MARCÍLIO JORGE FUMAGALLI

**Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus
Chikungunya e Mayaro**

Versão Original

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fumagalli, Marcilio Jorge

Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro. Marcílio Jorge Fumagalli; Orientador, Luiz Tadeu Moraes Figueiredo - 2018

65 f. : il.; 30cm

Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Versão Original

1 – Arbovírus. 2 – Diagnóstico Sorológico. 3 – Chikungunya. 4 – Mayaro. 5 – *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA)

Folha de Aprovação

Nome: Marcílio Jorge Fumagalli

Título: Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____ de _____ de 2018,

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

De coração, agradeço,

Ao meu querido pai José Jorge, por estar presente em minha vida todos os dias, ainda que não fisicamente, por ser o grande responsável pela pessoa que me tornei, minhas maiores virtudes vieram de você.

À minha amada mãe Samira, que me ama incondicionalmente desde o momento em que nasci, ainda que eu não diga, você sempre foi meu porto seguro.

Ao meu professor e orientador Luiz Tadeu Moraes de Figueiredo, que depositou sua confiança em mim durante esta breve jornada, sempre com bom humor e com responsabilidade, tratou de me lapidar ao longo desses anos, você tem feito um ótimo trabalho.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP, em especial à Ana Cristina, que sempre esteve presente e solícita nos momentos de necessidade.

Ao amigo e parceiro de pesquisa William Marciel de Souza, que desde sempre demonstrou um grande carinho comigo, você fez e continua fazendo toda a diferença no meu caminho.

À todos os colegas e amigos do Centro de pesquisa em Virologia, em especial à Marília, Leonardo (Léo), Gilberto, Aline, Angélica e Danilo.

Aos funcionários do Centro de pesquisa em Virologia da FMRP, Adriana, Danillo, Pitty, Suelli, Leila e, em especial Soraya, que com muito amor, carinho e dedicação tornam possíveis as atividades de todos.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto, Luiz Gustavo e Lucas Teófilo, que tornaram a passagem do tempo muito mais prazerosa durante esses anos.

À Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo pela concessão da bolsa (Processo 2016/01414-1) e apoio financeiro, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, de minha formação profissional e intercâmbio de conhecimento.

RESUMO

FUMAGALLI, Marcílio Jorge. **Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro**. 2018. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Devido a existência de 2 alphavírus artritogênicos no Brasil, os vírus Mayaro (MAYV) e Chikungunya (CHIKV) tornou-se importante desenvolver testes diagnósticos eficazes para discriminar suas infecções. No presente trabalho, desenvolvemos ELISAs indiretos para diagnóstico de CHIKV e MAYV utilizando proteínas de envelope viral E2 recombinantes, produzidas em *Escherichia coli*, as rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs. As proteínas E2 recombinantes tiveram suas antigenicidades verificadas nos ensaios utilizando anticorpos policlonais oriundos de camundongos hiperimunizados com CHIKV, MAYV e outros alphavírus. O rE2-CHIKV ELISA detectou anticorpos murinos de forma homotípica e não produziu reações cruzadas evidenciáveis utilizando anticorpos murinos específicos contra outros *Alphavírus*. O rE2-MAYV ELISA detectou anticorpos murinos homotípicos e também, reagiu cruzadamente com anticorpos murinos anti-CHIKV, mas não para outros *Alphavírus*. Esses ELISAs, também, foram usados na detecção de anticorpos em soros de pacientes com suspeita de infecção arboviral. Pelo o rE2-CHIKV ELISA, testaram-se 59 soros, resultando em 26 amostras IgG positivas. Resultados desse ELISA, quando comparados aos obtidos por teste de neutralização, demonstraram sensibilidade de 89,66% e especificidade de 100%. Soros humanos IgG positivos foram detectados em altas diluições pelo rE2-CHIKV ELISA. Quanto a detecção de IgM, o rE2-CHIKV ELISA apresentou moderada concordância com outros ensaios sorológicos. Com rE2-MAYV ELISA, testaram-se 68 soros resultando em 23 amostras IgG positivas, das quais 11 também mostraram-se positivas em teste de neutralização, demonstrando sensibilidade de 100% e especificidade de 78,95%. Portanto, os rE2-CHIKV e rE2 MAYV ELISAs, particularmente para detecção de IgG, mostraram-se adequadamente sensíveis e específicos para serem validados em estudos com maiores números de amostras e serem aplicados ao diagnóstico de pacientes infectados com CHIKV e MAYV.

Palavras-chave: Arbovírus, ELISA, Chikungunya, Mayaro, Proteína de Envelope e Diagnóstico.

ABSTRACT

FUMAGALLI MJ. **Development of methods for serological diagnose of Chikungunya and Mayaro infections.** 2018. Dissertation (Master Degree) – Basic and Applied Immunology Graduate School – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Due the existence of 2 arthritogenic alphaviruses in Brasil, the viruses Mayaro (MAYV) and Chikungunya (CHIKV), it became important the development of efficient diagnose tests to discriminate their infections. In the present work, we developed indirect ELISAs for CHIKV and MAYV diagnosis using viral recombinant envelope proteins E2, produced in *Escherichia coli*, the rE2-CHIKV and rE2-MAYV. The recombinant E2 proteins had their antigenicity confirmed in the assay by using polyclonal antibodies produced in hyperimmunized mice with CHIKV, MAYV and other alphaviruses. The rE2-CHIKV ELISA detected homotypic murine antibodies and did not produced detectable cross-reactivity signal when using murine antibodies from other alphaviruses. The rE2-MAYV ELISA detected homotypic antibodies and also cross-reacted with murine anti-CHIKV antibodies, but not to other alphaviruses. These ELISAs were also tested for the detection of human antibodies, using patient sera suspected of arboviral infection. For rE2-CHIKV ELISA, it were tested 59 sera, resulting in 26 positive IgG samples. These ELISA results, when compared to those of a neutralizing assay, demonstrated a sensibility of 89.66% and specificity of 100%. The IgG positive human sera were detected in high dilutions by rE2-CHIKV ELISA. Regarding the detection of IgM, the rE2-CHIKV ELISA showed a moderate samples detection agreement when compared to other serologic assays. For rE2-MAYV ELISA, it were tested 68 sera, resulting in 23 positive IgG samples, of which 11 demonstrated to be positive by the neutralization assay, demonstrating a sensibility of 100% and specificity of 78.95%. Therefore, the rE2-CHIKV and rE2-MAYV ELISAs, especially for IgG detection, demonstrated to be properly sensitive and specific to be validated in studies using a greater number of samples, and also to be applied in the diagnosis of infected CHIKV and MAYV patients.

Keywords: Arbovirus, ELISA, Chikungunya, Mayaro, Envelope protein and Diagnose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo mantenedor dos arbovírus	12
Figura 2. Organização genômica dos Alphavirus	14
Figura 3. Reconstrução 3D de uma unidade assimétrica viral do VEEV contendo as proteínas estruturais	15
Figura 4. Criomicroscopia eletrônica de VEEV e mapa tridimensional baseado na densidade criomicroscópica da partícula de VEEV	16
Figura 5. Esquema do ciclo replicativo dos alphavirus	19
Figura 6. Esquema da patogênese nas infecções por alphavírus artritogênicos	21
Figura 7. Países onde reportaram-se casos de Chikungunya	22
Figura 8. Construção genômica utilizada para expressar as proteínas recombinantes E2 de CHIKV e MAYV	27
Figura 9. Esquema de microplaca mostrando a sensibilização com rE2 e aplicação dos FAIMs	30
Figura 10. Teste rápido imunocromatográfico utilizado para detecção de IgG e IgM em amostras humanas	36
Figura 11. Imagens de géis de SDS-PAGE e de <i>Western blot</i> marcado com anti-His, das proteínas rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV	37
Figura 12. Imagens de testes de imunofluorescência indireta com células Vero infectadas pelos alphavirus AURV, CHIKV, EEEV, WEEV, MUCV e MAYV reagindo com seus respectivos FAIMs e tendo células não infectadas como controle-negativo	38
Figura 13. Placa utilizada no teste de FAIM específico por rE2-CHIKV ELISA	39
Figura 14. Placa utilizada no teste de FAIM específico por rE2-MAYV ELISA	40
Figura 15. Análise da reatividade cruzada entre diferentes anticorpos policlonais específicos	

contra alphavírus com rE2-CHIKV ELISA	48
Figura 16. Análise da reatividade cruzada entre diferentes anticorpos policlonais específicos de alphavírus com rE2-MAYV ELISA	49
Figura 17. Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais (FAIMs) anti-rE2-CHIKV e anti-rE2-MAYV em rE2-CHIKV ELISA e rE2-MAYV ELISA	49
Figura 18. Resultado (D.O.) mostrando ausência de reações positivas (cruzadas) no IgG rE2-MAYV ELISA analisando 24 amostras humanas IgG positivas pelo rE2-CHIKV ELISA e com anticorpos neutralizantes para CHIKV	50
Figura 19. Resultado (D.O.) evidenciando reações positivas (cruzadas) no IgG rE2-CHIKV ELISA nos testes de 11 amostras humanas IgG positivas pelo rE2-MAYV ELISA e com anticorpos neutralizantes para MAYV	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências nucleotídicas das proteínas recombinantes rE2-CHIKV e rE2-MAYV	26
Tabela 2. Informações sobre painel de amostras humanas utilizado para cada um dos ensaios ..	31
Tabela 3. Esquema da placa de ELISA utilizado para titulação sérica	32
Tabela 4. Tabela para comparação dos resultados do CHIKV e MAYV IgG rE2-ELISA com teste previamente validade e/ou reconhecidos e utilizados rotineiramente	33
Tabela 5. Sensibilidade e especificidade dos CHIKV e MAYV IgG rE2-ELISAs com base em resultados plotados na tabela 4	33
Tabela 6. Sumário das condições adotadas nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs, determinadas com base nos ensaios utilizando FAIMs	40
Tabela 7. Resultados e títulos séricos de IgG e IgM anti-Mayaro obtidos por rE2-MAYV ELISA, também incluindo resultaods do PRNT ₅₀ para MAYV	42
Tabela 8. Sensibilidade e especificidade dos IgG rE2-CHIKV e MAYV ELISAs quando estes resultados foram comparados com aqueles obtidos por PRNT ₅₀ para CHIKV e MAYV	42
Tabela 9. Resultados incluindo títulos de IgG e IgM anti-CHIKV obtidos de 59 amostras séricas, por diferentes testes sorológicos	43
Tabela 10. Sensibilidade e especificidade dos ensaios para IgG dos soros humanos por rE20CHIKV ELISA, EIA-ICC para CHIKV, vírus ELISA para CHIKV e teste rápido para CHIKV, todos comparados ao PRNT ₅₀ para CHIKV	44
Tabela 11 Concordância de detecção de IgM de rE2-CHIKV ELISA com os demais testes sorológicos	45
Tabela 12. Avidez de anticorpos anti-CHIKV em amostras IgG e IgM positivas por rE2-CHIKV ELISA	46

Tabela 13. Avidéz de anticorpos anti-MAYV em amostras igG e IgM positivas por rE2-MAYV

ELISA47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Arbovírus	12
1.2 <i>Alphavirus</i>	13
1.2.1 Genoma e Estrutura dos Alphavírus	13
1.2.2 Proteína de Envelope 2	16
1.2.3 Ciclo replicativo	17
1.2.4 Manifestações clínicas dos alphavirus artritogênicos	19
1.2.5 Patogênese dos alphavírus artritogênicos	20
1.2.6 Epidemiologia do vírus Chikungunya	21
1.2.7 Epidemiologia do vírus Mayaro	22
1.3 Diagnóstico Laboratorial de infecções por CHIKV e MAYV	23
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Amostras Séricas	25
3.2 Amostras Virais	25
3.3 Preparo dos fluídos ascíticos imune murinos (FAIMs)	25
3.4 Clonagem, expressão e purificação da proteína E2 de CHIKV e MAYV	26
3.5 Avaliação das proteínas recombinantes	27
3.5.1 <i>SDS-PAGE</i>	27
3.5.2 <i>Western blot</i>	28
3.5.3 Ensaio de imunofluorescência utilizando FAIMs	29
3.6 Padronização dos ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico de CHIKV e MAYV	29
3.7 Avaliação da Reatividade Cruzada	31
3.8 Teste de amostras humanas com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV	31
3.8.1 Sensibilidade e especificidade dos ELISAs com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV	32
3.8.1.1 Teste de neutralização por redução de placas virais (PRNT)	33
3.8.2 Ensaio de Avidéz	34
3.8.3 Reatividade cruzada entre amostras humanas	35
3.9 Comparação do rE2-CHIKV ELISA com outras técnicas sorológicas para CHIKV	35

3.10	Reatividade cruzada entre Anti-E2 x rE2-CHIKV/MAYV ELISAs	36
4.	RESULTADOS	36
4.1	As proteínas recombinantes rE2-CHIKV e rE2-MAYV	36
4.2	Análise da especificidade dos FAIMs de alphavirus	37
4.3	Padronização dos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs	39
4.4	Deteção de anticorpos IgG e IgM para CHIKV e MAYV em soros humanos utilizando rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs	41
4.5	Comparação entre resultados obtidos com rE2-CHIKV ELISA e os ensaios sorológicos EIA-ICC, Vírus ELISA, teste rápido imunocromatográfico e PRNT ₅₀	43
4.6	Ensaio de avididade de anticorpos nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs	45
4.7	Reatividade cruzada de FAIMs e soros humanos quando analisados por rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs	48
4.7.1	Reatividade cruzada de FAIMs	48
4.7.2	Reatividade cruzada dos FAIMs anti-rE2-CHIKV e anti-rE2-MAYV nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs	49
4.7.3	Amostras humanas	50
5.	DISCUSSÃO	51
6.	CONCLUSÕES	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Arbovírus são vírus transmitidos a diferentes hospedeiros, tais como mamíferos, pássaros e répteis, através de um vetor artrópode hematófago. O ciclo de transmissão enzoótica requer interação temporal entre o vírus, o vetor e o hospedeiro, permitindo a aquisição viral a partir de um hospedeiro infectado por um vetor susceptível e capaz de transmitir o vírus por sua saliva para um novo hospedeiro [1]. A maioria dos arbovírus pertence aos gêneros *Alphavirus* (família *Togaviridae*), *Flavivirus* (família *Flaviviridae*), *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* [2]. Portanto, arbovírus, com exceção daqueles da família *Asfaviridae*, são vírus de RNA mantidos na natureza através de ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos, que alimentam-se do sangue de animais hospedeiros, como pássaros e mamíferos [3] (**Figura 1**).

