positivas ZIKV (41 amostras)	15	33
	Controle negativo (10 amostras)	1	0
BahiaFarma	IgM e IgG contra DENV (40 amostras)	3	1
	Amostras 2 ^a às positivas ZIKV (41 amostras)	7	32

O kit da LumiQuick discriminou, como sendo positivas para o ZIKV, um total de 11 amostras dentro do subgrupo das amostras de dengue positivas, enquanto que o kit da BahiaFarma, um total de 4 amostras dentro do mesmo subgrupo. Ambos os kits resultaram 1 amostra positiva para o ZIKV dentro do subgrupo controle negativo.

5.9. Ensaio soro-molecular

Para este ensaio foram utilizadas as 91 amostras caracterizadas, sendo que para cada uma delas, foram testadas as duas diluições, de acordo com os resultados vistos no ensaio prévio de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀), 1:500 e 1:1000, visando analisar os valores de maior e menor, respectivamente, neutralização cruzada

O número de amostras que resultaram positivas para este ensaio, está demonstrado na tabela, sendo realizado em seguida o teste de sensibilidade e especificidade.

Tabela 5- Quantidade de amostras, dentro de cada subgrupo e para cada valor de *cut-off*, que resultaram positivas para o ZIKV.

	<i>Cut-off</i> 1:500	<i>Cut-off</i> 1:1000
Controle negativo (10 amostras)	0	0
IgM e IgG contra DENV (40 amostras)	4	2
Amostras 2 ^a às positivas ZIKV (41 amostras)	16	2

Nota: Este ensaio teve 45 ciclos, no entanto, o suficiente são 40 ciclos.

O valor de *cut off* 1:500 resultou em um maior número de amostras positivas, quando comparado com o valor de *cut off* 1:1000, mas mesmo assim apresentou resultados falso-positivos.

5.10. Teste de sensibilidade e especificidade

A fim de se comparar os resultados dos ensaios realizados com parâmetros importantes para testes de diagnóstico, aplicamos o teste de sensibilidade e especificidade, incluindo os valores preditivos positivos e negativos.

Tabela 6- A comparação dos kits, entre os valores de *cut-off* dos ensaios de neutralização por redução de placas e entre os ensaios soro-molecular.

	Sensibilidade	Especificidade	PPV	NPV
ZIKV IgM (DIA.PRO)	46,34%	100%	100%	69,45%
ZIKV IgG (DIA.PRO)	80,50%	94%	91,67%	85,45%
Quick Profile™ Zika Vírus				
IgG/IgM Combo Test (LumiQuick)	87,80%	76%	74,47%	86,36%
Zika IgG/IgM Combo (BahiaFarma)	78,05%	90%	86,49%	83,34%
PRNT ₅₀ 1:500	90,91%	66,67%	83,34%	80%
PRNT ₅₀ 1:750	63,64%	100%	100%	60%
PRNT ₅₀ 1:1000	45,46%	100%	100%	50%
Soro-molecular 1:500	41,84%	74%	81,25%	62,71%
Soro-molecular 1:1000	31,70%	88%	68,42%	61,10%

Tabela 1 PPV: valor preditivo positivo. NPV: valor preditivo negativo.

Os kits da DiaPro, que faz uso de anticorpos policlonais humano, resultou com o anticorpo IgM mais específico do que o anticorpo IgG, no entanto, a sensibilidade do primeiro atingiu um valor insatisfatório (46%).

Entre as duas marcas de testes rápido para detecção de anticorpos IgM e IgG, o kit da BahiaFarma, que é o utilizado no SUS, apresentou maiores parâmetros, sendo especificidade 90% e sensibilidade 78%. O teste desenvolvido pela LumiQuick se mostrou mais sensível que o primeiro (87,8%), porém a especificidade diminuiu (76%).

A respeito do ensaio de neutralização por redução de placa, observamos que quanto menor for a diluição do soro, maior a sensibilidade e menor a especificidade.

A mesma relação ocorre no ensaio soro-molecular, no entanto, este ensaio por não ter alcançado valores viáveis, necessita de mais ajustes.

6. DISCUSSÃO

Para o diagnóstico correto das infecções pelo ZIKV é recomendável a coleta de soro ou urina durante a fase de viremia e virúria, aproximadamente entre 3 a 6 dias ou 10 a 20 dias, respectivamente, após o início dos sintomas. Para a eficiência do diagnóstico, é importante a segunda coleta de soro, após 3 semanas da primeira coleta. Desta forma é possível detectar tanto o material genético do vírus, no período de viremia, quanto a presença de anticorpo neutralizantes contra o ZIKV, no período pós-viremia. No entanto, o que está disponível na maioria dos casos, são apenas amostras correspondendo ao período pós-viremia. (GOURINAT *et al.*, 2015; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015).

