UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ANGÉLICA SILVA

**Ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno
para diagnóstico de infecções causadas pelos vírus Zika e
Chikungunya**

Ribeirão Preto

2018

ANGÉLICA SILVA

**Ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno
para diagnóstico de infecções causadas pelos vírus Zika e
Chikungunya**

Versão original

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 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 estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Angélica

Ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno para diagnóstico de infecções causadas pelos vírus Zika e Chikungunya

65f.: 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. Zika	2. Chikungunya	3. Arbovírus	4. Diagnóstico
5. Vírus			

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Angélica Silva

Título: Ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno para diagnóstico de infecções causadas pelos vírus Zika e Chikungunya

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, para obtenção do 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 _____

REFERÊNCIA AO APOIO RECEBIDO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que inúmeras vezes abdicaram da própria felicidade pela minha, que sempre estiveram ao meu lado acreditando e me apoiando, não mediram esforços para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos, que me ensinaram que nossas escolhas nem sempre são fáceis, mas que com esforço, integridade de caráter e fé tudo é possível. A vocês dedico a minha vida!

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre estar ao meu lado mesmo nos momentos que menos mereci, me dando forças para nunca desistir.

Aos meus pais Antônio e Marta e meu irmão Luis Paulo, pelo apoio, carinho, atenção, paciência em toda essa jornada, sempre acreditando, sendo minha base e porto seguro, amo muito vocês.

Aos meus tios amados Vilma e Eduardo pelo carinho e apoio, a família é quem nos ama e nos quer bem, Deus me deu os melhores, amo vocês.

Ao meu namorado Eduardo, pelo apoio e principalmente paciência por estar sempre comigo, mesmo quando nem eu me suportava, mesmo com todo meu estresse, sempre esteve ali para me confortar, amo você.

Aos queridos e sinceros amigos do Betel que Deus me presenteou, Ana Caroline, Leciene e Felipe, sou muito grata por ter vocês em minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo por ter me fornecido esta oportunidade, pelo aprendizado passado, pela paciência e atenção, muito obrigada, fez grande diferença na minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus queridos colegas de laboratório Marília, Leonardo, Marcílio, William, Carla, Victória, Beatriz, Gilberto e Rafael, pelos momentos compartilhados, auxílio acadêmico e amizade, obrigada por tudo.

Aos meus amigos de laboratório Danilo e Aline, que abdicaram de tempo muitas vezes para me ajudar, muito obrigada por todo carinho, vocês são muito importantes para mim.

Aos funcionários do CPV Sueli, Pity, Adriana, Leila, Danilo. E a técnica do laboratório Soraya, por sempre me ajudar, dar atenção e aconselhar, foi fundamental no decorrer do meu trabalho.

Ao programa de Imunologia Básica e Aplicada – FMRP/USP por ter acreditado e me auxiliado todas as vezes em que precisei. Agradeço também a secretária Ana, por todo trabalho e ajuda nestes anos.

Aos órgãos de financiamento do meu trabalho CAPES e FAPESP, sem o apoio financeiro não seria possível desenvolver meu trabalho, muito obrigada.

RESUMO

SILVA, Angélica. **Ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas como antígeno para diagnóstico de infecções causadas pelos vírus Zika e Chikungunya**. 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.

No Brasil os vírus Zika e Chikungunya vem causando enormes epidemias com grande morbidade e significativa mortalidade, tornou-se importante desenvolver métodos diagnósticos eficazes para discriminar suas infecções. No presente trabalho, desenvolvemos ensaios imunoenzimáticos utilizando células de cultura, *aedes albopictus* pseudo C6/36, infectadas e utilizadas como antígeno viral (EIA-ICC), para diagnósticos de infecções provocadas pelos vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). As placas contendo células infectadas tiveram suas antigenicidades verificadas nos ensaios utilizando anticorpos policlonais oriundo de camundongos hiperimunizados com ZIKV, CHIKV e outros flavivirus e alphavirus. O EIA-ICC ZIKV detectou anticorpos murinos de forma homotípica, porém reações cruzadas foram encontradas com Dengue 1 (DENV 1), Saint Louis Vírus (SLEV), Rocio Vírus (ROCV) e West Nilo Vírus (WNV). O EIA-ICC CHIKV também detectou anticorpos murinos de forma homotípica e reações cruzadas foram observadas com os Mayaro Vírus (MAYV) e Mucambo Vírus (MUCV). Resultados comparativos de 39 amostras foram realizados no EIA-ICC ZIKV, que demonstrou sensibilidade de 87,5% (IgM) e 100% (IgG) e especificidade de 95,65% (IgM) e 83,33% (IgG). O EIA-ICC CHIKV, teste comparativos entre 59 amostras, demonstrou sensibilidade de 64,7% (IgM) e 92,3% (IgG) e especificidade de 40% (IgM) e 96,96% (IgG). Os EIA-ICCs também foram usados para diagnósticos das arboviroses ZIKV e CHIKV em 174 soros de pacientes com doença febril aguda, no EIA-ICC ZIKV foi encontrado 8,13% de IgM, 20,34% IgG e 6,97% de IgG e IgM na mesmo soro, no EIA-ICC CHIKV encontramos IgG em 8,13% dos soros e IgG em 16,86%, soros com anticorpos IgG e IgM nos mesmos foram vistos em 1,74%. Também encontramos em 11 soros anticorpos tanto para ZIKV quanto para CHIKV. Portanto o EIA-ICC ZIKV mostrou para detecção de IgM e IgG, adequadamente sensível e específico para ser validado em estudos com maiores números de amostras e ser aplicados no diagnóstico. O EIA-ICC CHIKV mostrou para detecção de IgG, adequadamente sensível e específico para ser validado em estudos com maiores números de amostras e ser aplicados no diagnóstico. Porém não é indicado para a detecção de IgM.

Palavras-chave: Zika. Chikungunya. Diagnóstico. Arbovírus. Vírus.