Figura 1. Ciclo mantenedor dos arbovírus.

Fonte: Adaptado de Rudolph *et al.* [4].

O Brasil é um país tropical, com ricos ecossistemas naturais e uma grande diversidade de fauna e flora, possuindo condições ideais para a existência de muitos arbovírus mantidos em ciclos zoonóticos. Também, existe um elevado risco para aparecimento de arbovírus emergentes no Brasil relacionado à existência de grandes e populosas cidades, que são infestadas por mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Ainda, isto se agrava pelo elevado desmatamento provocado pelo homem desequilibrando ecossistemas naturais e facilitando disseminação viral. No atual cenário epidemiológico brasileiro, as arboviroses mais importantes são aquelas causadas pelos vírus do dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), e febre amarela (YFV), que têm re-emergido no país [5].

1.2 *Alphavirus*

Arbovírus do gênero *Alphavirus* são pequenos vírions esféricos e envelopados, contendo um genoma de RNA encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártica. [6]. Este gênero da família *Togaviridae*, inclui 32 espécies virais reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), sendo 31 espécies pertencentes aos gênero *Alphavirus* [7]. Os *Alphavirus*, com base no local original de isolamento, podem ser do Velho ou do Novo Mundo, [8]. São alphavírus do Novo Mundo, os vírus da *Encefalite Equina do Leste* (EEEV), da *Encefalite Equina Venezuelana* (VEEV) e da *Encefalite Equina do Oeste* (WEEV), causadores de encefalite humana e em cavalos. Por outro lado, os alphavírus do Velho Mundo, são o CHIKV, *O'Nyong-Nyong* (ONNV), *Ross river* (RRV), *Semliki forest* (SFV) e *Sindbis* (SINV), causadores de doença febril aguda com artralgia que raramente resulta em morte [9].

1.2.1 Genoma e Estrutura dos Alphavírus

O genoma dos alphavírus consiste de uma fita simples de RNA com polaridade positiva de ~12kb de comprimento [10, 11]. O genoma contém dois quadros abertos de leitura (*Open Reading Frame* - *ORFs*), o primeiro localizado à 5' do genoma, codifica as proteínas não estruturais e o segundo, localizado à 3' do genoma, em região controlada por um promotor subgenômico, codifica para as proteínas estruturais (**Figura 2**) [8]. Ambos os quadros de leitura produzem polipeptídeos que são posteriormente clivados por proteases virais ou do próprio hospedeiro, originando quatro proteínas não estruturais (nsP1-4), envolvidas na patogênese e na

replicação do RNA viral e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, E1) (**Figura 3**), requeridas para montagem e brotamento viral [12, 13].

Figura 2. Organização genômica dos Alphavirus.

Fonte: Adaptado de Mota *et al.* [14].

As quatro proteínas não estruturais dos alphavírus possuem diversas funções durante a infecção. Demonstrou-se com SFV e SINV, que a proteína não estrutural 1 (nsP1) possui atividade de *guanine-7-methyltransferase* e *guanylyl transferase*, ambas necessárias ao capeamento e metilação de novas fitas do RNA viral genômico e subgenômico. Também, estudos envolvendo transfecção da nsP1 em células HeLa, fizeram supor que durante a replicação viral a nsP1 ancora os complexos replicativos à membrana plasmática [15-17]. Quanto à proteína não estrutural 2 (nsP2), demonstrou-se em SFV e SINV, que a mesma possui duas regiões de atividade catalítica, uma na porção N-terminal com atividade de helicase [18] e outra, na porção C-terminal, com atividade Cisteíno protease, ambas necessárias ao processamento do polipeptídeo das proteínas não-estruturais [12]. A proteína não estrutural 3 (nsP3), com base em estudos cristalográficos com CHIKV e VEEV, indica que a região N-terminal atua como fosfatase e ligante à molécula de RNA [19]. Outros estudos moleculares da nsP3, relacionam a mesma à modulação da patogenicidade viral [20, 21]. Por último, a proteína não estrutural 4 (nsP4) atua como RNA polimerase RNA-dependente (RdRP), responsável pela síntese das fitas de RNA da progênie viral [22].

As proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1, formam as partículas virais. Estudos mutacionais com SINV mostraram a proteína de capsídeo viral (C) ligando-se à fita de RNA genômico via interação com sua região N-terminal, que é crítica para a correta encapsidação, durante a formação do nucleocapsídeo viral, [23]. Na região C-terminal de C, encontra-se a região com funções proteolíticas, domínios que promovem a interação de proteínas de capsídeo entre si e com domínios citoplasmáticos das glicoproteínas virais durante seu brotamento. Portanto, C é fundamental para a produção e viabilidade viral [24]. A função da proteína de

envelope 3 (E3), não completamente elucidada, parece desempenhar funções diferentes em diversas espécies de alphavírus. Para CHIKV, SINV e WEEV, observou-se que E3 não permanece incorporada às partículas virais maduras [25] contrastando com o SFV, que mantém esta proteína associada à sua partícula [26]. Estudos de microscopia eletrônica com SINV e RRV, determinaram que a proteína de envelope 2 (E2), desempenha função de reconhecimento e ligação com receptor celular do hospedeiro, sendo diretamente relacionada ao tropismo viral [27]. Ainda, demonstrou-se que mutações aminoacídicas em E2 estão diretamente relacionadas à neurovirulência do SINV infectando camundongos [28]. A proteína 6K atua na montagem da partícula viral [29] e funciona como canal iônico seletivo capaz de alterar a permeabilidade da membrana celular. Porém a função de 6K durante o ciclo viral, ainda, não é completamente entendida [30]. Por último, a proteína de envelope 1 (E1) é uma proteína de fusão à membrana celular do hospedeiro, contendo região peptídica de fusão altamente conservada e hidrofóbica [31, 32].

Figura 3. Reconstrução tridimensional de uma unidade assimétrica de VEEV incluindo as proteínas estruturais, com quatro cópias de E1 (roxo), E2 (Ciano), E3 (Laranja) e CP (Azul). A membrana e o RNA genômico viral estão representados em amarelo e verde, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* [33].

Os *virions* de alphavírus possuem estruturas icosaédricas, com número de triângulação (T) = 4 e diâmetro aproximado de 50 - 70nm ($\text{\AA}$) (**Figura 4A**) [34]. O envelope dos alphavírus consiste de bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro, com aproximadamente 240 cópias de E1 e E2 inseridas na membrana [8]. E1 e E2 interagem entre si na proporção 1:1 formando heterodímeros, estruturas rígidas na superfície viral, agrupando-se em 80 espículas (**Figura 4B**).

Figura 4. A. Criomicroscopia eletrônica de VEEV mostrando seu tamanho aproximado. Barra de escala: 50nm. **B.** Mapa tridimensional baseado na densidade criomicroscópica da partícula de VEEV, mostrando suas proteínas estruturais, bicamada lipídica e espículas de E1/E2.

Fonte: Adaptado de Zhang *et al.* [33].

1.2.2 Proteína de Envelope 2

A E2 dos alphavírus é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, com 50 kDa, organizada em 3 domínios similares à imunoglobulina, chamados A, B e C. Esta proteína possui 423 aminoácidos de comprimento, com 33 resíduos presentes em seu domínio citoplasmático. A proteína E2 é glicosilada com quantidades e posições de suas cadeias de carboidratos variáveis entre os alphavírus [8]. E2 é formada a partir de uma proteína de envelope precursora (pE2), que é clivada em sua região luminal, durante o ciclo replicativo viral, por uma protease similar à furina do hospedeiro ou do vetor, após atingir a região *trans* golgi originando as proteínas E2 e

E3 maduras [35]. Tal clivagem enfraquece a interação entre os heterodímeros E1-E2 permitindo que o peptídeo de fusão seja ativado quando exposto a um pH mais baixo [36]. E2 ancora na membrana por sua região C-terminal [37, 38]. E2 é conhecida por mediar a ligação viral ao receptor de membrana das células alvo e induzir endocitose durante o ciclo replicativo dos alphavírus [39].

A maioria dos anticorpos produzidos nas infecções por alphavírus, são direcionados à proteína E2, que cobre parcialmente a proteína E1 e é mais exposta na superfície viral [40]. Em infecções por CHIKV, demonstrou-se a imunogenicidade da E2 em ELISA, por produzir anticorpos neutralizantes e utilizando anticorpos monoclonais. Portanto, E2 é um importante antígeno dos alphavírus podendo ser utilizada em métodos de diagnóstico laboratorial e como candidata a vacina [41-44].

1.2.3 Ciclo replicativo

Os alphavírus infectam ampla gama de hospedeiros, incluindo vertebrados, tais como pássaros, mamíferos e répteis, e invertebrados, como mosquitos e outros artrópodes hematófagos [45-47]. Os alphavírus replicam em grande variedade de células de seus hospedeiros, como, células neuronais, gliais, musculares lisas e estriadas, linfóides, sinoviais e do tecido adiposo marrom [8]. O receptor específico de entrada celular dos alphavírus, foi identificado para SINV por *screening* de RNA de interferência (RNAi) em células de mamíferos e insetos. Trata-se da ‘proteína de macrófago associada-resistência natural’ (nRAMP). A nRAMP é uma proteína celular amplamente conservada, de bactérias a seres humanos, envolvida no transporte de íons metálicos pela membrana plasmática [48].

Experimentos com SINV e SFV elucidaram os processos envolvidos na entrada celular dos alphavírus. Após a ligação ao receptor celular do hospedeiro, ocorre mudança conformacional nas glicoproteína E2 e E1 [49]. Em seguida, a partícula viral é endocitada em vesícula dependente de clatrina [50] formando um endossomo, que ao maturar, altera seu interior a um pH mais ácido. A acidificação desestabiliza os heterodímeros de E1-E2 e expõe o peptídeo de fusão da glicoproteína E1 à membrana celular [51, 52]. O peptídeo de fusão é inserido na membrana endossomal formando poro por onde passa o nucleocapsídeo viral para atingir o citoplasma celular. Após a liberação do nucleocapsídeo o mesmo se dissocia liberando o genoma viral para tradução por vias ainda pouco elucidadas [53].

Os quadros de leitura do genoma viral são traduzidos para gerar os polipeptídeos estruturais (P123 e P1234) e não estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). As proteínas não-estruturais são traduzidas diretamente a partir do genoma de RNA viral, que, para a maioria dos alphavírus geram duas poliproteínas, P123 e P1234. Estas são processadas exclusivamente por proteases virais localizadas na proteína nsP2 [8]. O polipeptídeo P123 parcialmente processado e a nsP4 formam complexo replicativo capaz de sintetizar uma fita intermediária de RNA(-) do genoma viral, que servirá de molde para síntese do RNA(+) genômico e para transcrição de RNA(+) da região subgenômica, que contém as proteínas estruturais virais [54]. Após processamento total das proteínas não estruturais em nsP1, Nsp2, nsP3 e nsP4, estas formam um complexo replicativo estável, capaz de sintetizar novas fitas de RNA(+) genômico viral, que são incorporadas à progênie [55] (**Figura 5**).

Para formação das proteínas estruturais, forma-se um RNA(+), o 26S RNA, produzido a partir da fita de RNA(-) intermediária. O 26S RNA, é produzido na região interna ribossomal (IRES) na fita de RNA(-) [8]. Após a tradução, o polipeptídeo sintetizado C-pE2-6K-E1 é processado para liberar a proteína de capsídeo (C) no citoplasma celular e o polipeptídeo resultante pE2-6K-E1, é transportado ao retículo endoplasmático e depois ao Complexo de Golgi, onde sofre modificações pós-traducionais antes de ser transportado para a membrana celular para compor as proteínas de envelope viral durante o brotamento [56] (**Figura 5**).

Figura 5. Esquema do ciclo replicativo dos alphavirus.

Fonte: Adaptado de Mota *et al.* [14].

1.2.4 Manifestações clínicas dos alphavirus artritogênicos

As infecções por alphavírus podem ser assintomáticas ou resultarem em doenças moderadas ou severas. Os alphavírus de Velho ou do Novo Mundo possuem formas distintas de patogenicidade, tropismo celular, citotoxicidade e capacidade de interferir com as respostas do sistema imune [57]. A maioria das infecções humanas, ou à outros vertebrados, por alphavírus, são consideradas infecções finais, pois tais indivíduos não são capazes de transmitir o vírus a um novo hospedeiro [54].

Simplificadamente, os alphavírus ao infectarem o homem, podem produzir encefalites, o que predomina entre os do Novo Mundo, e poliartrite entre os do Velho Mundo [2]. Os alphavírus artritogênicos, por exemplo o CHIKV e MAYV, podem causar uma doença aguda com aparecimento dos sintomas de 3 a 10 dias após a infecção, com viremia que pode perdurar de 4 a 7 dias [58, 59]. A doença, também, inclui febre, cefaleia, petéquias cutâneas, fadiga, artrite, artralgia e mialgia [60]. A febre pode estar ausente em infecções por SINV e RRV [61, 62]. As petéquias cutâneas ocorrem em 40% dos casos e podem aparecer, antes, durante ou depois da artralgia, perdurando por 7 à 10 dias [63, 64]. A artrite é um sintoma comum nas infecções por

estes vírus. A recuperação da dor e do inchaço articular ocorre após alguns dias, entretanto, vários relatos descrevem a persistência de dores nas articulações após meses ou anos [59, 65, 66]. A artralgia, na maioria das vezes, ocorre em pequenas articulações dos dedos e pulsos, e eventualmente em articulações maiores, como joelhos e ombros, podendo ainda envolver dores simultâneas de múltiplas articulações [61, 66, 67]. Também, a mialgia é um sintoma comum durante a infecção por alphavírus, resultado do tropismo viral por células musculares [68].

1.2.5 Patogênese dos alphavírus artrítogênicos

Após a inoculação subcutânea do alphavírus pela picada de artrópodo hematófago, a disseminação viral ocorre por vasos linfáticos e sanguíneos. A leucopenia é comum durante a fase aguda da doença, e sugere que leucócitos possam ser sítios primários de replicação viral [69, 70]. Também, o fígado e o baço são considerados sítios primários de replicação e consequente disseminação viral [71]. Ainda, alphavirus durante infecções agudas acometem os ossos, músculos e tecidos articulares, ocasionando processos inflamatórios locais caracterizados por extenso infiltrado linfocitário, e também de células *natural killers*, neutrófilos e macrófagos [72-74] (**Figura 6**). A gravidade da doença e a persistência dos sintomas está relacionada à extensão da replicação viral no hospedeiro e à presença de mediadores pró-inflamatórios presentes no sangue dos pacientes [73].