A principal dificuldade para o diagnóstico do ZIKV é a identificação correta dos anticorpos neutralizantes contra o DENV e o ZIKV durante este período. Para isto foi realizado um ensaio prévio de neutralização por redução de placa, utilizando 17 amostras. Os resultados mostraram que na maior diluição dos soros de pacientes ZIKV positivos, quase metade das amostras conseguiram títulos altos de neutralização, enquanto que na menor diluição do soro de pacientes DENV positivos, 2 amostras conseguiram também neutralizar o ZIKV.

Tivemos um número significativo de amostras que obtiveram um título de neutralização semelhante, independente do vírus. Mesmo sendo um título baixo, observamos a inconclusão deste teste.

Este mecanismo de neutralização cruzada é o principal motivo da dificuldade no diagnóstico para ZIKV em pacientes que dispõem de anticorpos contra algum sorotipo de DENV e se encontram no período pós-viremia. Duffy e colaboradores (2009) adotaram algumas condições para considerar a amostra positiva para ZIKV quando este paciente estivesse passado do período de viremia. Dentre estas condições estão: a estipulação de um título mínimo de neutralização contra ZIKV, e a proporção deste título ser no mínimo 4 vezes maior do que o título de neutralização contra o DENV.

Mesmo assim, o PRNT é o teste que melhor relaciona o fator imunológico com infecções causadas por flavivirus. No entanto, apresenta como desvantagem o

tempo que totaliza, aproximadamente 7 dias para o ZIKV, entre a montagem da placa até a revelação desta, o que torna inviável a aplicação desta técnica em larga-escala.

Uma técnica viável para grandes números de amostras são os testes de imunoadsorção enzimática (ELISA) que, além de gerar resultado relativamente rápido, faz necessário equipamentos básicos de laboratório.

Com esta finalidade foram testados dois kits da DiaPro, dentre eles, o kit ZIKV IgM apresentou baixa sensibilidade (46%) e especificidade de 100%, enquanto o kit ZIKV IgG, apresentou sensibilidade de 80,5% e especificidade de 94%. Este predomínio da especificidade do anticorpo IgM comparada com o anticorpo IgG, foi observado em outro trabalho no qual pacientes sadios para infecção do vírus Oeste do Nilo (WNV), quando infectados com outros flavivirus e testados por ELISA para detectar anticorpos IgG contra WNV, 35% dessas amostras resultaram positivas, enquanto que para a detecção de anticorpos IgM contra WNV em pacientes infectados com DENV, 26% das amostras resultaram positivas (HOGREFE et al., 2004).

O fato de ser desconhecida a informação quanto a presença ou ausência de anticorpos contra o DENV para o grupo de amostras ZIKV positivo, não podemos descartar a possibilidade de que muitos destes pacientes foram imunizados durante algum momento contra o DENV, uma vez que este vírus está inserido e em contato com a população há muito mais tempo que o ZIKV, no Brasil. Nestes casos de infecções secundárias causadas por outros flavivirus, o ZIKV tem maior propensão para reação cruzada com DENV do que o vírus da Febre Amarela (YFV), Encefalite Japonesa (JEV) e West do Nilo (WNV) (DUFFY *et al.*, 2009; HAYES, 2009).

Outra ferramenta vantajosa são os testes imunocromatográficos. Estes possibilitam triagem rápida e barata das amostras em laboratórios de saúde pública.

Para as duas marcas de testes rápido testadas, o kit da LumiQuick se mostrou mais sensível do que específico (87,8% e 76% respectivamente). Enquanto que o da BahiaFarma, que é o teste distribuído no Sistema Único de Saúde (SUS) e registrado pela ANVISA, resultou em uma especificidade de 90%.

No caso da infecção causada pelo ZIKV, é de extrema importância a aplicação de um teste que seja, principalmente, específico, pois este parâmetro identifica os verdadeiros pacientes que não são portadores da infecção, ou seja, os verdadeiramente saudáveis. Além de que se o teste resultar negativo, não há necessidade de outros testes para a confirmação.

Para atender os grupos mais vulneráveis como as gestantes e portadores de doenças crônicas e condições autoimunes, a especificidade do teste influencia, entre os indivíduos saudáveis, em fatores sanitários e psicológicos, uma vez que, no ano de 2015 após a notificação do vírus no Brasil, foi visto um aumento de notificações de recém-nascidos com microcefalia, aborto espontâneo e natimortos, associando desta forma, o vírus à estas complicações (OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2016).