ABSTRACT

SILVA, Angelica. 2018. **Enzymme immunoassay using infected cells as antigen for diagnosis of infections by Zika vírus and Chikungunya vírus.** Dissertation (Master Degree) – Basic and Applied Immunology Graduate School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

In Brazil, Zika and Chikungunya viruses have been causing huge epidemics with great morbidity and significant mortality. It's important to develop effective diagnostic methods to discriminate against their infections. In the present study, we developed immunoenzymatic assays using cultured cells from aedes albopictus C6 / 36 infected and used as viral antigen (EIA-ICC), for diagnosis of infections caused by the Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses. Plates containing infected cells had their antigenicities verified in the assays using polyclonal antibodies from mice hyperimmunized with ZIKV, CHIKV and other flaviviruses and alphaviruses. The EIA-ICC ZIKV detected murine antibodies in a homotypic manner, but cross-reactions were found with Dengue 1 virus (DENV 1), Saint Louis virus (SLEV), Rocio virus (ROCV) and West Nile virus (WNV). The EIA-ICC CHIKV also detected murine antibodies in a homotypic manner and cross-reactions were observed with the Mayaro virus (MAYV) and Mucambo virus (MUCV). Comparative results of 39 samples were performed in the EIA-ICC ZIKV, which showed sensitivity of 87.5% (IgM) and 100% (IgG) and specificity of 95.65% (IgM) and 83.33% (IgG). The EIA-ICC CHIKV, a comparative test among 59 samples, showed a sensitivity of 64.7% (IgM) and 92.3% (IgG) and a specificity of 40% (IgM) and 96.96% (IgG). The EIA-ICCs were also used for diagnosis of ZIKV and CHIKV arboviruses in 174 sera from patients with acute febrile illness. In the EIA-ICC, ZIKV found 8.13% IgM, 20.34% IgG and 6.97% IgG and IgM in the same serum, in the EIA-ICC CHIKV we found IgG in 8.13% of the sera and IgG in 16.86%, sera with IgG and IgM antibodies in them were seen in 1.74%. We also found 11 samples positive for both ZIKV and CHIKV. Therefore, the EIA-ICC ZIKV showed for detection of IgM and IgG, adequately sensitive and specific to be validated in studies with larger numbers of samples and to be applied in the diagnosis. The EIA-ICC CHIKV showed for IgG detection, adequately sensitive and specific to be validated in studies with larger numbers of samples and to be applied in the diagnosis. However, it is not indicated for the detection of IgM.

Keywords: Zika. Chikungunya. Diagnosis. Arbovirus. Virus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo resumido da replicação dos Flavivirus.....	16
Figura 2: Ciclo resumido da replicação do vírus Chikungunya.	20
Figura 3: Esquema do EIA-ICC mostrando os passos da reação.....	29
Figura 4: RT-PCR em tempo real para ZIKV.	32
Figura 5: RT-PCR em tempo real para CHIKV	33
Figura 6: Teste de imunofluorescência indireta para os vírus Zika e Chikungunya.	33
Figura 7: Fotografia de placa de titulação do ZIKV.	34
Figura 8: Fotografia de placa de titulação do CHIKV	35
Figura 9: Titulação dos fluidos ascíticos imunes murinos para ZIKV.....	36
Figura 10: Titulação dos fluidos ascíticos imunes murinos para CHIKV	36
Figura 11: Teste de reatividade cruzada ZIKV.	37
Figura 12: Teste de reatividade cruzada CHIKV	38
Figura 13: Positividade de anticorpos IgG e IgM para ZIKV detectados pelo EIA-ICC em 172 soros humanos.	45
Figura 14: Positividade de anticorpos IgG e IgM para CHIKV detectados pelo EIA-ICC em 172 soros humanos.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs ZIKV e CHIKV com testes previamente validados e/ou reconhecidos com uso rotineiro.....	31
Tabela 2: Sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs de ZIKV e CHIKV com base em resultados plotados na Tabela 1.....	31
Tabela 3: Titulação dos MIAFs reativos no EIA-ICC ZIKV	37
Tabela 4: Titulação dos MIAFs reativos no EIA-ICC CHIKV	38
Tabela 5: Resultados de positividade IgG e IgM anti-Zika obtidos por EIA-ICC-ZIKV, também incluindo Combo Test Card vírus Zika	39
Tabela 6: Comparação de resultados obtidos pelos IgM ZIKV-EIA-ICC e pelo Combo Test Card de ZIKV.....	40
Tabela 7: Resultados comparados de IgM pelo EIA-ICC do ZIKV com os do Combo Test Card determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem.....	40
Tabela 8: Comparação de resultados obtidos pelos IgG ZIKV-EIA-ICC e pelo Combo Test Card de ZIKV	41
Tabela 9: Resultados comparados de IgG pelo EIA-ICC do ZIKV com os do Combo Test Card determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem.....	41
Tabela 10: Resultados de positividade IgG e IgM anti-Chikungunya obtidos por EIA-ICC CHIKV, também incluindo ELISA proteína rE2-CHIKV	42
Tabela 11: Comparação de resultados obtidos pelos IgM CHIKV-EIA-ICC e pelo IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV	43
Tabela 12: Resultados comparados de IgM pelo EIA-ICC do CHIKV com os do IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem	43
Tabela 13: Comparação de resultados obtidos pelos IgG CHIKV-EIA-ICC e pelo IgG-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV.....	44
Tabela 14: Resultados comparados de IgG pelo EIA-ICC do CHIKV com os do IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem	44
Tabela 15: Resultados do IgM/IgG EIA-ICC ZIKV analisando soros de 172 pacientes.....	45

Tabela 16: Resultados do IgM/IgG EIA-ICC CHIKV analisando soros de 172 pacientes.....	45
Tabela 17: Resultados observados com 11 soros de pacientes que reagiram positivamente para ZIKV e CHIKV.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Os <i>Flavivirus</i>	14
1.1.1 Estrutura e replicação do vírus Zika	15
1.1.2 Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da infecção pelo vírus Zika	17
1.2 Os <i>Alphavirus</i>	17
1.2.1 Estrutura e replicação do vírus Chikungunya	18
1.2.2 Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos do vírus Chikungunya	20
1.3 Métodos Laboratoriais para diagnóstico do Zika e Chikungunya.	22
2. OBJETIVO	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Amostras Clínicas	24
3.2 Células de <i>Aedes albopictus</i> clone C6/36	24
3.3 Estoque viral	25
3.4 RT-PCR para os vírus Zika e Chikungunya	25
3.5 Anticorpos	26
3.6 Imunofluorescência indireta	26
3.7 Quantificação Viral	26
3.8 Ensaio Imunoenzimático em Células de Cultura Infectadas (EIA-ICC)	27
3.8.1 Preparo das microplacas	27
3.8.2 O EIA-ICC	28
3.9 Combo <i>Test Card</i> ZIKV	29
3.10 ELISA da proteína de envelope CHIKV	30
3.11 Análise de sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs ZIKV e CHIKV	30