Figura 6. Esquema da patogênese nas infecções por alphavírus artritogênicos.

Fonte: Adaptado de Assuncao-Miranda *et al.* [75].

1.2.6 Epidemiologia do vírus Chikungunya

O CHIKV foi primeiramente isolado de um caso humano em estado febril, em 1952-1953 durante epidemia de dengue em Letheo, na Tanzânia [76]. Também, foi responsável por surtos na África e Ásia na década de sessenta (**Figura 7**). Em 2004, após relativa inatividade, o CHIKV re-emergiu no Kênia e Camarões, causando cerca de 5.000 casos. Evidências mostram que este vírus se espalhou em direção as ilhas no oceano Índico, infectando aproximadamente 300.000 pessoas (40% da população) em La Reunion, durante 2005 e 2006 [54]. A epidemia atingiu a Índia em 2006, onde 1,4 – 6 milhões de pessoas foram infectadas até 2007 [77]. A primeira ocorrência de CHIKV no hemisfério ocidental ocorreu na ilha caribenha de *Saint Martin* em 2013, com 25 casos suspeitos [78]. Desde então, o vírus se espalhou rapidamente tendo sido identificado em 48 países das Américas, produzindo mais de 1 milhão de casos até o início de 2016 [79]. Entre 2016

1.3 Diagnóstico Laboratorial de infecções por CHIKV e MAYV

Atualmente, o diagnóstico de infecções por CHIKV ou MAYV, durante a fase aguda, é feita por isolamento viral ou detecção de seus genomas, utilizando a reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR). Também, descreveram-se testes imunoenzimáticos usando anticorpos monoclonais para captura de antígenos virais [88, 89]. Entretanto, estes ensaios permitem diagnosticar CHIKV e MAYV apenas durante o estado virêmico do paciente, em curto período de aproximadamente 6 dias [90]. Portanto, a confirmação da infecção após a fase virêmica requer testes sorológicos com pesquisa de anticorpos específicos.

Para o CHIKV, tem sido descritos testes sorológicos *in-house* e comerciais utilizando antígenos virais nativos [44] e antígenos recombinantes protéicos [42, 91]. Estes ensaios são capazes de detectar anticorpos específicos de CHIKV e de outros alphavírus devido a reatividade cruzada dos anticorpos, reduzindo assim sua especificidade. Quanto ao desempenho dos testes comerciais de diagnóstico rápido para detecção de anticorpos, estes apresentam baixa sensibilidade [92, 93].

Para MAYV, o diagnóstico laboratorial após a fase virêmica é realizado por metodologias *in-house* de detecção de anticorpos utilizando, por exemplo, ensaio de inibição da hemaglutinação [94] ou ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno [84]. Existe, também, o clássico ensaio de soro neutralização como uma ferramenta alternativa para o diagnóstico específico, porém, é laborioso e requer pessoal treinado. Portanto, há carência de testes mais simples, específicos e sensíveis para detectar anticorpos de MAYV.

Diante de tal contexto, é importante e urgente que se desenvolvam métodos laboratoriais de diagnóstico para CHIKV e MAYV no país, permitindo que pacientes sejam diagnosticados e que permitam estudar aspectos clínicos e epidemiológicos de tais viroses. É importante ressaltar que a ausência do diagnóstico e da divulgação de tais viroses, resulta em desconhecimento sobre sua ocorrência. Desta forma a confusão diagnóstica com dengue combinada à falta de métodos diagnósticos e à restrição da realização do diagnóstico que é feito em poucos laboratórios do país, pode levar à falsa impressão de que surtos causados por CHIKV e MAYV não ocorram em certas regiões do Brasil.

2. OBJETIVOS

Objetivamos nesta Dissertação de Mestrado, desenvolver testes sorológicos, com detecção de anticorpos IgG e IgM específicos, para diagnóstico de infecções por CHIKV e MAYV.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Padronizar ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISAs) utilizando peptídeos recombinantes de CHIKV e MAYV;
- ✓ Validar os ensaios diagnósticos utilizando amostras de pacientes infectados com CHIKV e MAYV;
- ✓ Avaliar especificidade e sensibilidade dos ensaios padronizados;
- ✓ Avaliar reatividade cruzada dos ensaios padronizados analisando outras infecções virais;
- ✓ Realizar ensaios de avidéz entre os peptídeos recombinantes e os repectivos anticorpos homotípicos de amostras IgG ou IgM humanas positivas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado integralmente no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brasil.

3.1 Amostras Séricas

Foram testadas no presente trabalho, dois painéis de amostras séricas de pacientes suspeitos de infecção arboviral aguda ou convalescente. O primeiro, incluiu 59 amostras provenientes do estado de São Paulo, com comitê de ética aprovado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto - SP, processo nº 2.206.200. O segundo painel, incluiu 68 amostras, provenientes do estado de Goiás, gentilmente cedidas pela professora Renata Dezegrini Shessarenko da Universidade Federal de Mato Grosso, com comitê de ética aprovado pelo Hospital Universitário Júlio Müller processo nº 1.164.656.

3.2 Amostras Virais

Foram utilizadas amostras dos vírus MAYV, cepa BeAr20290, originalmente isolada de mosquitos *Haemagogus* em 1960, presente na virooteca do Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. E também o vírus CHIKV, cepa BZH1, originalmente isolada de paciente em 2014, gentilmente cedida pelo Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca.

3.3 Preparo dos fluídos ascíticos imune murinos (FAIMs)

Para obtenção dos FAIMs específicos, conforme previamente descrito [95], camundongos BALB/c de 4 semanas de vida foram inoculados via intra-peritoneal semanalmente, durante 4 semanas, com 100µl de suspensão viral, produzida em cérebro de camundongos recém-nascidos e diluídas em *Phosphate buffer-saline* (PBS) ou com as rE2 de CHIKV e MAYV, utilizando 30µg de proteína por dose. Simultaneamente à última imunização, inocularam-se, via-intraperitoneal, células de sarcoma TGO-180. Os camundongos foram observados até o surgimento da ascite, que foi coletada, centrifugada e o sobrenadante estocado à -20°C.

3.4 Clonagem, expressão e purificação da proteína E2 de CHIKV e MAYV

As sequências nucleotídicas das proteínas de E2 dos CHIKV e MAYV (**Tabela 1**) foram determinadas baseando-se nos isolados ‘DRDE-06’ [96] e ‘BR/SJRP/LPV01/2015’ [97] respectivamente, estas sequências foram sintetizadas e clonadas no vetor de expressão pET-30a (**Figura 8**). Em seguida, as proteínas foram expressadas em sistema procarioto utilizando células *Escherichia coli* e purificadas em sua forma nativa pela empresa GenScript (EUA).

Tabela 1. Sequências nucleotídicas das proteínas recombinantes E2 de CHIKV e de MAYV.

Região	Sequência nucleotídica
E2 CHIKV (1173bp)	CATATGCATCATCACCATCATCATCCGTATCTGGCGCATTGTCCGGATTGCGGCGAAGGTCATAGTTGTCATAGTCCGGT TGCGCTGGAACGTATTGTAACGAAGCAACCGACGGTACCCTGAAAATCCAGGTTAGCCTGCAGATCGGCATCAAAACC GACGATAGTCACGATTGGACCAAACGCGTTACATGGACAATCACATGCCGGCAGACGCAGAACGCGCAGGTCTGTTT GTTCTGACCTCTGCACCGTGTACCATTACCGGTACCATGGGCCATTTTCATTCTGGCACGTTGTCCGAAAGGCGAAACCTT GACCGTTGGTTTTACCGATAGCCGAAAATCAGCCATAGCTGTACCCATCCGTTTCATCACGATCCGCCGGTTATTGGCC GCGAAAAATTTTCATAGTCGTCCGCAGCACGGTAAAGAACTGCCGTGTAGCACCTACGTTCAAAGTACCGCAGCGACCAC CGAAGAAATTGAGGTTACATGCCGCCGATACCCCGGATCGTACCCTGATGAGTCAGCAGTCTGGTAATGTGAAAATC ACCGTTAACGCCAGACCGTTTCGCTATAAATGCAACTGCGGCGGTAGTAACGAAGGTCTGACCACCACCGATAAAGTCA TCAACAACGTGCAAAGTCGATCAGTGCCACGCAGCAGTCACCAACCACAAAAATGGCAGTACAACAGTCCGCTGGTTCC GCGTAACGCAGAACTGGGCGATCGTAAAGGCAAAATCCACATCCCGTTTCCGCTGGCAAACGTTACCTGTGCGGTTCCG AAAGCACGTAATCCGACCGTTACCTACGGCAAAAACAGGTCATCATGCTGCTGTATCCGGATCATCCGACCTGCTGTC TTATCGTAACATGGGCGAAGAACCGAATTACCAGGAAGAGTGGGTCATGCACAAAAAGAGGTCGTTCTGACCGTTCC GACCGAAGGTCTGGAAGTTACCTGGGGTAACAACGAGCCGTACAAATATTGGCCGCAACTGAGTACCAACGGTACCGC ACACGGTCATCCGCACGAAATTATTCTGTAATACTACGAGCTGTACCCGATGTGTATGTGCGCTCGTCTGCTGTTATTAC CCCGTATGAACTGACCCCGGGCGCAACCGTTCCGTTTCTGCTGAGCCTGATTGCTGTTAATGAAAGCTT
E2 MAYV (1230 bp)	CATATGCATCATCATCACCATCATAGCACCGCGAACCCTTAACGCGTACAACTGACCCGTCCTGACGTTGCATATTGC GCAGATTGCGGCATGGGTACATGTTGTCATTCCTCCGCAATGATCGAAAACATTCAAGCAGACGCAACCGACGGTACCC TGAAAATCCAGTTTGCAGCCAGATCGGTCTGACCAAAACCGATACCCACGATCACACCAAAATCCGCTACGCAGAAGG TCACGATATTGCAGAAGCGGCACGTAGTACCCTGAAAGTTTCCTCCAGCGAGTGACCGTTACCGGTACCATGGGC CATTTTATCCTGGCCAAATGTCCGCCGGGCGAAGCAATTTCTGTTAGTTTCGTCGACAGCAAAAACGAACATCGCACCTG CCGTATTGCGTTTCATCACGAACAGCGTCTGATTGGTCGCGAACGTTTACCGTACGTCGATCACGGTATTGAACTGC CGTGTACCACCTATCAACTGACCACCGCAGAAACCTCTGAAGAGATCGACATGCACATGCCGCCGGATATTCCGGATCG TACCATTCTGAGTCAGCAGAGCGGTAACGTCAAAATACCGTTAACGGCCGTACCGTTCTGTTATAGCTGTAGTTGCGGTA GTAAACCGTCTGGTACCACCACCGATAAAACCATCAACAGCTGCACCGTCGACAAATGTCAGGCGTACGTTACCTCC CATACCAATGGCAGTTTAATAGTCCGTTTGACCGCGCGCAGAACAGGCGGAACGTAAAGGCAAGTTACATCCCGT TTCGCTGATTAATACCACCTGTGCGGTTCCGCTGGCACCGGAAGCACTGGTTCTGTTGTAACGCGAAGCAACCTG AGTCTGCATCCGATTCATCCGACCTGCTGAGTTATCGTACCCTGGGCGCAGAACCGGTTTTGACGAACAGTGGATTAC CGCACAGACCGAAGTTACCATTCGTTCCGTTGAAGGCGTTGAATACAGTGGGGTAACCACAAACCGCAACGTCG TGGAGTCAACTGACCACCGAAGGTAAGCACACGGTTGGCCGCAGAAATCATCGAATACTACTACGGTCTGCATCCGA CCACCACGTTGCTCGTAACAAATGTCTGACCCGTATGCACTGACCCCGGGCGCAGTTGTTCCGTTACCATGGCGTTT TGTGTTGCGCTCCGAAAGCACACGCATAATGAAAGCTT

Figura 8. Construção genômica utilizada para expressar as proteínas recombinantes E2 de CHIKV e MAYV.

Legenda: Ori – Origem de replicação plasmidial; KanR – Gene de resistência ao antibiótico Kanamicina; f1 Ori – Origem de replicação do bacteriófago F1; RBS – Sítio de ligação ribossomal; lac – região controle *lac operon*; T7 – Promotor da T7 RNA polimerase; LacR – Gene repressor do *lac operon*.

3.5 Avaliação das proteínas recombinantes

As proteínas recombinantes E2 de CHIKV e MAYV após purificação, foram analisadas quanto à sua pureza, integridade e massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) e por *Western blot*.

3.5.1 *SDS-PAGE*

A integridade e a qualidade de purificação das proteínas recombinantes foi analisada por *SDS-PAGE*. Para tanto, as mesmas foram submetidas a separação por corrente elétrica em gel de poliacrilamida a 12%. Resumidamente, o gel de separação foi preparado em solução contendo 33% água destilada, 40% de solução 30% de acrilamida (m/v), 25% de 1,5M Tris (pH 8,8), 1% de solução 10% (m/v) dodecil sulfato de sódio (SDS), 1% (m/v) de solução 10% de persulfato de amônia e 0,04% de solução polimerizadora de tetrametiletenodiamina (TEMED) (Thermo, EUA). Esta solução foi aplicada entre os suportes de vidro do equipamento contenedor dos géis de empilhamento e de separação. O gel de separação foi preparado pela adição de solução

contendo 68% de água destilada, 17% de solução 30% de acrilamida, 12,3% de 1M Tris (pH6,8), 1% de solução 10% (m/v) SDS, 1% de solução 10% (m/v) de persulfato de amônia e 0,1% de TEMED, o mesmo foi aplicado sobre o gel de empilhamento. Cada gel foi incubado aproximadamente 20 minutos para polimerização. Os géis foram então submergido em cuba de eletroforese (Biorad, EUA) contendo tampão de corrida (3% (m/v) Tris base, 14,4% (m/v) Glicina, 1% (m/v) SDS em água destilada). As amostras foram preparadas com adição de 10 µl de amostras + 10 µl de *Loading buffer* (100mM Tris-CL, 4% (m/v) SDS, 0,2% Azul de bromofenol e 10% (v/v) glicerol em água destilada) e 2µl de Dithiothreitol (DTT), foram aquecidas durante 5 minutos a 95°C e então aplicadas no gel. A corrida a 60V foi feita até as amostras atingirem o gel de separação quando alterou-se para 80V, até as amostras se aproximarem do fim do gel. Após a corrida, corou-se o gel por 30 minutos em solução *Comassie blue* a 2,5%, descorou-se com solução com 30% de Metanol, 7% de Ácido acético glacial e 63% de água destilada, sob agitação horizontal até a revelação das proteínas.