Na tentativa de obter resultados mais conclusivos, desenvolvemos no Laboratório de Virologia Molecular um ensaio que une dois tipos de análises, o sorológico e o molecular. O sorológico implica no ELISA de captura, utilizamos anticorpos anti-IgM humano, uma vez que o anticorpo IgM é brevemente produzido durante a infecção, seu título aumenta rapidamente podendo indicar a fase da doença e gera menos reação cruzada quando comparado ao anticorpo IgG (MARTIN *et al.*, 2000).

As diluições utilizadas neste ensaio foram escolhidas com o objetivo de avaliar a diluição com maior e menor número de amostras falso-positivas, segundo o ensaio de neutralização.

Observamos que quanto menor a diluição dos anticorpos, maior o número de amostras falso-positivas dentro do grupo ZIKV negativo, o que diminui a especificidade do teste. Uma possível explicação é que as amostras DENV positivas, foram assim classificadas, por ELISA, pela presença dos anticorpos IgM e IgG (estas amostras já estavam classificadas desde o ano de 2011), sendo assim, estes anticorpos IgM ao se ligarem nos anticorpos anti-IgM sensibilizados na placa, foram capazes em reconhecer o ZIKV, o que está de acordo com vários estudos que relatam reação cruzada entre estes dois vírus.

Embora este ensaio soro-molecular não tenha alcançado resultados adequados, concluímos que tais resultados baixos, podem ser reparados com

melhores ajustes nas etapas protocolares, principalmente na etapa de lavagem da placa após a adição do vírus. Estes resultados inviáveis não correspondem a eficiência do ensaio em si. Foi possível chegarmos nesta conclusão, devido ao fato da observação de que duas amostras que foram coletadas com 45 dias após a amostra confirmada positiva por RT-PCR em tempo real, e que obtiveram títulos de neutralização superiores a 1/1500 e 1/3800 contra o ZIKV, foram negativas no ensaio soro-molecular.

7. CONCLUSÃO

Atualmente o diagnóstico para ZIKV é desafiador e requer mais estudos e desenvolvimentos de técnicas específicas e viáveis, que sejam capazes de distinguir, através da presença de anticorpos IgM, o vírus infectante, uma vez que no Brasil muitas pessoas foram imunizadas naturalmente, via infecção, contra o DENV e a maioria das amostras recebidas são correspondentes ao período de pós-viremia.

Diante dos nossos resultados, observamos que até mesmo o ensaio de neutralização por redução de placa, que representa o teste que melhor relaciona os fatores imunológicos das infecções causadas por flavivirus, se torna inconclusivo se não houver uma amostra anterior que a confirme.

Através dos nossos resultados, percebemos que o teste comercial que resulta os melhores parâmetros, é o kit Zika IgG/IgM Combo BahiaFarma. Sendo este, testes imunocromatográficos, o que propicia uma aplicação em larga escala, necessitando de equipamentos comuns de laboratório, e gerando o resultado em poucos minutos.

Dentre os outros ensaios realizados neste trabalho, o ensaio soro-molecular é o que apresenta maior viabilidade para ser aplicado em grande número de amostras. É indispensável melhores padronizações protocolares a fim de se obter maiores resultados, sem perda do material, principalmente na etapa das lavagens da placa.