4. RESULTADOS	32
4.1 Confirmação da identidade viral por RT-PCR nos estoques de ZIKV e CHIKV	32
4.2 Comprovação de infecção celular por ZIKV e CHIKV	33
4.3 Estoques de ZIKV e CHIKV quantificados	34
4.4 Padronização dos EIA-ICCs para ZIKV e CHIKV	35
4.4.1 Titulação dos MIAFs anti-Zika e anti-Chikungunya	35
4.4.2 Reatividade cruzada no EIA-ICC de ZIKV	36
4.4.3 Reatividade cruzada no EIA-ICC-CHIKV	37
4.4.4 Sensibilidade e especificidade do EIA-ICC de ZIKV	38
4.4.5 Sensibilidade e especificidade do EIA-ICC de CHIKV	41
4.5 Análise das amostras de pacientes com doença febril aguda por EIA-ICC de ZIKV e de CHIKV	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Os arbovírus são um problema sério de saúde pública no mundo. Vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) são mantidos em um ciclo de transmissão envolvendo vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados. Trabalhos realizados com vírus Zika e Chikungunya demonstram o alto potencial de transmissão destas viroses por mosquitos *Aedes aegypti* (GÖERTZ et al., 2017; PEREIRA-SILVA et al., 2018). Segundo o Boletim Epidemiológico 23 de 2018, no ano de 2017 entre as semanas epidemiológicas 1 e 52, foram registrados 185.854 casos prováveis de febre Chikungunya, e em 2016 cerca de 277.882 casos. Já o vírus Zika registrou nestas mesmas semanas 17.594 casos prováveis de doença aguda, e em 2016, 216.207 casos prováveis. A sintomatologia febril aguda das principais arboviroses, que acometem tanto o Brasil quanto a região sul americana, é semelhante, o que dificulta o diagnóstico clínico-etiológico, e por isso faz-se importante o uso de metodologias laboratoriais que permitam esse diagnóstico, inclusive, para permitir tratamento adequado dos pacientes.

1.1 Os *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* possui três gêneros, *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus* foi subdividido em grupos que incluem os vírus transmitidos por mosquitos, por carrapatos e aqueles que não tem vetores artrópodes (STRAUSS, J.H. & STRAUSS., 2002)

Flavivirus são vírus de RNA com fita positiva e muitos deles são patógenos humanos, como os vírus do dengue (DENV- sorotipos 1-4), vírus Zika (ZIKV), vírus West Nile (WNV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da febre amarela (YFV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV). ZIKV, DENV e YFV são transmitidos por mosquitos, enquanto outros (como TBEV) são transmitidos por carrapatos. ZIKV e DENV são principalmente transmitidos por *Aedes aegypti*, que se espalhou rapidamente durante as últimas décadas, após a proibição do inseticida DDT e o abandono do tratamento de lagos e pântanos com óleo para matar as larvas do mosquito (WANG et al., 2013).

O nome *Flaviviridae* é originário do latim *flavus*, que significa “amarelo”, como na icterícia induzida pelo YFV, o vírus protótipo da família. Os Flavivírus são icosaédricos e envelopados. Na forma madura, ZIKV, DENV, WNV e YFV têm aproximadamente 500 Å de diâmetro, enquanto que os vírus imaturos têm 600 Å de diâmetro. Contêm uma única cadeia positiva de RNA contendo aproximadamente 11.000 pares de bases. O genoma é empacotado com

múltiplas cópias da proteína do capsídeo, contido dentro de uma bicamada lipídica de seu hospedeiro, acrescida por 180 cópias das glicoproteínas do envelope (E) e da membrana (M), com 495 e 75 aminoácidos, respectivamente. (LINDENBACH & RICE, 2007).

No Brasil são também conhecidos outros *Flavivirus*, como o Bussuquara (BUSV), o Cacipacoré (CPCV), o Iguape (IGUV), o Ilhéus (ILHV), o Rocio (ROCV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). Estudos sobre a filogenia dos flavivirus brasileiros os agrupam em três ramos em árvore filogenética: o grupo da encefalite japonesa, que inclui os vírus ILHV, ROCV, SLEV, CPCV, BUSV; o grupo do dengue que inclui os DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4; e o ramo YFV (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003).

1.1.1 Estrutura e replicação do vírus Zika

O Vírus da Zika (ZIKV) é membro da família *Flaviviridae*, gênero *flavivirus*. O ZIKV, assim como os vírus da Dengue e o da Febre Amarela, é transmitido aos seres humanos através da picada da fêmea de mosquitos, em especial o *Aedes aegypti* (KUNO *et al.*, 1998). Assim como demais Flavivírus, o ZIKV é envelopado com genoma de RNA de fita simples e sentido positivo, contendo 10794 kb (Figura 1A). Seu genoma inclui cadeia aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína e duas regiões flangeadoras não codificantes (5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3').

O ciclo reprodutivo do ZIKV inicia com o reconhecimento da partícula viral pela célula hospedeira e internalização por endocitose seguida por acidificação dos endossomos, resultando em mudanças conformacionais que levam a fusão do envelope viral ao do endossoma e liberação do RNA viral no citoplasma celular (Figura 1) (BRESSANELLI *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2004). O RNA liberado codifica um precursor poliproteico de aproximadamente 3400 aminoácidos que no retículo endoplasmático é co- e pós-traducionalmente processado por proteínas virais (NS2B/NS3) originando 10 proteínas, 3 delas proteínas estruturais: proteína do capsídeo C, proteína E e pré-membrana (prM) e 7 proteínas não estruturais: NS (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que auxiliam a replicação e processamento da poliproteína e montagem do *virion* (LINDENBACH *et al.*, 2007).

A proteína do capsídeo (C) é inserida no RE onde sofre clivagens para liberação da proteína do capsídeo madura. A proteína pré M é inserida na membrana do RE, possibilitando a inserção da proteína E com orientação correta, formando um heterodímero, que aparentemente impede que a proteína E sofra mudanças conformacionais, expondo-se a peptídeos de fusão. Assim como a pré M, a proteína E possui uma sequência sinal para a inserção da proteína não

estrutural NS1 na membrana do RE, onde irá atuar nos passos iniciais da síntese de RNA viral (KUHN, 2011; CHAMBERS *et al*, 1990).

Posteriormente, o RNA viral é utilizado como molde pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) para formação de uma fita de sentido negativo que será utilizada como molde para a formação das várias cópias de fitas positivas do RNA da progênie viral (KUHN, 2011).

Múltiplas cópias da proteína C com o RNA viral recém-sintetizado na membrana do RE formam o nucleocapsídeo viral que se liga a porções citoplasmáticas das glicoproteínas virais ancoradas nessa membrana, resultando na montagem de partículas virais por brotamento para dentro do *lumen* do RE. Neste momento, as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas. As partículas imaturas são transportadas pela via secretora celular até o Complexo de Golgi, onde o pH baixo favorece o dobramento da proteína E e a clivagem de pré M pela protease furina do hospedeiro (resultando em proteína de membrana M e peptídeo *pr* que é secretado no meio extracelular). Com isto, a partícula viral torna-se madura por rearranjo no envelope viral e é liberada para o extracelular em vesículas que se fundem à membrana citoplasmática (KUHN, 2011).