3.5.2 Western blot

Para saber se houve expressão das proteínas recombinantes realizamos *Western blot*. O aparato de corrida, uma cuba de eletroforese (Biorad, EUA), foi montado segundo especificações do fabricante. Do gel de SDS-PAGE pós-corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Thermo Fisher, EUA), em solução tampão de transferência contendo 3mM Glicina, 48mM Tris Base, 10% (m/v) SDS, 20% (v/v) metanol, em água destilada gelada, utilizando 100V por 1 hora. A membrana foi bloqueada por 2 horas em solução TBS-Tween 0,05%, 5% leite desnatado e lavada por 3 vezes em solução tampão TBS-Tween (20mM Tris base, 500mM NaCl, 0,05% [v/v] Tween® em água destilada). Em seguida, incubou-se a membrana por 1 hora, sob agitação vertical, com anticorpo monoclonal caprino Anti-polyHistidine conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:5000 em solução bloqueadora. Em seguida, lavou a membrana por 3 vezes com TBS-tween e 2 vezes com TBS e então, adicionou-se o substrato de quimioluminescência *Pierce™ ECL* (Thermo Fisher, EUA) para produzir imagem que foi visualizada no sistema *Chemi Doc™ XRS* (Biorad, EUA).

3.5.3 Ensaio de imunofluorescência utilizando FAIMs

Para confirmar a qualidade dos FAIMs contra diversos alphavirus, realizamos ensaios indiretos de imunofluorescência utilizando células vero infectadas [95]. Resumidamente, 1×10^5 células foram semeadas em lamínulas circulares de 0,13 – 0,16 mm de diâmetro em placas de 12 poços, incubadas por 1 noite a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Então, removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 200µl de solução viral contendo 2×10^5 unidades formadoras de placas (PFU), diluída em *meio Dulbeccos's Modified Eagle* (DMEM, Vitrocell Embriolife, Brasil) dos alphavírus utilizados no estudo. Incubou-se por 1 hora a 37°C sob leve agitação para adsorção viral e em seguida, adicionou-se 1ml de DMEM pré-aquecido incubando-se as células por 3 dias a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. Posteriormente, às células foram fixadas com 500µl de solução contendo 10% de formaldeído em PBS, durante 20 minutos a 37°C e permeabilizaram-se as mesmas com 500µl de solução de 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EUA) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Lavaram-se as células por 3 vezes com PBS, incubando 5 minutos a cada lavagem e estas foram bloqueadas com 500µl de solução contendo 1% de Albumina de soro bovino (m/v) e 5% de soro de cabra (v/v), por 15 minutos, a 37°C. As células foram lavadas 5 vezes com 1ml de PBS, incubadas por 5 minutos à cada lavagem, e então, adicionaram-se 200µl de cada solução contendo os respectivos FAIMs de alphavírus, diluídos 1:100 em solução de 1% de BSA em PBS, às respectivas monocamadas de células Vero infectadas, e incubou-se por 1 hora a 37°C. Às células foram novamente lavadas com 1ml de PBS por 5 minutos e adicionaram-se 200µl de solução contendo o anticorpo secundário anti IgG-murino conjugado a isotiocianata de fluoresceína (FITC – Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:300 em solução de PBS contendo 1% BSA, 0,2% Azul de Evans (m/v) e 0,1% de 4' 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI – Sigma-Aldrich, EUA). Incubou-se por 1 hora a 37°C, e então as células foram lavadas 5 vezes com 1ml de PBS, e as lamínulas circulares foram vertidas sobre lâmina de microscópio contendo uma gota de glicerol e examinadas em microscópio de fluorescência BX-40 (Olympus, EUA) acoplado à câmera digital DP73 (Olympus, EUA).

3.6 Padronização dos ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico de CHIKV e MAYV

Para o desenvolvimento de ELISAs indiretos visando a diagnosticar infecções causadas por CHIKV ou MAYV, utilizamos suas proteínas E2 recombinantes (rE2 de CHIKV ou rE2 de MAYV) como antígeno. Para a padronização, testamos diferentes concentrações de rE2 de

CHIKV ou rE2 de MAYV, entre 0,5µg/ml à 8µg/ml diluídas em tampão carbonato bicarbonato de pH 9,6 (Sigma-Aldrich, EUA) em volume de 50µl, sensibilizando placas de 96-poços (Corning, EUA). Como controle negativo, utilizamos extrato de *E. coli* não transformada em volume proporcional de diluição. As placas foram incubadas por 18 ou 36 horas em câmara úmida a 4°C. Lavaram-se as placas com 150µl de PBS-T (PBS com 0,05% (v/v) Tween®) entre cada passo do ensaio e todas as etapas de incubação seguintes foram realizadas em câmara escura úmida. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T, a fim de reduzir os sinais inespecíficos do teste, e foram bloqueadas com 150µl de leite em pó desnatado a 10% (m/v) em PBS-T, por 2 horas, a 37°C. As placas foram lavadas com 150µl de PBS-T, e adicionou-se 50µl de FAIM como controle positivo de CHIKV ou MAYV em diferentes diluições (1:100 à 1:800) com a solução bloqueadora e incubou-se por 1 hora a 37°C. Na sequência as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T, adicionaram-se aos orifícios 50µl do conjugado de imunoglobulina caprina anti-IgG murino (específica para ‘Fab’) conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído a 1:2000 em solução bloqueadora e incubou-se por 1 hora a 37°C. Finalmente, após lavadas por 5 vezes, adicionaram-se aos orifícios 100µl do substrato cromogênico ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6)-sulfônico (ABTS – KPL, EUA) e incubaram-se as placas por 15 minutos a 37°C. As leituras das placas foram feitas visualmente e em espectrofotômetro de placa (Multiscan MMC/340, EUA), com filtro de densidade ótica de 405nm.

Figura 9. Esquema de microplaca mostrando a sensibilização com rE2 e aplicação dos FAIMs.

	Diluição FAIM												rE2 (µg/ml)
	1:100		1:200		1:400		1:800						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													0,5
B													1
C													2
D													4
E													8
F													
G													
H													

Legenda: Verde: Sensibilizado com rE2 de CHIKV ou rE2 de MAYV.

3.7 Avaliação da Reatividade Cruzada

Avaliou-se nos ELISAs a reatividade cruzada dos FAIMs de diferentes alphavirus contra as proteínas recombinantes (rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV). Para tanto, FAIMs de AURV, CHIKV, EEEV, WEEV, MUCV e o MAYV foram diluídos serialmente de 1:100 à 1:800 em solução bloqueadora, e testados por ELISA rE2-CHIKV ou rE2-MAYV. Também, FAIMs contra as proteínas rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV, foram testados para verificar eventual detecção cruzada entre estes anticorpos policlonais.

3.8 Teste de amostras humanas com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV

Os testes sorológicos com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV para pesquisa de anticorpos IgG e IgM específicos contra CHIKV e MAYV, foram utilizados para avaliar amostras séricas humanas seguindo procedimentos padronizados. Testou-se por ELISA com rE2 de CHIKV um painel de 59 amostras de pacientes suspeitos de infecção arboviral provenientes do estado de São Paulo. Com o ELISA com rE2 de MAYV, testou-se um painel de 68 amostras de pacientes suspeitos de infecção arboviral provenientes do estado do Mato Grosso. Os soros utilizados são referidos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Informações sobre painel de amostras humanas utilizado para cada um dos ensaios.

Painel	Número Amostras	Suspeita de Infecção	Região de Coleta	Ano de Coleta
rE2 de CHIKV	59	Arboviral	São Paulo	2017
rE2 de MAYV	68	Arboviral	Mato Grosso	2016-17

Os ensaios com soros humanos foram feitos como padronizados com as amostras murinas, porém alterando-se o anticorpo secundário e a solução cromogênica reveladora. Para detecção de IgG humana utilizou-se imunoglobulina caprina anti-IgG humana (para região ‘Fab’) conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), e para detecção de IgM humana, utilizou-se imunoglobulina caprina anti-IgM humana (para região ‘Fc5μ’) conjugada à peroxidase (Merc Millipore, EUA). Como solução reveladora optou-se por utilizar 100μl de solução cromogênica de tetrametilbenzidina (TMB – Life technologies, EUA) devido a sua maior sensibilidade de detecção.

Os valores de ponto de corte (*cut-off*) foram calculados como a média dos controles negativos adicionando-se 3 desvios-padrão dos seus valores de leitura [98]. As amostras foram testadas em duplicata, e aquelas com valores abaixo do ponto de corte foram consideradas negativas.

$$cut - off = \text{Média D.O. negativos} + 3 \times \text{Desvio padrão}$$

As amostras séricas humanas positivas na triagem inicial por IgG com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV, foram diluídas, de 1:100 a 1:25.600 em solução bloqueadora e submetidas aos mesmos testes para determinação do título sérico. Estes soros foram adicionados à microplaca, como mostra o esquema na **Tabela 3**.

Tabela 3. Esquema da placa de ELISA utilizada para titulação sérica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Diluição
A	Soro 'Paciente 1'	Soro 'Paciente 1'	Soro 'Paciente 1'	Soro 'Paciente 2'	Soro 'Paciente 2'	Soro 'Paciente 2'	Soro 'Paciente 3'	Soro 'Paciente 3'	Soro 'Paciente 3'	Soro 'Paciente 3'	Soro 'Paciente 3'	Soro 'Paciente 3'	1:100
B													1:200
C													1:400
D													1:800
E													1:1600
F													1:3200
G													1:6400
H													1:12800

Legenda: Verde: Região sensibilizada com proteína recombinante. Roxo: Região sensibilizada com extrato de *E. coli* (controle negativo)

3.8.1 Sensibilidade e especificidade dos ELISAs com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV

Sensibilidade e especificidade dos IgG-ELISAs com rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV foram avaliadas. Para isto, comparamos estes testes com outros previamente validados e/ou reconhecidos e utilizados rotineiramente. O teste, para comparação com IgG -ELISA rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV foi o de neutralização por redução de 50% de placas (PRNT₅₀). A maneira como foram comparados os resultados encontra-se nas **Tabelas 4 e 5**.

Tabela 4. Tabela para comparação dos resultados do CHIKV e MAYV IgG rE2-ELISA com teste previamente validado e/ou reconhecidos e utilizados rotineiramente.

		Resultado do teste previamente validado	
		Positivo	Negativo
Resultado rE2-ELISA	Positivo	A Positivo	B Falso Positivo
	Negativo	C Falso Negativo	D Negativo

Tabela 5. Sensibilidade e especificidade dos CHIKV e MAYV IgG rE2-ELISAs com base em resultados plotados na Tabela 4.

Parâmetro avaliado	Fórmula	Interpretação
Sensibilidade	$A/(A+C)$	Probabilidade da detecção correta de amostras positivas
Especificidade	$D/(B+D)$	Probabilidade da detecção correta de amostras negativas

3.8.1.1 Teste de neutralização por redução de placas virais (PRNT)

Realizamos o teste de neutralização por redução de 50% das placas virais (PRNT₅₀) [99]. Para tanto, 1 dia antes da infecção, 4×10^5 células Vero foram semeadas em orifícios de placas com 6 poços. Os soros humanos de casos febris agudos, incluindo um soro de indivíduo hígido (controle-negativo), foram aquecidos a 56°C por 1 hora para inativação de proteínas do sistema complemento, e em seguida, diluídos serialmente de 1:10 à 1:20.480 em DMEM. Misturaram-se os soros nas diferentes diluições ao vírus em quantidade constante, $1,75 \times 10^2$ PFU de CHIKV ou de MAYV. Para que ocorresse a neutralização, incubaram-se as misturas soro-vírus por 1 hora a 37°C. Em seguida, 200µl das misturas soro-vírus foram inoculadas aos poços da placa, sobre a monocamada de células Vero e incubou-se por 1 hora a 37°C sob gentil agitação para que

ocorresse infecção celular. Posteriormente, adicionaram-se gentilmente às monocamadas celulares, 2ml de DMEM pré-aquecido contendo 1% de ágar e 2% de soro fetal bovino (Vitrocell, Brasil) e incubou-se por 2 dias a 37°C em 5% de CO₂. Ao final, fixaram-se as células removendo o meio contendo ágar, adicionando-se 2ml de solução formaldeído a 10% em PBS, incubando por 2 horas, desprezou-se o sobrenadante e corou-se as células com 1ml de cristal violeta a 1% incubando por 5 minutos. Contaram-se as placas virais, áreas não coradas em meio à monocamada celular, e comparou-se este número ao obtido em orifício contendo o controle-negativo com vírus. Soros que reduziam 50% ou mais as placas virais em cut-off de diluição mínima de 1:80, foram considerados neutralizantes e positivas para o respectivo vírus.

3.8.2 Ensaio de Avidéz

Para determinar a avidéz da interação dos anticorpos IgG e IgM presentes nas amostras séricas positivas com as proteínas recombinantes (rE2 de CHIKV e rE2 de MAYV), realizou-se ensaio de avidéz, como previamente descrito por Levett *et al* [100]. Resumidamente, utilizaram-se os mesmos procedimentos padronizados previamente, porém, após a incubação com os anticorpos primários (amostras humanas positivas), adicionaram-se aos poços 100µl de solução 6M de uréia em PBS ou apenas PBS, como controle, e incubou-se por 10 minutos a 37°C em câmara úmida. Lavaram-se os orifícios por 4 vezes com PBS-T e seguiram-se as etapas previamente padronizadas do ensaio. Ao final, calculou-se o Índice Relativo de Avidéz (IRA), dividindo o valor da leitura da densidade óptica (D.O.) nos poços tratados com a solução de uréia por aquela nos poços não tratados com uréia (PBS) e multiplicou-se por 100 para resultado em porcentagem (%). O IRA, expressa a reatividade remanescente após o tratamento com uréia utilizada para romper ligações fracas entre anticorpos e proteínas. Amostras com IRA ≥ 60% foram denominadas de alta avidéz, enquanto aquelas entre 40% e 60% foram consideradas de média avidéz e as de RAI ≤ 40% como de baixa avidéz.

$$\text{IRA (\%)} = \frac{\text{Leitura D. O. poço tratado}}{\text{Leitura D. O. poço não tratado}} \times 100$$

3.8.3 Reatividade cruzada entre amostras humanas

Amostras humanas IgG positivas no rE2-CHIKV ELISA e por PRNT₅₀ para CHIKV foram testadas por E2-MAYV ELISA. Também, fez-se o mesmo com amostras IgG positivas pelo rE2-MAYV ELISA e por PRNT₅₀ para MAYV, testando por rE2-CHIKV ELISA. Para tanto, os soros foram diluídos a 1:100 em solução bloqueadora, e avaliadas como padronizado previamente.