As vantagens deste ensaio, comparadas ao de neutralização por redução de placa, é que, mesmo ambos permitindo o uso das amostras no período entre o pós-viremia até a fase aguda da febre zika, o PRNT fornece seu resultado em títulos de neutralização, e para isto perdura por sete dias, enquanto que o outro gera seu resultado pela amplificação do ZIKV, consumindo, no máximo, 3 dias (entre a sensibilização da placa até a RT-PCR em tempo real). Tendo como outra vantagem a quantidade de amostras que uma placa permite realizar em uma única vez.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- CAO-LORMEAU V.M., ROCHE C., TEISSIER A., ROBIN E., BERRY A.L., MALLET H.P., SALL A.A., MUSSO D. (2014) **Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013**. *Emerging Infectious Diseases* 20(6), 1085-1086.
- CHARREL R.N., LEPARC-GOFFART I., PAS S., LAMBALLERIE X., KOOPMANS M., REUSKEN C. (2016) **Background review for diagnostic test development for zika virus infection**. *Bull World Health Organ* 94, 574-584.
- CUNHA M.S., ESPOSITO D.L.A., ROCCO I.M., MAEDA A.Y., VASAMI F.G.S., NOGUEIRA J.S., SOUZA R.P., SUZUKI A., ADDAS-CARVALHO M., BARJAS-CASTRO M.L., RESENDE M.R., STUCCHI R.S.B., BOIN I.F.S.F., KATZ G., ANGERAMI R.N., FONSECA B.A.L. (2016) **First complete genome sequence of zika virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) from an autochthonous transmission in Brazil**. *American Society for Microbiology – Genome Announcements*, 4(2).
- DEEPAK T.N., KAVITA S., ZAVED S., BISHNU P.N., KANURY V.S.R., DINAKAR M.S. (2002) **Epitope recognition by diverse antibodies suggests conformational convergence in an antibody response**. *The Journal of Immunology* 168, 2371-2382.
- DEJNIRATTISAI W., SUPASA P., WONGWIWAT W., ROUVINSKI A., BARBASPETH G., DUANGCHINDA T., SAKUNTABHAI A., CAO-LORMEAU V.M., MALASIT P., REY F.A., MONGKOLSAPAYA J., SCREATON G.R. (2016) **Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus**. *Nature Immunology* 17(9), 1102-1108.
- DICK G.W.A., KITCHEN S.F., HADDOW A.J. (1952) **Zika virus (I). Isolations and serological specificity**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(5), 509-520.
- DUFFY M.R., CHEN T.H., HANCOCK W.T., POWERS A.M., KOOL J.L., LANCIOTTI R.S., PRETRICK M., MARFEL M., HOLZBAUER S., DUBRAY C., GUILLAUMONT L., GRIGGS A., BEL M., LAMBERT A.J., LAVEN J., KOSOY O., PANELLA A., BIGGERSTAFF B.J., FISCHER M., HAYES E.B. (2009) **Zika virus outbreak on Yap Island Federated States of Micronesia**. *The New England Journal of Medicine*, 360, 2536-2543.
- FARIAN.R., AZEVEDO R.S.S., KRAEMER M.U.G., SOUZA R., CUNHA M.S., HILL S.C., THÉZÉ J., BONSALE M.B., BOWDEN T.A., RISSANEN I., ROCCO I.M., NOGUEIRA J.S., MAEDA A.Y., VASAMI F.G.S., MACEDO F.L.L., SUZUKI A., RODRIGUES S.G., CRUZ A.C.R., NUNES B.T., MEDEIROS D.B.A., RODRIGUES D.S.G., QUEIROZ A.L.N., SILVA E.V.P., HENRIQUES D.F., ROSA E.S.T., OLIVEIRA C.S., MARTINS L.C., VASCONCELOS H.B., CASSEB L.M.N., SIMITH D.B., MESSINA J.P., ABADE L., LOURENÇO J., ANCANTARA L.C.J., LIMA M.M., GIOVANETTI M., HAY S.I., OLIVEIRA R.S., LEMOS P.S., OLIVEIRA L.F., LIMA C.P.S., SILVA S.P., VASCONCELOS J.M., FRANCO L., CARDOSO J.F., VIANEZ-JÚNIOR J.L.S.G., MIR D., BELLO G., DELATORRE

E., KHAN K., CREATORE M., COELHO G.E., OLIVEIRA W.K., TESH R., PYBUS O., NUNES M.R.T., VASCONCELOS P.F.C. (2016) **Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings**. American Association for the Advancement of Science, 352(6283), 345-349.

FAUCI A.S., MORENS D.M. (2016) **Zika virus in the Americas – yet another arbovirus threat**. The New England Journal of Medicine, 374(7), 601-603.

GOURINAT A.C., O'CONNOR O., CALVEZ E., GOARANT C., DUPONT-ROUZEYROL M. (2015) **Detection of zika virus in urine**. Emerging Infectious Diseases, 21(1), 84-86.

GUZMAN M.G., ALVAREZ M., HALSTEAD S.B. (2013) **Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection**. Springer.

HADDOW A.D., SCHUH A.J., YASUDA C.Y., KASPER M.R., HEANG V., HUY R., GUZMAN H., TESH R.B., WEAVER S.C. (2012) **Genetic characterization of zika virus strains: geographic expansion of the asian lineage**. Plos, Neglected Tropical Diseases, 6(2), 1477.

HAYES E.B. (2009) **Zika virus outside Africa**. Emerging Infectious Diseases, 15(9), 1347-1350.

HOLMES E.C., TWIDDY S.S. (2003) **The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus**. Elsevier, Infection, Genetics and Evolution, 3, 19-28.

IOOS S., MALLET H.P., GOFFART I.L., GAUTHIER V., CARDOSO T., HERIDA. (2014) **Current zika virus epidemiology and recent epidemics**. Elsevier, Médecine et maladies infectieuses, 44, 302–307.