Figura 1: Ciclo resumido da replicação dos *Flavivirus*. Os vírus se ligam a receptores na célula hospedeira e internalizam por endocitose. Nos endossomos, o envelope viral se funde com a membrana do hospedeiro e o capsídeo viral se desmonta, liberando o genoma viral no citoplasma. No RE, as proteínas virais são traduzidas pelos ribossomos do hospedeiro. A RNA polimerase dependente de RNA viral replica o genoma viral em compartimentos de membrana especializados derivados de RE. Nucleocapsídeos virais montados brotam no lumen do RE e são liberados da célula através da via secretória. Durante o trânsito dos flavivírus no aparelho de Golgi, a protease furina do hospedeiro processa a proteína do envelope viral prM. O virion é liberado para o extracelular em vesículas que se fundem à membrana citoplasmática (GEROLD et al., 2017).

1.1.2 Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos da infecção pelo vírus Zika

ZIKV foi inicialmente isolado em 1947, na Floresta Zika em Uganda, do sangue de macaco *Rhesus* sentinela em um estudo sobre febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, soube-se que o vírus causava infecção humana, o que foi confirmado com base em dados sorológicos obtidos em Uganda em 1969 e 1970, Nigéria em 1971 e 1975, Serra Leoa em 1972, Gabão em 1975, República Centro Africano em 1979, Senegal em 1988-1991 e *Cote d'Ivoire* em 1999 e novamente, Senegal em 2011 e 2012 (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Acredita-se que a infecção humana por vírus Zika seja transmitida por mosquitos *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus* e *Aedes aegypti* (MARCHETTE *et al.*, 1969).

O primeiro grande surto por vírus Zika estudado ocorreu, em 2007, na ilha de Yap e outras ilhas da Micronésia. Inicialmente, suspeitou-se que o causador do surto seria o vírus da Dengue, porém exames sorológicos e de biologia celular identificaram o agente etiológico como sendo o vírus Zika. Neste surto, mais de 8.000 pessoas foram afetadas sendo cerca de 70% da população, todos residentes na ilha de Yap, evidenciando o papel deste vírus como causador de uma doença emergente (BALM *et al.*, 2012; DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M. *et al.*, 2009).

A maioria dos pacientes acometidos com o vírus são assintomáticos (DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M. *et al.*, 2009) porém, os que apresentam sintomatologia a febre Zika surge cerca de 7 dias após a picada e duram de três a doze dias. Também, foram relatados casos assintomáticos. Entre esses sintomas temos artralgia, dores de cabeça, dor retro-orbital, febre baixa, edema nas extremidades, mialgia, hiperemia conjuntival e erupções cutâneas maculopapulares (geralmente se espalhando pela face) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015).

Em maio de 2015, foram confirmados os primeiros casos de febre Zika no nordeste do Brasil (ZANLUCA *et al.*, 2015).

Em fevereiro de 2016, ZIKV foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como emergência global em saúde pública, pelos casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016; GULLAND, 2016).

1.2 Os *Alphavirus*

Na família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* estão incluídas 30 espécies (ICTVdb, 2016) contidas em pelo menos oito complexos antigênicos (GRIFFIN, 2013). Os *Alphavirus* também

podem ser classificados os sintomas clínicos que produzem ao infectarem seres humanos e suas distribuições geográficas. Portanto existem (1) *Alphavirus* do novo mundo e causadores de encefalites, como os vírus das encefalites equinas venezuelana (VEEV), do leste (EEEV) e do oeste (WEEV) e (2) os *Alphavirus* do velho mundo, causadores de artropatia, como o Chikungunya (CHIKV), o Ross River (RRV), o Sindbis (SINV), O'nyong-nyong (ONNV) e Barmah Forest (BFV). O vírus Mayaro (MAYV) comporta-se de forma distinta pois é um vírus do novo mundo que produz artropatia humana (ASSUNCAO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013).

Filogeneticamente, CHIKV pertence ao complexo do vírus da Floresta Semliki (SFV) que, também, contém o vírus Ross River (RRV) (SIMON et al., 2011). A infecção humana por CHIKV, que dura em média 12 dias, produz viremia precoce ao início do quadro febril, podendo atingir 10^9 ou mais cópias de RNA viral/mL (SIMON et al., 2011). Também, já foram descritas patologias associadas à infecção do sistema nervoso em pacientes infectados por CHIKV (DAS et al., 2015). Em animais de laboratório, CHIKV já foi encontrado em tecido conjuntivo, fibroblastos musculares, articulares e cutâneos, e mesmo no sistema nervoso central (SNC), mas não em tecidos fetais ou placentários.

Na maioria dos pacientes com CHIKV ocorre doença febril aguda de 2 a 6 dias após a infecção. Nesta fase aguda são sintomas mais frequentes a febre alta, artralgias, dor nas costas e dor de cabeça. Também podem ocorrer fadiga intensa, anorexia, mialgias, náuseas e vômitos em adultos e pacientes idosos podem apresentar confusão mental. Após uma semana de desconforto intenso, dor e incapacidade, a maioria dos pacientes entra em convalescença. Características atípicas da infecção por CHIKV podem envolver o SNC, com convulsões, meningoencefalite e paralisia flácida de Guillain-Barré. Após uma semana de doença a doença pode recrudesce com exacerbação e/ou persistência dos sintomas, recidivas inflamatórias. Reumatismo duradouro com perda significativa na qualidade de vida, caracteriza a fase crônica pós infecção por CHIKV (SIMON et al., 2011).

1.2.1 Estrutura e replicação do vírus Chikungunya

Alphavirus são pequenos, com 65-70 nm de diâmetro, icosaédricos e envelopados. O genoma viral consiste de uma fita simples de RNA com sentido positivo (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015). O RNA possui duas regiões de leituras abertas (ORFs) separadas por uma região intergênica. A primeira ORF inclui dois terços do genoma do vírus e é responsável pela codificação de quatro proteínas não estruturais (nsP1-4). Já a segunda ORF, inclui uma

poliproteína, que após clivagem, codifica as proteínas estruturais do capsídeo (C), e do envelope viral, E3, E2, 6k e E1 (DE OLIVEIRA MOTA et al., 2015).