3.9 Comparação do rE2-CHIKV ELISA com outras técnicas sorológicas para CHIKV

Utilizando o painel de amostras humanas calculou-se a acurácia da detecção de IgG e IgM do rE2-CHIKV ELISA, comparando os resultados com aqueles obtidos em ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas por CHIKV como antígeno (EIA-ICC) e ensaio imunoenzimático com lisado de células infectadas por CHIKV ('Vírus-ELISA'). Também, comparamos resultados com os de um teste imunocromatográfico rápido de CHIKV (Lumiquick, EUA), afim de comparar os resultados de detecção.

O ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno (EIA-ICC) foi realizado como previamente descrito [101]. Utilizaram-se células C6/36 infectadas com CHIKV em multiplicidade de infecção (MOI) de 1 e como controle negativo, células C6/36 não infectadas.

O ensaio imunoenzimático com lisado de células infectadas ('Vírus-ELISA') utiliza antígenos virais obtidos de lisado de cultura celular. Resumidamente, as células C6/36 foram cultivadas a 28°C até a confluência de 90 – 100% em meio Leibovitz's L-15 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram lavadas uma vez com 10ml de PBS e inoculadas com 1×10^7 PFU de CHIKV sendo incubadas 1 hora a 37°C sob leve agitação, para adsorção viral. Após lavagem com 10ml de PBS e adição de 13ml de meio L-15 suplementado com 2% de SFB, incubou-se a cultura por 3 dias, e então, congelou-se e descongelou-se a cultura celular por duas vezes a -80°C para lise das células. Removeram-se debrís celulares por centrifugação a 200xg por 10 minutos, e coletou-se o sobrenadante contendo o vírus. Para o Vírus-ELISA propriamente dito, placas de 96-poços (Corning, EUA) foram sensibilizadas com 10^4 PFUs de CHIKV por poço, diluído em solução tampão 0,05M Carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Sigma-Aldrich, EUA). Como controle negativo, utilizaram-se células não infectadas, submetidas às mesmas condições de cultivo e tratamento.

Ainda, testamos os soros humanos para detecção qualitativa de IgG e IgM utilizando de um teste rápido imunocromatográfico de CHIKV, segundo as orientações do fabricante. A **Figura 10** ilustra o equipamento do teste.

Figura 10. Teste rápido imunocromatográfico utilizado para detecção de IgG e IgM em amostras humanas.

3.10 Reatividade cruzada entre Anti-E2 x rE2-CHIKV/MAYV ELISAs

Anticorpos policlonais produzidos em camundongos específico contra as proteínas rE2-CHIKV e rE2-MAYV, foram testados para detecção cruzada entre ambas as proteínas, por meio dos ELISAs padronizados.

4. RESULTADOS

4.1 As proteínas recombinantes rE2-CHIKV e rE2-MAYV

As proteínas rE2-CHIKV e rE2-MAYV expressadas em *E. coli* e purificadas foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blot*, permitindo determinar suas massas moleculares de 44kDa e 45kDa respectivamente e também, a boa qualidade com que foram purificadas. Imagens de géis de SDS-PAGE e do *Western blot* a que foram submetidas rE2-CHIKV e rE2-MAYV são mostrados na **Figura 11**.

Figura 11. Imagens de géis de SDS-PAGE e de *Western blot* marcado com anti-His, das proteínas rE2 de CHIKV (A e B) e rE2 de MAYV (C e D).

4.2 Análise da especificidade dos FAIMs de alphavirus

FAIMs contra os AURV, CHIKV, EEEV, WEEV, MUCV e MAYV, após produção, foram avaliados quanto à sua especificidade por reação de imunofluorescência indireta com células Vero infectadas por estes alphavirus e tendo células não infectadas como controle negativo. Imagens obtidas nestes testes são mostradas na **Figura 12**, onde é possível observar fluorescência verde nas células infectadas devido à reação com os FAIMs contra seus vírus respectivos.

Figura 12. Imagens de testes de imunofluorescência indireta com células Vero infectadas pelos alphavirus AURV, CHIKV, EEEV, WEEV, MUCV e MAYV reagindo com seus respectivos FAIMs e tendo células não infectadas como controle-negativo. Observa-se reação positiva para todos os vírus com base na presença de antígenos virais em verde. Também, o citoplasma celular aparece em vermelho e observa-se marcação nuclear em azul.

4.3 Padronização dos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs

Na padronização dos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs observamos que as concentrações de 1µg/ml e 4µg/ml dos antígenos recombinantes foram capazes de detectar anticorpos IgG específicos (anti-CHIKV ou anti-MAYV) nos respectivos FAIMs. Também, observaram-se resultados positivos em concentrações superiores dos antígenos recombinantes mas que, por não aumentarem a sensibilidade do ensaio, não foram utilizadas. Os tempos de sensibilização das placas com os antígenos foram 18 e 36 horas, a 4°C e demonstraram os mesmo resultados para ambos. Assim, concentrações de 1µg/ml e 4µg/ml, e tempo de sensibilização de 18 horas, foram adotados para os ensaios. Placas de ELISA são exibidas nas **Figuras 13 e 14**. As condições e procedimentos padronizados estão resumidos na **Tabela 6**.

Figura 13. Placa utilizada no teste de FAIM específico por rE2-CHIKV ELISA

Legenda: Diferentes concentrações de rE2-CHIKV (0,5 - 8 µg/ml) nas fileiras de A à E, e diferentes diluições do FAIM (1:100 – 1:800) feitas em duplicata nas colunas de 1 à 8.

Figura 14. Placa utilizada no teste de FAIM específico por rE2-MAYV ELISA

Legenda: Diferentes concentrações de rE-MAYV (0,5 - 8 µg/ml) nas fileiras de A à E, e diferentes diluições do FAIM (1:100 – 1:800) feitas em duplicata nas colunas de 1 à 8.

Tabela 6. Sumário das condições adotadas nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs, determinadas com base nos ensaios utilizando FAIMs.

Etapa	Condição	Reagente	Concentração/Volume
Sensibilização	18 horas à 4°C	rE2 em tapão 0.05M Carbonato-Bicarbonato	1µg/mL (rE2-CHIKV) e 4µg/mL (rE2-MAYV); 50µl/poço
Lavagem	3 vezes	PBS-Tween	150µl/poço
Bloqueio	2 horas à 37°C	PBS-Tween 10% leite em pó	
Lavagem	3 vezes	PBS-Tween	
Amostra	1 hora à 37°C	Fluído Ascítico Murino	Diluição de 1:100; 50µl/poço
Lavagem	4 vezes	PBS-Tween	150µl/poço
Anticorpo secundário	1 hora à 37°C	Anti-camundongo IgG caprina conjugada à peroxidase	Diluição de 1:2000; 50µl/poço
Lavagem	5 vezes	PBS-Tween	150µl/poço
Substrato	15 minutos em câmara escura à 37°C	ABTS	100µl/poço
Leitura	405 nm	-	-

4.4 Detecção de anticorpos IgG e IgM para CHIKV e MAYV em soros humanos utilizando rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs

Os resultados do IgG rE2-CHIKV ELISA com as 59 amostras de pacientes suspeitos de infecção arboviral foram comparados aos obtidos por PRNT₅₀ para CHIKV. Observou-se que o IgG rE2-CHIKV ELISA apresenta 89,66% de sensibilidade (Se) e 100% de especificidade (Es), incluindo 26 amostras positivas (P), nenhuma falso-positiva (FP), 30 amostras negativas (N) e 3 falso-negativas (FN), como mostram as **Tabelas 8 e 9**. Também, resultados dos testes com 68 soros humanos por IgG rE2-MAYV ELISA foram comparados a aqueles por PRNT₅₀ para MAYV e evidenciaram 100% de sensibilidade e 78,95% de especificidade, incluindo 11 amostras positivas, 12 amostras falso-positivas, 45 amostras negativas e 0 amostras falso-negativas, como mostram as **Tabelas 7 e 8**.

Quanto ao IgM rE2-CHIKV ELISA, este foi capaz de detectar 34 amostras positivas e 25 negativas, como mostra a **Tabela 9**, enquanto que o IgM rE2-MAYV ELISA detectou 31 amostras positivas e 37 negativas, como mostra a **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultados e títulos séricos de IgG e IgM anti-Mayaro obtidos por rE2-MAYV ELISA, também incluindo resultados do PRNT₅₀ para MAYV.

Número amostra	Detecção		PRNT ₅₀
	IgG	IgM	
1			<10
2			<10
3			<10
4			<10
5			<10
6			<10
7			<10
8			<10
9			<10
10			<10
11			<10
12			<10
13			<10
14			<10
15			<10
16			<10
17			<10
18			<10
19			<10
20			<10
21			<10
22			<10
23	800		1280
24			<10
25	100		<10
26	400		<10
27			<10
28			<10
29			<10
30			<10
31			<10
32			<10
33			<10
34			<10

Número Amostra	Detecção		PRNT ₅₀
	IgG	IgM	
35			<10
36			<10
37	400		<10
38			<10
39			<10
40			<10
41			<10
42	400		<10
43			<10
44			<10
45	400		1280
46	1600		2560
47	100		<10
48	100		<10
49			<10
50	3200		640
51	3200		640
52	100		<10
53	200		<10
54	800		1280
55	3200		320
56	3200		1280
57			<10
58	100		<10
59	100		<10
60	100		<10
61	400		640
62	200		<10
63	800		5120
64	800		640
65			<10
66			
67			
68			

Legenda: Verde = Teste positivo; Vermelho = Não detectado.

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade dos IgG rE2- CHIKV e MAYV ELISAs quando estes resultados foram comparados com aqueles obtidos por PRNT₅₀ para CHIKV e MAYV.

Ensaio	Índices para detecção de IgG					
	P	FP	N	FN	Se (%)	Es (%)
rE2-CHIKV	26	0	30	3	89,66%	100,00%
rE2-MAYV	11	12	45	0	100%	78,95%

Legenda: P = Positivo, FP = Falso-positivo, N = Negativo, FN = Falso-negativo, Se = Sensibilidade, Es = Especificidade.

4.5 Comparação entre resultados obtidos com rE2-CHIKV ELISA e os ensaios sorológicos EIA-ICC, Vírus ELISA, teste rápido imunocromatográfico e PRNT₅₀

As 59 amostras séricas humanas foram analisadas para IgG e IgM por rE2-CHIKV ELISA, EIA-ICC, Vírus ELISA, teste rápido imunocromatográfico e PRNT₅₀ e os resultados obtidos estão mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultados incluindo títulos de IgG e IgM anti-CHIKV obtidos de 59 amostras séricas, por diferentes testes sorológicos.

Número amostra	Detecção de IgG				PRNT ₅₀	Detecção de IgM			
	rE2-ELISA	EIA-ICC	Vírus ELISA	Teste rápido		rE2-CHIKV	EIA-ICC	Vírus ELISA	Teste rápido
1	ND	ND	ND	ND	<10				
2	3200	100	1600	-	1280				
3	3200	100	3200	-	2569				
4	ND	ND	ND	ND	<10				
5	6400	200	6400	-	5120				
6	6400	200	1600	-	1280				
7	6400	200	6400	-	5120				
8	1600	200	6400	-	1280				
9	1600	200	1600	-	2560				
10	ND	ND	ND	ND	<10				
11	ND	ND	ND	ND	<10				
12	400	ND	6400	-	1280				
13	800	200	6400	-	2560				
14	3200	400	6400	-	5120				
15	1600	200	6400	-	2560				
16	100	100	3200	-	2560				
17	3200	200	1600	-	1280				
18	1600	100	1600	ND	640				
19	ND	ND	ND	ND	<10				
20	12800	400	6400	-	10240				
21	ND	ND	ND	ND	<10				
22	1600	200	1600	-	1280				
23	3200	800	3200	-	20480				
24	1600	800	800	-	5120				
25	ND	ND	ND	ND	<10				
26	400	100	800	-	1280				
27	ND	ND	1600	-	5120				
28	400	100	800	-	2560				
29	1600	400	1600	-	2560				
30	1600	ND	1600	-	5120				
31	1600	200	800	-	5120				
32	400	100	3200	-	2560				
33	ND	ND	ND	ND	<10				
34	ND	ND	ND	ND	80				
35	ND	ND	ND	ND	80				
36	200	100	3200	-	5120				
37	1600	400	1600	-	2560				
38	ND	ND	ND	ND	<10				
39	ND	100	ND	ND	<10				
40	ND	ND	ND	ND	<10				
41	ND	ND	ND	ND	<10				
42	ND	ND	ND	ND	<10				

43	ND	ND	ND	ND	<10				
44	ND	ND	ND	ND	<10				
45	ND	ND	ND	ND	<10				
46	ND	ND	ND	ND	<10				
47	ND	ND	ND	ND	<10				
48	ND	ND	ND	ND	<10				
49	ND	ND	ND	ND	<10				
50	ND	ND	ND	ND	<10				
51	ND	ND	ND	ND	<10				
52	ND	ND	ND	ND	<10				
53	ND	ND	ND	ND	<10				
54	ND	ND	ND	ND	<10				
55	ND	ND	ND	ND	<10				
56	ND	ND	ND	ND	<10				
57	ND	ND	ND	ND	<10				
58	ND	ND	ND	ND	<10				
59	ND	ND	ND	ND	<10				

Legenda: Verde = Teste positivo, Vermelho = Não detectado.