LANCIOTTI R.S., KOSOY O.L., LAVEN J.J., LAMBERT A.J., JOHNSON A.J., STANFIELD S.M., DUFFY M.R. (2008) **Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007**. Emerging Infectious Diseases, 14(8), 1232-1239.

LAROCCA R.A., ABBINK P., PERON J.P.S., ZANOTTO P.M.A., IAMPIETRO M.J., BADAMCHI-ZADEH A., BOYD M., NG'ANG'A D., KIRILOVA M., NITYANANDAM R., MERCADO N.B., LI Z., MOSELEY E.T., BRICAULT C.A., BORDUCCHI E.N., GIGLIO P. B., JETTON D., NEUBAUER G., NKOLOLA J.P., MAXFIELD L.F., DE LA BARRERA R.A., JARMAN R.G., ECKELS K.H., MICHAEL N.L., THOMAS S.J., BAROUCH D.H. (2016) **Vaccine protection against zika virus from Brazil**. Nature, 1-8.

MACNAMARA F.N. (1954) **Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 48(2), 139-145.

- MAKINO Y., TADANO M., SAITOL M., MANEEKARN N., SITTISOMBUT N., SIRISANTHANA V., PONEPRASERT B., FUKANAGA T. (1994) **Studies on serological cross-reaction in sequential flavivirus infections.** Microbiology and Immunology, 38(12), 951-955.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2016) **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a semana epidemiológica 49.** Secretária de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico – Brasil, 47(38), 1-10.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017) **Ministério da Saúde vai distribuir teste rápido de zika.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/26155-ministerio-da-saude-vai-distribuir-teste-rapido-de-zika>. Acesso em: 09 de mar. 2017.
- MURREL S., WU S.C., BUTLER M. (2011) **Review of dengue virus and the development of a vaccine.** Elsevier, Biotechnology advances, 29, 239-247.
- MUSSO D., ROCHE C., NHAN T.X., ROBIN E., TEISSIER A., CAO-LORMEAU V.M. (2015) **Detection of zika virus in saliva.** Elsevier, Journal of Clinical Virology, 68, 53-55.
- OLIVEIRA C.S., VASCONCELOS P.F.C. (2016) **Microcephaly and zika vírus.** Jornal de Pediatria, 92(2), 103-105.
- OLSONI J.G., KSIKEN T.G., SUHANDIMAN, TRIWIBOWO (1981) **Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 75(3), 389-393.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OMS (2016) **Testes de laboratório para infecção pelo vírus zika.** Orientações Provisórias, 23 de março de 2016, WHO/ZIKV/LAB/16.1.
- ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, OPAS/OMS (2017) **Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas by country.** Epidemiological Week / EW 52 (Updated February 6,2017).
- PINTO JUNIOR V.L., LUZ K., PARREIRA R., FERRINHO P. (2015) **Zika vírus: a review to clinicians.** Acta Med Port, 28(6), 760-765.
- PYKE A.T., DALY M.T., CAMERON J.N., MOORE P.R., TAYLOR C.T., HEWITSON G.R., HUMPHREYS J.L., GAIR R. (2014) **Imported zika virus infection from the Cook Islands into Australia, 2014.** Plos – Currents Outbreaks, 1, 1-7.
- SHAWAN M.M.A.K., MAHMUD H.A., RAHMAN M.M.N., RAHMAN S.M.B. (2014) **In silico modeling and immunoinformatics probing disclose the epitope based peptide vaccine against zika virus envelope glycoprotein.** Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research (IJPBR), 2(4), 44-57.

- SMITH S.A., ZHOU Y., OLIVAREZ N.P., BROADWATER A.H., SILVA M., CROWE JR J.E. (2011) **Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection.** Journal of Virology, 86(5), 2665-2675.
- SPITALMIC S. (2004) **Test properties I: sensitivity, specificity, and predictive values.** Hospital Physician, 27-31.
- UMAREDDY I., CHAO A., SAMPATH A., GU F., VASUDEVAN S.G. (2006) **Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA.** Journal of Genebra Virology, 87, 2605-2614.
- ZANLUCA C., MELO V.C.A., MOSIMANN A.L.P., SANTOS G.I.V., SANTOS C.N.D., LUZ K. (2015) **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 110(4), 569-572.
- ZHAO H., FERNANDEZ E., DOWD K.A., SPEER S.D., PLATT D.J., GORMAN M.J., GOVERO J., NELSON C.A., PIERSON T.C., DIAMOND M.S., FREMONT D.H. (2016) **Structural basis of zika virus-specific antibody protection.** CellPress, Elsevier, 166, 1016-1027.