O ciclo de replicação dos *Alphavirus*, como mostrado na Figura 2, é rápido, pois leva cerca de 4 horas. Tem início com a partícula viral aderindo à célula, ligando-se a proteína viral E2 a receptores de membrana celular. A adesão é seguida de endocitose do vírus, acidificação do vacúolo que leva a modificações estruturais com exposição da proteína estrutural E1, mediando a fusão das membranas viral e vesicular, com liberação do genoma viral no citoplasma celular (KUHN, 2013). O RNA viral, como RNAm, inicia nos ribossomas do retículo endoplasmático a produção das proteínas não estruturais. Desta forma, as nsPs são traduzidas a partir do RNA genômico formando um complexo de replicação, importante para a transcrição do RNA viral. Este complexo de replicação atua na formação de um RNA subgenômico intermediário, de sentido negativo, que serve como molde para a síntese de novos genomas e para a tradução das proteínas estruturais do vírus (KUHN, 2013). Dessa forma, inicialmente, o RNA viral forma duas poliproteínas. A menor e mais abundante é a p123, e a outra, a poliproteína maior P1234, ambas sofrendo ação da nsP2. O RNA subgenômico é traduzido para formação de uma poliproteína e esta processada para formação das proteínas estruturais na sequência capsídeo-PE2(E3+E2)-6K-E1. Estas proteínas sofrem sua maturação no aparelho de Golgi e em seguida são transportadas pelo retículo endoplasmático até a membrana plasmática, onde os vírus são exteriorizados por brotamento (KUHN, 2013).

Figura 2: Ciclo resumido da replicação do vírus Chikungunya. Proteína E2 liga-se à superfície celular através de um receptor desconhecido e possivelmente glicosaminoglicano como fatores de adesão. (ii) o CHIKV entra na célula através de endocitose mediada por clatrina. A acidificação dos endossomos leva à inserção do peptídeo de fusão na proteína E1 na membrana endossômica. (iii) A fusão do envelope viral e da membrana endossômica liberta o nucleocapsídeo no citosol. (iv) A desmontagem do nucleocapsídeo libera o RNA genômico de sentido positivo e a tradução de proteína não estrutural (nsP) ocorre. (v) Quatro nsPs, juntamente com RNA genômico e presumivelmente hospedam proteínas, montam-se na membrana plasmática (MP) e modificam-no para formar compartimentos de replicação viral (esférulas) contendo dsRNA. A nsP1–4 funciona como uma replicase e localiza-se no colo esferoide para gerar vRNAs genômicos, antigenômicos e subgenômicos. (vi) internalização da esférula permite a formação de grandes vacúolos citopáticos (CPV-1) que abrigam múltiplas esférulas. As esférulas no MP ou no CPV-I são totalmente funcionais. vii) A tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural e a autoproteólise da cápside libera o capsídeo livre no citoplasma. Translocação de Poliproteínas E3-E2-6K-E1 / E2-E2-TK no pronto-socorro. E2 / E1 são modificados pós-traducionalmente, transitam pelo sistema secretor e são depositados na MP. (viii) A interação do capsídeo e RNA genômico leva à formação de nucleocapsídeos icosaédricos. (ix) Nucleocapsídeos se reúnem com E2 / E1 no PM, resultando em brotamento de vírions da progênie madura. (x) Posteriormente, os CPV-II se formam, contendo reticulados hexagonais de E2 / E1 e estão repletos de nucleocapsídeos. (xi) Os CPV-II provavelmente servem como veículos de transporte e locais de montagem para proteínas estruturais, permitindo a formação de vírions e egressos maduros (SILVA et al., 2017).

1.2.2 Aspectos fisiopatológicos e epidemiológicos do vírus Chikungunya

Os registros de doenças mais antigos relacionados aos Alphavírus datam dos séculos 18 e 19, quando ocorreram epidemias de encefalite em cavalos no nordeste dos Estados Unidos e surtos de artrite humana no Sudeste Asiático (GRIFFIN, 2013). O primeiro relato claro de encefalite equina epidêmica é de 1831, quando 75 cavalos morreram em Massachusetts (GRIFFIN, 2013). Desde então, vários surtos locais de encefalite em cavalos foram observados ao longo da costa atlântica dos Estados Unidos e na região dos Pampas Da América do Sul (GRIFFIN, 2013). No entanto, o primeiro Alphavírus a ser isolado foi o WEEV, de tecidos do sistema nervoso central (SNC) de 2 cavalos de Nova Jersey e Virgínia (MEYER, 1931).

A primeira associação clara de um *Alphavírus* com doença artrítica ocorreu em 1953, na Tanzânia, no leste da África. CHIKV, agente etiológico desta doença, foi isolado a partir de sangue de pessoas com artrite (ROBINSSON, 1955; GRIFFIN, 2013). Nos próximos anos, vários vírus que causam artrite foram isolados na África, Austrália e América do Sul (GRIFFIN, 2013).

CHIKV é um arbovírus zoonótico que foi primeiramente isolado de um primata, na África, em 1952 (MASON; HADDOW, 1957) (ROBINSONM, 1955). Sua transmissão para os seres humanos é similar ao DENV, por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Após a infecção no tecido subcutâneo o CHIKV é fagocitado pelas células dendríticas que migram para os nódulos linfáticos, fazendo a apresentação de antígenos virais ao sistema imune adaptativo. O sistema imune inato auxilia no combate principalmente pela produção de interferon do tipo I, que limita a replicação viral (SCHILTE et al., 2010).

Em estudos clínicos de pacientes da Ásia e Oceano Índico, a febre Chikungunya se manifesta de 2 a 4 dias após a picada do mosquito infectado. A viremia persiste até o quinto dia após o início dos sintomas, que são: febre (92% dos casos), tipicamente associada a artralgia (87%), dor nas costas (67%) e dor de cabeça (62%). A febre pode atingir a temperatura entre 39 e 40°C. Em vários casos, observou-se, erupção cutânea acometendo a face, membros, tronco e persistindo por até 10 dias. Também, foram observadas manifestações neurológicas (convulsões febris, meningite e encefalite) e oculares (neuroretinite e uveíte). A febre, a artrite e o exantema podem recrudescer após um período de remissão aparente. Em alguns casos a artrite pode ser grave e debilitante. Choque ou morte são raros em infecções por CHIKV. A febre do Chikungunya, tem convalescença exigindo período mais longo de repouso que o dengue (SIMON et al., 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, em 2015, o Brasil registrou 38.332 possíveis casos de febre da Chikungunya, em 696 municípios. Destes casos, 13.236 foram confirmados e ocorreram 6 óbitos, na Bahia (3 óbitos), Sergipe (1 óbito), São Paulo (1 óbito) e Pernambuco (1 óbito). Os casos fatais ocorreram em idosos (mediana da idade de 75 anos). Até a SE 32, foram registrados 20.598 casos prováveis de febre de Chikungunya, com uma incidência de 10,1casos/100 mil habitantes.