Adotando o PRNT₅₀, por ser um ensaio vírus-específico, para comparação de resultados com os de IgG anti-CHIKV por rE2-CHIKV ELISA, observou-se sensibilidade de 89,66% e especificidade de 100%. Para EIA-ICC, Vírus ELISA e teste rápido, observaram-se sensibilidades de 82,76%, 93,1% e 89,66% e especificidades de 96,67%, 100% e 100%, respectivamente, como mostra a **Tabela 10**.

Tabela 10. Sensibilidade e especificidade dos ensaios para IgG dos soros humanos por rE2-CHIKV ELISA, EIA-ICC para CHIKV, Vírus ELISA para CHIKV e teste rápido para CHIKV, todos comparados ao PRNT₅₀ para CHIKV.

Ensaio	Índices para detecção de IgG					
	P	FP	N	FN	Se (%)	Es (%)
rE2-CHIKV	26	0	30	3	89,66%	100,00%
EIA-ICC	24	1	29	5	82,76%	96,67%
Vírus ELISA	27	0	30	2	93,10%	100,00%
Teste rápido	26	0	30	3	89,66%	100,00%

Legenda: P = Positivo, FP = falso-positivo, N = negativo, FN = falso-negativo, Se = Sensibilidade, Es = especificidade.

Quanto à detecção de IgM por rE2-CHIKV ELISA, este ensaio demonstrou um nível de concordância nos testes com 59 soros humanos quando comparado ao EIA-ICC, Vírus ELISA e Teste comercial de 54,23%, 71,18% e 57,62%, respectivamente, como mostra a **Tabela 10**.

Tabela 11. Concordância de detecção de IgM por rE2-CHIKV ELISA com os demais testes sorológicos.

Ensaio	Detecção de IgM		Concordância com rE2-ELISA
	Número de amostras positivas	Número de amostras negativas	
rE2-CHIKV ELISA	33	26	-
EIA-ICC	37	22	54,23%
Vírus ELISA	23	36	71,18%
Teste Comercial	11	48	57,62%

4.6 Ensaios de avidéz de anticorpos nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs

Analisando os ensaios de avidéz de IgG por rE2-CHIKV ELISA das amostras humanas IgG positivas, 73% dos soros foram classificados como de ‘alta avidéz’, 8% como de ‘média avidéz’ e 19% como de ‘baixa avidéz’. Por outro lado, para as amostras humanas IgM positivas, 25% foram classificados como de ‘alta avidéz’, 29% como de ‘média avidéz’ e 46% como de ‘baixa avidéz’. Estes resultados são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 12. Avidéz de anticorpos anti-CHIKV em amostras IgG e IgM positivas por rE2-CHIKV ELISA.

Número da Amostra	Índice de avidéz para IgG	Avidéz de IgG	Índice de avidéz para IgM	Avidéz de IgM
1	-	Não detectada	58,13%	Média Avidéz
2	70,23%	Alta Avidéz	65,38%	Alta Avidéz
3	89,09%	Alta Avidéz	-	Não detectada
5	95,29%	Alta Avidéz	31,36%	Baixa Avidéz
6	77,93%	Alta Avidéz	-	Não detectada
7	92,85%	Alta Avidéz	-	Não detectada
8	100,31%	Alta Avidéz	-	Não detectada
9	65,57%	Alta Avidéz	40,47%	Média Avidéz
12	83,33%	Alta Avidéz	40,47%	Média Avidéz
13	27,27%	Baixa Avidéz	17,81%	Baixa Avidéz
14	93,36%	Alta Avidéz	20,18%	Baixa Avidéz
15	63,84%	Alta Avidéz	50,34%	Média Avidéz
16	33,08%	Baixa Avidéz	49,56%	Média Avidéz
17	77,01%	Alta Avidéz	-	Não detectada
18	69,78%	Alta Avidéz	-	Não detectada
20	107,48%	Alta Avidéz	-	Não detectada
22	77,04%	Alta Avidéz	92,71%	Alta Avidéz
23	86,39%	Alta Avidéz	-	Não detectada
24	77,63%	Alta Avidéz	-	Não detectada
25	-	Não detectada	48,65%	Média Avidéz
26	77,78%	Alta Avidéz	26,12%	Baixa Avidéz
28	14,41%	Baixa Avidéz	15,00%	Baixa Avidéz

29	94,72%	Alta Avidéz	24,65%	Baixa Avidéz
30	53,28%	Média Avidéz	38,64%	Baixa Avidéz
31	32,84%	Baixa Avidéz	24,23%	Baixa Avidéz
32	38,89%	Baixa Avidéz	54,79%	Média Avidéz
33	-	Não detectada	23,63%	Baixa Avidéz
34	-	Não detectada	61,47%	Alta Avidéz
35	-	Não detectada	24,95%	Baixa Avidéz
36	54,30%	Média Avidéz	24,69%	Baixa Avidéz
37	98,45%	Alta Avidéz	-	Não detectada
44	-	Não detectada	118,61%	Alta Avidéz
53	-	Não detectada	60,26%	Alta Avidéz
56	-	Não detectada	73,68%	Alta Avidéz

Para as amostras humanas IgG positivas no rE2-MAYV ELISA, 68% foram classificadas como de ‘alta avidéz’, 16% como de ‘média avidéz’ e 16% como de ‘baixa avidéz’. Quanto às amostras IgM positivas, 13% foram classificadas como de ‘alta avidéz’, 13% como de ‘média avidéz’ e 74% como de ‘baixa avidéz’. Estes resultados são mostrados na **Tabela 12**.

Tabela 13. Avidéz de anticorpos anti-MAYV em amostras IgG e IgM positivas por rE2-MAYV ELISA.

Número da Amostra	Índice de avidéz para IgG	Avidéz de IgG	Índice de avidéz para IgM	Avidéz de IgM
1	-	Não detectada	20.09%	Baixa Avidéz
2	-	Não detectada	19.16%	Baixa Avidéz
3	-	Não detectada	58.47%	Média Avidéz
4	-	Não detectada	-	Não detectada
5	-	Não detectada	18.58%	Baixa Avidéz
6	-	Não detectada	15.19%	Baixa Avidéz
7	-	Não detectada	28.85%	Baixa Avidéz
8	-	Não detectada	-	Não detectada
9	-	Não detectada	3.06%	Baixa Avidéz
10	-	Não detectada	19.04%	Baixa Avidéz
11	-	Não detectada	-	Não detectada
12	-	Não detectada	-	Não detectada
13	-	Não detectada	35.17%	Baixa Avidéz
14	-	Não detectada	19.69%	Baixa Avidéz
15	-	Não detectada	14.44%	Baixa Avidéz
16	-	Não detectada	13.74%	Baixa Avidéz
17	-	Não detectada	83.50%	Alta Avidéz
18	-	Não detectada	74.92%	Alta Avidéz
19	-	Não detectada	12.13%	Baixa Avidéz
20	-	Não detectada	16.34%	Baixa Avidéz
21	-	Não detectada	0%	Baixa Avidéz
22	-	Não detectada	-	Não detectada

23	92,62%	Alta Avidéz	-	Não detectada
24	-	Não detectada	-	Não detectada
25	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
26	34,82%	Baixa Avidéz	27.27%	Baixa Avidéz
27	-	Não detectada	45.40%	Média Avidéz
28	-	Não detectada	-	Não detectada
29	-	Não detectada	4.29%	Baixa Avidéz
30	-	Não detectada	25.67%	Baixa Avidéz
31	-	Não detectada	-	Não detectada
32	-	Não detectada	7.10%	Baixa Avidéz
33	-	Não detectada	42.92%	Média Avidéz
34	-	Não detectada	13.09%	Baixa Avidéz
35	-	Não detectada	5.70%	Baixa Avidéz
36	-	Não detectada	7.66%	Baixa Avidéz
37	7,91%	Baixa Avidéz	-	Não detectada
38	-	Não detectada	31.33%	Baixa Avidéz
39	-	Não detectada	-	Não detectada
40	-	Não detectada	30.95%	Baixa Avidéz
41	-	Não detectada	-	Não detectada
42	49,52%	Média Avidéz	-	Não detectada
43	-	Não detectada	-	Não detectada
44	-	Não detectada	-	Não detectada
45	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
46	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
47	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
48	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
49	-	Não detectada	-	Não detectada
50	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
51	100%	Alta Avidéz	100%	Alta Avidéz
52	54,63%	Média Avidéz	-	Não detectada
53	22,08%	Baixa Avidéz	-	Não detectada
54	95,77%	Alta Avidéz	-	Não detectada
55	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
56	96,85%	Alta Avidéz	-	Não detectada
57	-	Não detectada	-	Não detectada
58	41,64%	Média Avidéz	-	Não detectada
59	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
60	46,72%	Média Avidéz	63.82%	Média Avidéz
61	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
62	100%	Alta Avidéz	96.91%	Alta Avidéz
63	100%	Alta Avidéz	-	Não detectada
64	95,25%	Alta Avidéz	-	Não detectada
65	-	Não detectada	-	Não detectada
66	-	Não detectada	-	Não detectada
67	-	Não detectada	-	Não detectada
68	-	Não detectada	-	Não detectada

4.7 Reatividade cruzada de FAIMs e soros humanos quando analisados por rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs

4.7.1 Reatividade cruzada de FAIMs

Na avaliação de reatividade cruzada dos FAIMs específicos contra AURV, EEEV, MAYV, MUCV e VEEV no rE2-CHIKV ELISA, não se observou reação cruzada, como mostra a **Figura 15**.

Figura 15. Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais específicos contra alphavírus (FAIMs) no rE2-CHIKV ELISA.

Na avaliação de reatividade cruzada dos FAIMs específicos contra AURV, CHIKV, EEEV, MUCV e VEEV no rE2-MAYV ELISA, observou-se reação cruzada com o FAIM de CHIKV até a diluição 1:800. Não se observou reatividade cruzada com os anticorpos policlonais específicos (FAIMs) de AURV, EEEV, MUCV e WEEV, como mostra a **Figura 16**.

Figura 16. Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais específicos contra alphavírus (FAIMs) no rE2-MAYV ELISA.

4.7.2 Reatividade cruzada dos FAIMs anti-rE2-CHIKV e anti-rE2-MAYV nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs

Observaram-se reações cruzadas em ambos os ensaios de ELISA. No rE2-CHIKV ELISA identificaram-se DOs líquidas de 0,67 e 0,83 para o FAIM de CHIKV, e de 0,173 e 0,43 para o FAIM de MAYV, como mostra a **Figura 17A**. No rE2-MAYV ELISA, identificaram-se DOs líquidas de 0,75 e 0,87 para o FAIM de MAYV, e 0,38 e 0,55 para o FAIM de CHIKV, como mostra a **Figura 17B**.

Figura 17. Análise da reatividade cruzada de anticorpos policlonais (FAIMs) anti-rE2-CHIKV e anti-rE2-MAYV em rE2-CHIKV ELISA (A) e rE2-MAYV ELISA (B).

A)

B)

4.7.3 Amostras humanas

Observou-se que dentre as amostras IgG positivas pelo rE2-CHIKV ELISA com anticorpos neutralizantes para CHIKV, nenhuma apresentou reação positiva no rE2-MAYV ELISA, como mostra a **Figura 18**. Da mesma forma, das amostras IgG positivas no rE2-MAYV ELISA e neutralizantes para MAYV, nenhuma reagiu positivamente no rE2-CHIKV ELISA, como mostra a **Figura 19**.

Figura 18. Resultados (D.O.) mostrando ausência de reações positivas (cruzadas) no IgG rE2-MAYV ELISA analisando 24 amostras humanas IgG positivas pelo rE2-CHIKV ELISA e com anticorpos neutralizantes para CHIKV.

Figura 19. Resultados (D.O.) evidenciando reações positivas (cruzadas) IgG rE2-CHIKV ELISA nos testes de 11 amostras humanas IgG positivas pelo rE2-MAYV ELISA e com anticorpos neutralizantes para MAYV.

5. DISCUSSÃO

A existência de alphavírus artritogênicos no Brasil, previamente conhecida como o MAYV endêmico na Amazônia e Planalto Central, ganhou enorme importância com a emergência do CHIKV causando grandes epidemias em quase todo o país. Por isso, tornou-se muito importante dispor de testes diagnósticos eficazes para o diagnóstico destas alphavirose e que, inclusive, permitam diferenciar infecções por CHIKV e MAYV. Tais testes diagnósticos, além de beneficiarem o tratamento de pacientes com um correto diagnóstico, são de grande importância para a saúde pública por permitirem identificar e mesmo prevenir epidemias. Neste trabalho, buscamos desenvolver testes sorológicos sensíveis, simples e confiáveis para o diagnóstico destas viroses. Para iniciarmos o trabalho, com base no conhecimento sobre o importante papel da proteína E2 do envelope viral nas infecções virais por alphavírus, relacionado à ligação viral durante a infecção das células do hospedeiro [102-104] e também, por ser alvo principal da imunidade mediada por anticorpos neutralizantes que controlam a infecção [105-107], escolhemos essa proteína como antígeno para uso nos ELISAs que aqui desenvolvemos. Para tanto, após selecionarmos sequências genômicas da E2 de CHIKV e MAYV adequadas ao nosso estudo, requisitamos a produção destas 2 proteínas a empresa comercial especializada visando a obter, de forma rápida e econômica, esses produtos.

O sistema de expressão escolhido para produzir as proteínas antigênicas E2 de CHIKV e MAYV, foi o procariótico, utilizando *Escherichia coli*. As proteínas expressadas foram purificadas sob condições que não alteraram suas conformações proteicas. Assim, foi possível produzir expressiva quantidade de proteínas recombinantes, o que enaltece este, quando comparado a outros sistemas de expressão, por permitir a produção em maior escala, permitindo realizar ELISAs em maior quantidade durante surtos e epidemias. Entretanto, reconhecemos uma limitação do método de expressão procariótico, não promover modificações pós-traducionais nos polipeptídeos assim expressos [108, 109], o que pode interferir na conformação das proteínas recombinantes. Entretanto, isto não parece ter interferido com a reatividade em ELISA das proteínas recombinantes E2 de CHIKV e MAYV por nós obtidas. As regiões nucleotídicas de interesse, correspondentes às proteínas E2, foram clonadas em vetor de expressão pET-30a, removendo-se a região transmembrana, que possui peptídeos hidrofóbicos prejudiciais ao processo de purificação. Também, os produtos recombinantes receberam uma cauda de histidina na porção N-terminal, que possibilitou a purificação por afinidade em coluna de níquel e desta forma, obter alto grau de pureza nos produtos [110].

As proteínas E2 tiveram suas antigenicidades verificadas por ELISA utilizando anticorpos policlonais (FAIMs) oriundos de camundongos hiperimunizados com CHIKV e MAYV. Estes anticorpos foram detectados de forma sensível e homotípica pelas proteínas E2 recombinantes de CHIKV e MAYV. Após padronização da quantidade de proteínas recombinantes a serem usadas nos testes inclusive, considerando recomendações previamente divulgadas [111], anticorpos policlonais (FAIMs) oriundos de camundongos hiperimunizados com outros *Alphavirus* foram testados por rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs. Os resultados não mostraram reações cruzadas destes anticorpos contra outros *Alphavirus* nos rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs. Apenas, observou-se reatividade cruzada do FAIM de CHIKV no rE2-MAYV ELISA. Tal reatividade cruzada é explicável pela proximidade filogenética entre CHIKV e MAYV, ambos evolutivamente classificados dentro do mesmo grupo *Semliki forest* [112], podendo, assim, desenvolver anticorpos de especificidade similar. Por outro lado, curiosamente, o FAIM de CHIKV, apesar de sua proximidade evolutiva com MAYV, não reagiu positivamente no rE2-MAYV ELISA. Com base nestes resultados, acreditamos que os ELISAs com rE2 dos 2 *Alphavirus* possuam uma aceitável especificidade para MAYV e principalmente para CHIKV.

Trabalho prévio mostrando proteínas E1 e E2 de CHIKV produzidas em sistema eucariótico baculovírus e testando suas eficiências na detecção de IgM anti-CHIKV para o diagnóstico de pacientes, mostrou sensibilidades de 77,5% para E1 e 90% para E2, bem como especificidade de 100% para ambas as proteínas [42]. Em outro trabalho, a proteína E2 de CHIKV foi produzida em sistema procariótico *E. coli* e purificada sob condições denaturantes, alterando sua conformação nativa. Essa E2 foi utilizada na detecção de anticorpos IgM por ELISA indireto, em soros de pacientes infectados por CHIKV. O ensaio apresentou sensibilidade e especificidade maiores que 90% quando comparado a outro ELISA utilizando antígenos virais nativos [44]. Por outro lado, outro estudo demonstrou que as proteínas rE1 e rE2 utilizadas isoladamente funcionam na captura de anticorpos IgM anti-CHIKV, entretanto estas proteínas, quando ligadas (rE1-rE2) aumentam claramente sua eficiência de detecção, evidenciando maior quantidade de anticorpos reagentes [113]. De qualquer forma, estes trabalhos, como no presente estudo, mostram que a proteína E2 é um antígeno viral capaz de detectar IgM anti-CHIKV, e provavelmente, o mesmo ocorre para outros *Alphavírus*.

Para verificar a utilidade do rE2-CHIKV ELISA e do rE2-MAYV ELISA na detecção de anticorpos específicos humanos e portanto, no diagnóstico de infecções por estes vírus, amostras séricas de pacientes com suspeita de infecção arboviral foram analisados. Pelo rE2-MAYV ELISA, testaram-se 68 soros resultando em 23 amostras IgG positivas. Estes mesmos soros foram analisados por teste de neutralização PRNT₅₀, tradicionalmente considerado o mais vírus-específico dos testes sorológicos e os resultados obtidos, quando comparados aos do IgG rE2-MAYV ELISA, mostraram sensibilidade de 100% e especificidade de 78,95%. Sobre esta análise, importa ressaltar que o ensaio de neutralização de placas evidencia presença de anticorpos neutralizantes para MAYV e é possível que amostras positivas pelo IgG rE2-MAYV ELISA, poderiam possuir anticorpos anti-E2 específicos de MAYV não neutralizantes. Ao diluirmos as amostras IgG positivas para MAYV, observamos altos títulos séricos, compatíveis com as reações vírus-específicas. Portanto, estes pacientes devem realmente ter se infectado com MAYV, corroborando a ideia de que o IgG rE2-MAYV ELISA seja altamente sensível.

Com o IgG rE2-CHIKV ELISA, testaram-se 59 soros humanos de pacientes suspeitos de infecção arboviral, resultando em 26 amostras positivas. Também, neste caso, os mesmos soros foram analisados por teste de neutralização (PRNT₅₀) e os resultados obtidos comparados aos do IgG rE2-CHIKV ELISA, demonstraram sensibilidade de 89,66% e especificidade de 100%. Na

falta de outro estudo analisando comparativamente IgG contra CHIKV, relatamos trabalho utilizando em ELISA a proteína rE2 de CHIKV produzida em *E. coli* mas, neste caso, para detecção de anticorpos IgM em soros humanos, que apresentou sensibilidade de 92% e especificidade de 100% [96].

Analisando resultados obtidos para os 59 soros humanos em 3 outros testes sorológicos para detecção de IgG anti-CHIKV, observou-se que o Vírus ELISA de CHIKV foi ligeiramente mais sensível e igualmente específico ao rE2-CHIKV ELISA. Por outro lado, o EIA-ICC de CHIKV, apresentou sensibilidade e especificidade inferiores à do rE2-CHIKV ELISA. O teste rápido imunocromatográfico comercial (Lumiquick, EUA) mostrou níveis idênticos de sensibilidade e especificidade aos do rE2-CHIKV ELISA. Estudos anteriores utilizando antígenos virais nativos de alphavírus oriundos do sobrenadante de cultura celular [114] ou presentes em células infectadas (EIA-ICC) [115], mostraram elevados índices de sensibilidade e especificidade. Entretanto, tais técnicas, apresentam limitações e dificuldades de implementação na rotina de diagnóstico clínico, requerendo infra-estrutura especial e pessoal treinado para trabalhar com cultura de células e preparo de antígenos. Portanto, coletivamente, é vantajoso o rE2-CHIKV ELISA para uso em rotina laboratorial. Inclusive pela simplicidade de realização e menor custo quando comparado às técnicas que utilizam antígeno viral nativo, como o Vírus ELISA e o EIA-ICC. O IgG rE2-CHIKV ELISA poderia ser utilizado no diagnóstico de pacientes, particularmente aqueles com artropatia crônica e também em inquéritos sorológicos.

Quando amostras humanas IgG positivas pelos ensaios rE2-CHIKV ELISA, Vírus ELISA e EIA-ICC, foram diluídas de forma seriada, o rE2-CHIKV ELISA demonstrou títulos de detecção, de 1600 a 12800, sugerindo uma alta sensibilidade de detecção pelo ensaio. As demais técnicas, Vírus ELISA e EIA-ICC, demonstraram, para a maioria das amostras, títulos de 100 a 400 e 1600 a 6400, respectivamente. Assim, o EIA-ICC mostrou sensibilidade de detecção inferior e o Vírus ELISA, sensibilidade similar à do rE2-CHIKV ELISA.

Ensaio que mensuram a avidéz de anticorpos por antígenos em testes diagnósticos são comumente utilizados para diferenciar infecções pregressas das recentes para os flavivírus WNV, DENV e *Tick-borne virus* (TBEV) [100, 116, 117]. Realizamos ensaios com soros IgG positivos em nossos ELISAs observando que 73% das amostras (19/26) apresentaram alta avidéz destes anticorpos com rE2-CHIKV, o que indicou alta afinidade e forte interação das imunoglobulinas G produzidas frente à infecção por CHIKV nestes casos.

Quanto à detecção de IgM anti-CHIKV, analisando os resultados obtidos para 59 soros humanos com os 4 testes sorológicos, observou-se que o IgM rE2-CHIKV ELISA concordou com EIA-ICC na detecção de 54,23% das amostras, com o Vírus ELISA em 71,18% e com o teste rápido imunocromatográfico comercial em 57,62%. Trabalho prévio utilizando rE2 ELISA de CHIKV, mostrou 94,7% de concordância na detecção de IgM de amostras humanas, com antígenos virais nativos produzidos em *E. coli* e purificados por ultracentrifugação em gradiente de sucrose [44]. Trata-se de concordância de resultados superior à que observamos com o IgM rE2-CHIKV ELISA com quaisquer dos testes. Tal diferença poderia ser explicada por diferença na composição amino acídica de ambos os antígenos recombinantes virais, e também, ao processo de purificação da proteína recombinante, que poderia alterar sua conformação final.

Quanto à avidéz de anticorpos em soros IgM positivos pelo nosso ELISA, observamos uma baixa proporção de amostras, 25%, com alta avidéz, sugerindo assim uma baixa afinidade destas IgM com rE2-CHIKV. Esta baixa afinidade poderia dever-se a serem anticorpos produzidos em fase inicial da infecção [118]. Sabe-se que nos estágios iniciais da infecção viral, como parte da resposta imune, a produção de anticorpos está direcionada a múltiplos epítomos antigênicos, o que poderia resultar em baixa especificidade refletida pela baixa avidéz. Por outro lado, como resultado da maturação da resposta humoral, conferida por seleção clonal de células B, os anticorpos se tornam mais específicos e consequentemente a avidéz por rE2 deve aumentar.

Ambos os rE2-ELISAs, para CHIKV e MAYV, não detectaram anticorpos hiperimunes murinos contra outros alphavírus, incluindo AURV, EEEV, MUCV e WEEV, o que atesta a especificidade desses ensaios. Ainda, sendo CHIKV e MAYV os alphavirus causadores de doença humana no Brasil mais proximamente relacionados, ambos pertencentes ao grupo *Semliki forest* [112], faz-se importante focar suas reações sorológicas cruzadas, que confundiriam o diagnóstico. Primeiramente, observamos que os soros hiperimunes murinos específicos contra as proteínas rE2 de CHIKV e de MAYV quando testados nos rE2 ELISAs, foram capazes de reagir de maneira homotípica e, no caso do rE2-MAYV ELISA também heterotípica, demonstrando elevado níveis de reatividade cruzada de anticorpos anti-CHIKV com rE2-MAYV. Acreditamos que tal inespecificidade pode estar relacionada a impurezas imunogênicas comuns, presente nos produtos recombinantes e durante a imunização dos animais. Por outro lado, neste mesmo contexto, observamos um aspecto desejável, nosso rE2-CHIKV ELISA, não evidenciou reação positiva cruzada do soro policlonal murino hiperimune anti-MAYV. Entretanto, testando soros

humanos, o rE2-MAYV ELISA evidenciou níveis inferiores de reações cruzadas. Soros humanos positivos no rE2-CHIKV ELISA de IgG e neutralizantes para CHIKV, não reagiram pelo rE2-MAYV ELISA de IgG. De maneira menos clara, amostras positivas por rE2-MAYV ELISA para IgG e neutralizantes para MAYV, exibiram discreta reatividade cruzada no rE2-CHIKV ELISA de IgG. Nestes casos, a D.O. líquida dos soros mostrou-se muito mais elevada no rE-MAYV ELISA. Enfim, sabemos da existência de epítomos conformacionais conservados entre as proteínas E2 de MAYV e CHIKV, como evidenciado no experimento utilizando FAIMs específicos para as rE2, que demonstraram elevados níveis de reatividade cruzada entre as proteínas, entretanto, tais epítomos não parecem ter sido alvos relevantes para o sistema imunológico durante a infecção viral, considerando nossos resultados de reatividade cruzada em soros humanos. Portanto, nossos resultados mostraram que, usando os dois rE2 ELISAs combinados é possível discriminar infecções por CHIKV e por MAYV.

Em suma, desenvolvemos e avaliamos aqui, de forma preliminar, ensaios relevantes que podem ser utilizados no diagnóstico sorológico de infecções por MAYV e CHIKV com base na detecção de anticorpos IgG e IgM específicos. Nossos rE2-CHIKV e rE2 MAYV ELISAs, particularmente os de IgG, mostraram-se adequadamente sensíveis e específicos e serem aplicados no diagnóstico de pacientes infectados com CHIKV e MAYV, patógenos que acometem milhares de pessoas no país, com grande morbidade e que portanto, tem grande importância em saúde pública.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O rE2-CHIKV ELISA detectou anticorpos murinos de forma homotípica e não produziu reações cruzadas evidenciáveis por reação de anticorpos murinos específicos contra outros *Alphavírus*;
- ✓ O rE2-MAYV ELISA detectou anticorpos murinos homotípicos e também, permitiu reação cruzada com anticorpos murinos anti-CHIKV, mas não para outros *Alphavírus*;
- ✓ Os rE2-CHIKV e rE2-MAYV ELISAs, detectam IgGs específicas provenientes de amostras humanas com alta sensibilidade;
- ✓ O rE2-CHIKV ELISA de IgG possui sensibilidade e especificidade similar à do Teste comercial (Lumiquick, EUA);
- ✓ O IgM rE2-CHIKV ELISA apresentou moderada concordância de detecção com outros ensaios sorológicos;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conway, M.J., T.M. Colpitts, and E. Fikrig, *Role of the Vector in Arbovirus Transmission*. Annu Rev Virol, 2014. **1**(1): p. 71-88.
2. Weaver, S.C. and W.K. Reisen, *Present and future arboviral threats*. Antiviral Res, 2010. **85**(2): p. 328-45.
3. Donalisio, M.R., A.R.R. Freitas, and A. Zuben, *Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health*. Rev Saude Publica, 2017. **51**: p. 30.
4. Rudolph, C.D., et al., *Rudolph's Pediatrics*. 2011. **22e**.
5. Lopes, N., C. Nozawa, and L. R.E.C., *General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil*. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 2014. **5**(3): p. 55-64.
6. Forrester, N.L., et al., *Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin*. J Virol, 2012. **86**(5): p. 2729-38.
7. Viruses, I.C.o.T.o., *ICTV 9th Report - Togaviridae*. 2011.
8. Strauss, J.H. and E.G. Strauss, *The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution*. Microbiol Rev, 1994. **58**(3): p. 491-562.
9. Ryman, K.D. and W.B. Klimstra, *Host responses to alphavirus infection*. Immunol Rev, 2008. **225**: p. 27-45.
10. Strauss, E.G., C.M. Rice, and J.H. Strauss, *Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus*. Virology, 1984. **133**(1): p. 92-110.
11. Khan, A.H., et al., *Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 12): p. 3075-84.
12. Hardy, W.R. and J.H. Strauss, *Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans*. J Virol, 1989. **63**(11): p. 4653-64.
13. Melancon, P. and H. Garoff, *Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease*. J Virol, 1987. **61**(5): p. 1301-9.
14. Mota, M.T.O., et al., *Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas*. Future Medicine, 2015.
15. Ahola, T. and L. Kaariainen, *Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 507-11.
16. Mi, S. and V. Stollar, *Expression of Sindbis virus nsP1 and methyltransferase activity in Escherichia coli*. Virology, 1991. **184**(1): p. 423-7.