Em 2016, até a SE 32, foram registrados 216.102 casos prováveis de febre de Chikungunya no país (incidência de 105,7 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.248 municípios. Destes casos, 102.638 foram confirmados. Observou-se que a região Nordeste apresentou a maior incidência de casos, 335,6 casos/100 mil hab. Destacaram-se neste surto de CHIKV o Rio

Grande do Norte (649,1 casos/100 mil hab.), Pernambuco (434,7 casos/100 milhab.) e Alagoas (397,9 casos/100 mil hab.).

1.3 Métodos Laboratoriais para diagnóstico do Zika e Chikungunya.

De forma geral infecções virais podem ser diagnosticadas basicamente por **1)** pesquisa de genoma do vírus pela reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), realizado até o 5º dia após o aparecimento dos sintomas; **2)** tentativa de isolamento viral, também realizado até o 5º após aparecimento dos sintomas; **3)** pesquisa de anticorpos IgM e IgG por testes sorológicos (ELISA) e Imunofluorescência Indireta (IFI) realizados após o 5º dia após o aparecimento dos sintomas, ou ainda, **4)** estudo anamopatológico seguido de pesquisa de antígenos virais por imunohistoquímica, nos casos fatais (SBPC/ML, 2016).

Atualmente, para diagnóstico laboratorial de ZIKV e CHIKV em unidades de saúde, os pacientes internados ou graves tem sangue periférico coletado para obtenção do soro, o qual será testado por RT-PCR quanto a presença do vírus. Quando possível, também, são coletadas amostras de líquido, urina e fragmentos de tecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Nas gestantes infectadas por ZIKV e seus recém natos, particularmente aqueles com microcefalia, colhe-se sangue periférico da mãe, do neonato, do cordão umbilical e líquido para serem testados quanto à presença de anticorpos anti-ZIKV e também, são testados por RT-PCR, assim como a urina e fragmentos de placenta, procurando pelo genoma viral. Em natimortos ou abortos suspeitos de microcefalia, coletam-se fragmentos de cérebro, fígado, coração, pulmão, rim e baço, para RT-PCR e imunohistoquímica (SBPC/ML, 2016).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Diagnosticar infecções por ZIKV e CHIKV utilizando ensaio imunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no teste de amostras clínicas de pacientes com doença febril aguda.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Padronizar ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos IgM e IgG contra ZIKV e CHIKV em placas utilizando células infectadas como antígeno (EIA-ICC).
- ✓ Testando soros humanos de pacientes com doença febril aguda, determinar a sensibilidade e especificidade do EIA-ICC por comparação com ensaio sorológico comercial para ZIKV e com ELISA utilizando antígeno de envelope do CHIKV.
- ✓ Utilizar EIA-ICC de ZIKV e CHIKV na avaliação rotineira do soro de pacientes com doença febril aguda.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de pesquisa em Virologia da FMRP-USP (CPV-FMRP-USP) e dividido em duas partes:

- 1ª – Otimização/padronização do EIA-ICC;
- 2ª – Aplicação do EIA-ICC em soros durante epidemia de Zika em 2016.

3.1 Amostras Clínicas

Um número de 172 amostras clínicas foram fornecidas pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HC-RP), vindas de pacientes com doença febril aguda, entre os anos de 2016 e 2017. Estas amostras foram estocadas a -70°C no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) com o número: 2018/2.641.138. O documento de aprovação encontra-se como anexo 1.

Para realização do teste de sensibilidade e especificidade do EIA-ICC CHIKV foi utilizado um painel de 59 amostras, de pacientes com suspeita clínica de infecção por CHIKV do estado de São Paulo, com o comitê de ética aprovado pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, processo nº 2.206.200.

3.2 Células de *Aedes albopictus* clone C6/36

Células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 foram utilizadas na obtenção das sementes virais. As células foram mantidas em meio de Leibowitz L-15 (GIBCO- New York, USA) contendo 10% de soro fetal (SBF) inativado pelo calor, 10% de triptose fosfato, 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina. As colônias de células C6/36 foram cultivadas em frascos com tampa selada e mantidas a 28°C em estufa comum (FIGUEIREDO, 1990).

3.3 Estoque viral

Foram utilizadas as cepas ZIKV^{BR} do vírus Zika e ATCC VR 64 do vírus Chikungunya. Os vírus foram inoculados em cérebros de camundongos recém-nascidos e o fluido de macerado de cérebro dos animais doentes, inoculado nas células C3/. As inoculações de 100 µl da semente viral foram feitas em frascos contendo monocamadas celulares com 90% de confluência e após descarte do meio de cultivo. Os frascos foram mantidos na estufa por 1 hora para adsorção viral, adicionando-se em seguida o meio L-15 com 2% de SBF e incubação de 3 (CHIKV) ou 6 dias (ZIKV) a 28°C. Após este período, o sobrenadante foi retirado, juntamente com a monocamada de células e centrifugado a 1000 RPM, a 4°C e por 20 minutos. Ao final fez-se alíquotas em tubos devidamente identificados, que foram armazenados a -80°C.

3.4 RT-PCR para os vírus Zika e Chikungunya

Para realizar a pesquisa de genoma viral para confirmação da veracidade dos vírus estudados foi realizada a extração do RNA dos estoques virais, reação da transcriptase reversa (RT) e o PCR em tempo real para o estoque do vírus Zika e do Chikungunya.

O RNA dos estoques virais foi extraído utilizando *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Os precipitados foram suspensos em 50 µL da solução tampão AVE.

A reação de transcrição reversa (RT), usada na conversão do RNA viral em cDNA, dos estoques virais ZIKV e CHIKV, foram feitas com a enzima *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA), seguindo as orientações do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems, EUA).

A PCR em tempo real realizada para o vírus ZIKV foi feita com os *primers* ZIKV 1086 (posição no genoma: 1086–1102; sequência 5'- CCGCTGCCCAACACAAG – 3', ZIKV 1162c (posição no genoma: 1162–1139; sequência 5'- CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT – 3', e, sonda TaqMan ZIKV 1107-FAM (posição no genoma: 1107–1137; sequência 5'- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA – 3') seguindo protocolo de LANCIOTTI et al., 2008.

Para detectar genoma viral nos estoques de CHIKV realizou-se RT-PCR em tempo real com os primers M2W e cM3W previamente descritos (DE MORAIS BRONZONI et al.,

2005). Estes primers amplificam 434 pb, parte do gene da proteína não estrutural 1 (NSP1) e são capazes de detectar 27 espécies de Alphavirus (posição no genoma: 164-186; sequência M2W: 5'- YAGAGCDTTTTTCGCAWSTRGCHW - 3'), reverse (posição no genoma: 568-598; sequência cM3W: 5'- ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCCDAYCC – 3'). A PCR em tempo real foi adaptada por Romeiro et al., 2016 pelo método SybrGreen.

3.5 Anticorpos

Para a padronização do ensaio imunoenzimático e confirmação da infecção viral nas células utilizaram-se fluidos ascíticos imunes murinos (MIAFs) anti-ZIKV e anti-CHIKV preparados por imunização intra-peritoneal semanal dos animais (FIGUEIREDO, 1990).

3.6 Imunofluorescência indireta

A infecção celular por ZIKV ou CHIKV foi confirmada pela detecção dos antígenos virais por teste de imunofluorescência indireta (IFI). Para tanto, as células supostamente infectadas com ZIKV foram transferidas para *spots* de lâminas de imunofluorescência (Perfecta, Brasil). Após secagem ao ar livre, as células foram fixadas em acetona gelada e posteriormente adicionou-se o MIAF anti-ZIKV ou anti-CHIKV. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS (pH 7,2) por 5 min e incubadas com anticorpo (secundário) anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, USA). As lâminas montadas com lamínula foram examinadas ao microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i).

3.7 Quantificação Viral

A quantidade dos vírus estudados, ZIKV e CHIKV, foi determinada com base na formação de *plaques*. Para tanto, frascos com monocamadas confluentes de células VERO em meio MEM (Vitrocell, Campinas) foram lavados duas vezes com PBS, para remover fragmentos celulares e adicionou-se 1 mL de solução contendo 0,0025% de Tripsina EDTA (Vitrocell, Campinas), para descolar a monocamada de células. Com as células suspensas, adicionou-se 50 mL de MEM e homogenizou-se. Adicionaram-se 300 µL da suspensão celular a cada cavidade de uma microplaca com 24 orifícios e incubou-se a mesma por 24 horas a 37°C,

em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para o teste de *plaques*, adicionou-se às monocamadas celulares diluições decimais, de 10¹ a 10¹⁰, dos estoques virais produzidos e as placas foram mantidas por 1 hora em estufa, a 37°C, sob agitação, para adsorção viral. Em seguida adicionou-se aos orifícios 1 mL de *overlay* contendo uma solução a 3% de Carboximetilcelulose estéril (Sigma-Aldrich, EUA) e 2,5% de soro fetal bovino em MEM. Incubou-se em 5% de CO₂ a 37°C e após alguns dias, ao serem evidenciadas possíveis placas de lise celular, removeram-se os *overlays*, lavaram-se os poços das microplacas e suas células foram fixadas com solução de formol 10% em PBS, incubando-se por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as células fixadas foram coradas com solução de Preto de Naftaleno (Sigma-Aldrich, EUA).

Para cálculo dos títulos virais, contaram-se os *plaques* individualizados e claramente visíveis. Com base nos números de *plaques* de lise celular produzidos pela infecção viral e conhecendo-se os volumes inoculados das diferentes diluições virais, calculou-se a quantidade de vírus em unidades formadoras de *plaques* por mililitro (UFP/mL), utilizando a fórmula:

$$\frac{\text{Média do número de } \textit{plaques} \times \text{diluição viral}}{\text{Volume do inóculo (mL)}}$$

3.8 Ensaio Imunoenzimático em Células de Cultura Infectadas (EIA-ICC)

Para a padronização do ensaio imunoenzimático indireto visando diagnosticar infecções causadas por ZIKV e CHIKV, utilizou-se células do mosquito *Aedes albopictus* C6/36 como antígeno viral. O método EIA-ICC é aqui apresentado em duas partes: preparo das microplacas e realização dos testes (EIA-ICC). As metodologias padronizadas foram adaptadas do trabalho de Barreira et al., 2010.

3.8.1 Preparo das microplacas

Utilizou-se células do mosquito *Aedes albopictus*, da linhagem C6/36, em meio de cultivo Leibowitz L15, contendo 10% de soro fetal bovino, 10% de solução de fosfato triptose, 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina. As células foram mantidas a 28°C em atmosfera úmida até formarem monocamadas confluentes em frascos estéreis de polietileno (CORNING- USA) que foram infectados com ZIKV e CHIKV. Outros frascos foram mantidos sem infecção, para os controles negativos. Para confirmar a infecção por ZIKV e CHIKV, as

células foram transferidas para lâminas de vidro nos círculos delimitados (*spots*), fixadas e submetidas a teste de imunofluorescência indireta. Após esta etapa as células foram transferidas para microplacas de poliestireno estéreis contendo 96 orifícios de fundo chato numa quantidade de 10^6 células em 100 μ L por orifício. Na placa, células infectadas e não infectadas foram adicionadas a colunas de orifícios alternados. Após incubação, as placas foram fixadas em formalina tamponada pH 7 (37-40% de formaldeído – 100 mL, fosfato de sódio dibásico anidro – 6,5 g., fosfato de sódio monobásico – 4g. e água destilada- 900 mL), 50 μ L por poço. Ao final, lavou-se as placas em PBS e após secas, estas foram armazenadas a -70°C até serem utilizadas.

3.8.2 O EIA-ICC

Para a realização do ensaio imunoenzimático propriamente dito, mostrado na Figura 3, acrescentaram-se aos orifício da placa uma solução bloqueadora contendo leite mólico 5% em PBS-Tween 0,05% (200 μ L por poço) e incubou-se as mesmas, a 37°C por 2 horas. Em seguida, lavaram-se as placas 5 vezes com a solução de lavagem (Tween-20 a 0,05% em PBS). Acrescentaram-se aos poços infectados e não infectados, 100 μ L de cada soro humano analisado, na diluição 1/200, em solução de albumina bovina 0,5% com PBS-Tween. Incubaram-se as microplacas por 1 hora a 37°C e seus orifícios foram lavados por 3 vezes. Dependendo do interesse (detecção de IgG ou IgM), acrescentavam-se aos orifícios soluções de peroxidase conjugadas a anticorpos caprinos anti-IgM ou anti-IgG humano (SIGMA, USA) diluídos 1/2000 em solução de albumina bovina 0,05%. Incubou-se por 1 hora, a 37°C e após 5 lavagens dos orifícios, a eles acrescentaram-se 100 μ L do substrato ABTS (KIRKGA ARD & PERRY). As placas, após 15 minutos de incubação a 37°C , foram lidas por densidade optica em espectrofotômetro, comparando-se a cor em amostras adicionadas a orifícios infectadas (soros positivos produziã cor verde) à mesma amostra em orifícios não infectados (ausência de cor). Para avaliar a confiabilidade do teste foram utilizados soros controles positivos.