17. Peranen, J., et al., *The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles*. Virology, 1995. **208**(2): p. 610-20.
18. Gomez de Cedron, M., et al., *RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2*. FEBS Lett, 1999. **448**(1): p. 19-22.
19. Malet, H., et al., *The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6534-45.
20. Park, E. and D.E. Griffin, *The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice*. Virology, 2009. **388**(2): p. 305-14.
21. Tuittila, M. and A.E. Hinkkanen, *Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 6): p. 1525-33.
22. Hahn, Y.S., et al., *Mapping of RNA- temperature-sensitive mutants of Sindbis virus: complementation group F mutants have lesions in nsP4*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1194-202.
23. Owen, K.E. and R.J. Kuhn, *Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 2757-63.
24. Owen, K.E. and R.J. Kuhn, *Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein*. Virology, 1997. **230**(2): p. 187-96.
25. Simizu, B., et al., *Structural proteins of Chikungunya virus*. J Virol, 1984. **51**(1): p. 254-8.
26. Garoff, H., K. Simons, and O. Renkonen, *Isolation and characterization of the membrane proteins of Semliki Forest virus*. Virology, 1974. **61**(2): p. 493-504.
27. Smith, T.J., et al., *Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10648-52.
28. Davis, N.L., et al., *A single nucleotide change in the E2 glycoprotein gene of Sindbis virus affects penetration rate in cell culture and virulence in neonatal mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(18): p. 6771-5.
29. Ivanova, L., L. Le, and M.J. Schlesinger, *Characterization of revertants of a Sindbis virus 6K gene mutant that affects proteolytic processing and virus assembly*. Virus Res, 1995. **39**(2-3): p. 165-79.
30. Melton, J.V., et al., *Alphavirus 6K proteins form ion channels*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 46923-31.
31. Boggs, W.M., et al., *Low pH-dependent Sindbis virus-induced fusion of BHK cells: differences between strains correlate with amino acid changes in the E1 glycoprotein*. Virology, 1989. **169**(2): p. 485-8.

32. Garoff, H., et al., *Nucleotide sequence of cDNA coding for Semliki Forest virus membrane glycoproteins*. Nature, 1980. **288**(5788): p. 236-41.
33. Zhang, R., et al., *4.4 A cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus*. EMBO J, 2011. **30**(18): p. 3854-63.
34. Cheng, R.H., et al., *Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus*. Cell, 1995. **80**(4): p. 621-30.
35. de Curtis, I. and K. Simons, *Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8052-6.
36. Lobigs, M. and H. Garoff, *Fusion function of the Semliki Forest virus spike is activated by proteolytic cleavage of the envelope glycoprotein precursor p62*. J Virol, 1990. **64**(3): p. 1233-40.
37. Gahmberg, C.G., G. Utermann, and K. Simons, *The membrane proteins of Semliki Forest virus have a hydrophobic part attached to the viral membrane*. FEBS Lett, 1972. **28**(2): p. 179-182.
38. Garoff, H. and K. Simons, *Location of the spike glycoproteins in the Semliki Forest virus membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(10): p. 3988-92.
39. Jose, J., J.E. Snyder, and R.J. Kuhn, *A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly*. Future Microbiol, 2009. **4**(7): p. 837-56.
40. Porta, J., et al., *Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission*. J Virol, 2015. **90**(3): p. 1169-77.
41. Brehin, A.C., et al., *Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein*. Virology, 2008. **371**(1): p. 185-95.
42. Cho, B., et al., *Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection*. Yonsei Med J, 2008. **49**(5): p. 828-35.
43. Kumar, M., A.B. Sudeep, and V.A. Arankalle, *Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus*. Vaccine, 2012. **30**(43): p. 6142-9.
44. Khan, M., et al., *Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus*. J Med Virol, 2014. **86**(7): p. 1169-75.
45. Chamberlain, R., *Epidemiology of arthropod-borne togaviruses: the role of arthropods as hosts and vectors and of vertebrate hosts in natural transmission cycles*. Academic Press, 1980: p. 175 - 227.
46. DE, G., *Alphavirus pathogenesis and immunity*. Plenum Publishing Corp., 1986: p. 209 - 250.

47. B, N., *Sindbis and Sindbis-like viruses* In T.P. Monath (ed.), *The arboviruses: epidemiology and ecology.*, 1988: p. 167 - 176.
48. Stiles, K.M. and M. Kielian, *Alphavirus entry: NRAMP leads the way.* *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(2): p. 92-3.
49. Meyer, W.J. and R.E. Johnston, *Structural rearrangement of infecting Sindbis virions at the cell surface: mapping of newly accessible epitopes.* *J Virol*, 1993. **67**(9): p. 5117-25.
50. Helenius, A., et al., *On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells.* *J Cell Biol*, 1980. **84**(2): p. 404-20.
51. Gibbons, D.L., et al., *Visualization of the target-membrane-inserted fusion protein of Semliki Forest virus by combined electron microscopy and crystallography.* *Cell*, 2003. **114**(5): p. 573-83.
52. Lescar, J., et al., *The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH.* *Cell*, 2001. **105**(1): p. 137-48.
53. Helenius, A., *Semliki Forest virus penetration from endosomes: a morphological study.* *Biol Cell*, 1984. **51**(2): p. 181-5.
54. Schwartz, O. and M.L. Albert, *Biology and pathogenesis of chikungunya virus.* *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(7): p. 491-500.
55. Lemm, J.A., et al., *Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis.* *EMBO J*, 1994. **13**(12): p. 2925-34.
56. Garoff, H., M. Sjöberg, and R.H. Cheng, *Budding of alphaviruses.* *Virus Res*, 2004. **106**(2): p. 103-16.
57. Peters, C. and J. Dalrymple, *Alphaviruses, In: Fields.* 1990, New York: Raven Press.
58. Kiwanuka, N., et al., *O'nyong-nyong fever in south-central Uganda, 1996-1997: clinical features and validation of a clinical case definition for surveillance purposes.* *Clin Infect Dis*, 1999. **29**(5): p. 1243-50.
59. Jaffar-Bandjee, M.C., et al., *Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection.* *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010. **8**(9): p. 987-96.
60. Suhrbier, A., M.C. Jaffar-Bandjee, and P. Gasque, *Arthritogenic alphaviruses--an overview.* *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(7): p. 420-9.
61. Laine, M., R. Luukkainen, and A. Toivanen, *Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease.* *J Intern Med*, 2004. **256**(6): p. 457-71.
62. Flexman, J.P., et al., *A comparison of the diseases caused by Ross River virus and Barmah Forest virus.* *Med J Aust*, 1998. **169**(3): p. 159-63.

63. Harley, D., A. Sleight, and S. Ritchie, *Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 909-32, table of contents.
64. Vijayakumar, K.P., et al., *Clinical Profile of Chikungunya Patients during the Epidemic of 2007 in Kerala, India*. J Glob Infect Dis, 2011. **3**(3): p. 221-6.
65. Toivanen, A., *Alphaviruses: an emerging cause of arthritis?* Curr Opin Rheumatol, 2008. **20**(4): p. 486-90.
66. Kurkela, S., et al., *Arthritis and arthralgia three years after Sindbis virus infection: clinical follow-up of a cohort of 49 patients*. Scand J Infect Dis, 2008. **40**(2): p. 167-73.
67. Kurkela, S., et al., *Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002-2003*. J Infect Dis, 2005. **191**(11): p. 1820-9.
68. Sane, J., et al., *Prolonged myalgia in Sindbis virus infection: case description and in vitro infection of myotubes and myoblasts*. J Infect Dis, 2012. **206**(3): p. 407-14.
69. Dupuis-Maguiraga, L., et al., *Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(3): p. e1446.
70. Tesh, R.B., et al., *Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(1): p. 67-73.
71. Labadie, K., et al., *Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages*. J Clin Invest, 2010. **120**(3): p. 894-906.
72. Morrison, T.E., et al., *Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 737-49.
73. Morrison, T.E., et al., *A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence*. Am J Pathol, 2011. **178**(1): p. 32-40.
74. Heise, M.T., D.A. Simpson, and R.E. Johnston, *Sindbis-group alphavirus replication in periosteum and endosteum of long bones in adult mice*. J Virol, 2000. **74**(19): p. 9294-9.
75. Assuncao-Miranda, I., C. Cruz-Oliveira, and A.T. Da Poian, *Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 973516.
76. Ross, R.W., *The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic*. J Hyg (Lond), 1956. **54**(2): p. 177-91.
77. Mavalankar, D., P. Shastri, and P. Raman, *Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster*. Lancet Infect Dis, 2007. **7**(5): p. 306-7.
78. Cassadou, S., et al., *Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013*. Euro Surveill, 2014. **19**(13).

79. Burt, F.J., et al., *Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen*. Lancet Infect Dis, 2017. **17**(4): p. e107-e117.
80. Saúde, M.d., *Boletim Epidemiológico*. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017. **48**(45).
81. CDC. - Center for Disease Control and Prevention - Countries and territories where chikungunya cases have been reported. 2016; Available from: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>.
82. Anderson, C.R., et al., *Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I.* Am J Trop Med Hyg, 1957. **6**(6): p. 1012-6.
83. Zuchi, N., et al., *Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2014. **109**(6): p. 820-3.
84. Mourao, M.P., et al., *Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(1): p. 42-6.
85. Azevedo, R.S., et al., *Mayaro fever virus, Brazilian Amazon*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(11): p. 1830-2.
86. Brunini, S., et al., *High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil*. Emerg Infect Dis, 2017. **23**(6): p. 1025-1026.
87. Forshey, B.M., et al., *Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(8): p. e787.
88. Goh, L.Y., et al., *A sensitive epitope-blocking ELISA for the detection of Chikungunya virus-specific antibodies in patients*. J Virol Methods, 2015. **222**: p. 55-61.
89. Okabayashi, T., et al., *Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test*. J Clin Microbiol, 2015. **53**(2): p. 382-8.
90. Lanciotti, R.S., et al., *Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(5): p. 764-7.
91. Kumar, P., et al., *Development and evaluation of baculovirus-expressed Chikungunya virus E1 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya infection*. J Virol Methods, 2014. **206**: p. 67-75.
92. Johnson, B.W., B.J. Russell, and C.H. Goodman, *Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays*. J Infect Dis, 2016. **214**(suppl 5): p. S471-S474.
93. Blacksell, S.D., et al., *Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the diagnosis of acute Chikungunya infection*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(10): p. 1773-5.
94. Coimbra, T.L., et al., *Mayaro virus: imported cases of human infection in Sao Paulo State, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2007. **49**(4): p. 221-4.

95. Figueiredo, L.T., [The use of *Aedes albopictus* C6/36 cells in the propagation and classification of arbovirus of the *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae* families]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1990. **23**(1): p. 13-8.
96. Tripathi, N.K., R. Priya, and A. Shrivastava, *Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014. **98**(6): p. 2461-71.
97. Mota, M.T., et al., *Complete Genome Sequence of Mayaro Virus Imported from the Amazon Basin to Sao Paulo State, Brazil*. *Genome Announc*, 2015. **3**(6).
98. Ramani, S., et al., *Rotavirus antigenemia in Indian children with rotavirus gastroenteritis and asymptomatic infections*. *Clin Infect Dis*, 2010. **51**(11): p. 1284-9.
99. Azami, N.A., M.L. Moi, and T. Takasaki, *Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test*. *Methods Mol Biol*, 2016. **1426**: p. 273-82.
100. Levett, P.N., et al., *Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus*. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(12): p. 5873-5.
101. Figueiredo, L.T. and R.E. Shope, *An enzyme immunoassay for dengue antibody using infected cultured mosquito cells as antigen*. *J Virol Methods*, 1987. **17**(3-4): p. 191-8.
102. Bhatnagar, S., et al., *Evaluation of multiple antigenic peptides based on the Chikungunya E2 protein for improved serological diagnosis of infection*. *Viral Immunol*, 2015. **28**(2): p. 107-12.
103. Asnet Mary, J., et al., *Identification of structural motifs in the E2 glycoprotein of Chikungunya involved in virus-host interaction*. *J Biomol Struct Dyn*, 2013. **31**(10): p. 1077-85.
104. Weber, C., et al., *Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2017. **11**(1): p. e0005318.
105. Smith, S.A., et al., *Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus*. *Cell Host Microbe*, 2015. **18**(1): p. 86-95.
106. Warter, L., et al., *Chikungunya virus envelope-specific human monoclonal antibodies with broad neutralization potency*. *J Immunol*, 2011. **186**(5): p. 3258-64.
107. Weber, C., S.M. Buchner, and B.S. Schnierle, *A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(4): p. e0003684.
108. Brondyk, W.H., *Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein*. *Methods Enzymol*, 2009. **463**: p. 131-47.
109. Zerbs, S., A.M. Frank, and F.R. Collart, *Bacterial systems for production of heterologous proteins*. *Methods Enzymol*, 2009. **463**: p. 149-68.

110. Bornhorst, J.A. and J.J. Falke, *Purification of proteins using polyhistidine affinity tags*. Methods Enzymol, 2000. **326**: p. 245-54.
111. Figueiredo, L.T., et al., *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on Araraquara virus recombinant nucleocapsid protein*. Am J Trop Med Hyg, 2009. **81**(2): p. 273-6.
112. Powers, A.M., et al., *Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses*. J Virol, 2001. **75**(21): p. 10118-31.
113. Chua, C.L., et al., *The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0171989.
114. Yap, G., et al., *Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(7): p. e753.
115. Figueiredo, L.T., et al., *Study of two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro virus antibodies*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1989. **84**(3): p. 303-7.
116. Gassmann, C. and G. Bauer, *Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections*. J Med Virol, 1997. **51**(3): p. 242-51.
117. Matheus, S., et al., *Discrimination between primary and secondary dengue virus infection by an immunoglobulin G avidity test using a single acute-phase serum sample*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(6): p. 2793-7.
118. Victora, G.D. and M.C. Nussenzweig, *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 429-57.