Figura 3: Esquema do EIA-ICC mostrando os passos da reação. 1. Célula infectada com ZIKV ou CHIKV, fonte de antígeno viral, fixa ao poço da placa. 2. Anticorpo primário, soro, plasma ou líquido do paciente. 3. Anticorpo secundário conjugado de peroxidase a imunoglobulina anti-IgG ou anti-IgM humano (no teste com amostras humanas) ou murino (MIAFs usados nas padronizações). 4. Substrato ABTS, oxidado pela peroxidase do anticorpo secundário produz cor (5). Modificado de: <https://www.leinco.com/indirect-elisa-protocol>.

Foram analisados por EIA-ICC IgG e IgM de ZIKV e CHIKV 172 soros. Amostras positivas foram determinadas com base na leitura da densidade óptica (D.O.) da cor nos orifícios das placas lidas em espectrofotômetro com filtro de 405 nm. Para tanto, calculou-se o *cut-off* que é a média do controle negativo (feito em quadruplicata) somada a três vezes o desvio-padrão. Amostras com a leitura superior a este valor foram consideradas positivas (RAMANI et al., 2010).

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

3.9 Combo Test Card ZIKV

O Zika Vírus IgG/IgM Combo Test Card (Quick Profile™, EUA) foi utilizado no teste de sensibilidade e especificidade EIA-ICC ZIKV como técnica previamente validada afim de comparação. Foi realizado seguindo instrução do fabricante.

3.10 ELISA da proteína de envelope CHIKV

O ELISA utilizando como antígeno a proteína rE2 do CHIKV foi realizado como técnica previamente validada afim de comparação com o EIA-ICC-CHIKV. A técnica foi realizada conforme descrição de Fumagalli et. al., 2018.

3.11 Análise de sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs ZIKV e CHIKV

Sensibilidade e especificidade dos IgGs/IgMs-EIA-ICCs para ZIKV e CHIKV foram avaliadas. Para isto, comparou-se estes testes com aqueles obtidos para os mesmos soros com ensaios previamente validados e/ou reconhecidos e de uso rotineiro. Resultados do IgG e IgM-EIA-ICCs para ZIKV foram comparados a aqueles obtidos com o kit comercial Zika Vírus IgG/IgM Combo *Test Card* (Quick Profire™, USA). Resultados do IgG e IgM EIA-ICC para CHIKV foram comparados aos obtidos com ELISA utilizando como antígeno a proteína recombinante rE2-CHIKV, também, desenvolvido em nosso laboratório e fruto de recente publicação (FUMAGALLI et al., 2018). As comparações em Tabelas 2x2 permitiram avaliar sensibilidade, especificidade e valores preditivos do teste, como mostram as **Tabelas 1 e 2**. Em **A** incluiu-se o número de soros que mostraram positividade simultânea entre os dois testes comparados; em **B** temos o número de soros positivos no EIA-ICC e negativos no teste escolhido para comparação; em **C** incluímos o número de soros negativos no EIA-ICC e positivos no teste comparativo; e finalmente, em **D** o número de soros negativos em ambos os testes.

		Resultado pelo teste validado	
		Positivo	Negativo
Resultado do EIA-ICC	Positivo	A Positivo	B Divergência entre Positividade
	Negativo	C Divergência entre Negatividade	D Negativo

Tabela 1: Sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs ZIKV e CHIKV com testes previamente validados e/ou reconhecidos com uso rotineiro.

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
Valor Preditivo Positivo	$A/(A+B)$	Probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença
Valor Preditivo Negativo	$D/(C+D)$	Probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença

Tabela 2: Sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs de ZIKV e CHIKV com base em resultados plotados na Tabela 1.

4. RESULTADOS

Para padronizar os EIA-ICCs de ZIKV e CHIKV seguiram-se as seguintes etapas: confirmação da identidade viral nos estoques por RT-PCR; comprovação de infecção viral celular por IFI; quantificação dos estoques virais; padronização dos soros imunes murinos nos EIA-ICCs; avaliação de reatividade cruzada bem como, determinação da sensibilidade e da especificidade dos ensaios, foram feitas analisando resultados obtidos com soros imunes murinos e soros de pacientes.

4.1 Confirmação da identidade viral por RT-PCR nos estoques de ZIKV e CHIKV

Analisou-se o estoque de ZIKV a ser utilizado no trabalho por RT-PCR em tempo real, como mostra a **Figura 4**, confirmando a identidade viral pela sobreposição de amplificação entre controle positivo e o estoque ZIKV.

Figura 4: RT-PCR em tempo real para ZIKV. Curva de amplificação ZIKV mostrando amplificação a partir do ciclo 22. O controle positivo está em rosa, o negativo em vermelho e o estoque a ser analisado em roxo. Observa-se a sobreposição entre controle positivo e o estoque confirmando ZIKV.

Também, analisou-se o estoque de CHIKV, por RT-PCR em tempo real, como mostra a **Figura 5**.

Figura 5: RT-PCR em tempo real para CHIKV. A) Curva de amplificação azul do vírus CHIKV mostrando amplificação a partir do ciclo 22. B) Curva de *Melting*, amplificando em aproximadamente 85°C.

4.2 Comprovação de infecção celular por ZIKV e CHIKV

A comprovação de que os vírus contidos nos estoques infectaram as células C6/36 utilizadas nos EIA-ICCs foi obtida por IFI, como mostra a **Figura 6**.

Figura 6: Teste de imunofluorescência indireta para os vírus Zika e Chikungunya. Células de *Aedes albopictus* clone C6/36 infectadas com vírus Zika ou Chikungunya, exibindo, em ambos os casos, clara fluorescência verde citoplasmática. CN: Controle negativo em vermelho.

4.3 Estoques de ZIKV e CHIKV quantificados

Os estoques de ZIKV e CHIKV foram quantificados em unidades formadoras de plaques por mililitro (UFP/mL).

Quanto ao ZIKV, após 6 dias de incubação, as células C3/36 infectadas apresentaram efeito citopático sincicial e morte celular. Neste momento, coletou-se o sobrenadante celular, aliquotou-se e após identificação, armazenou-se em *freezer* a -80°C . O teste de plaques utilizando diluições decimais do estoque de ZIKV foi realizado como explicado no **item 3.7** e constatou-se que continha $4,5 \times 10^6$ UFP/mL, como mostra a **Figura 7**.

Figura 7: Fotografia de placa de titulação do ZIKV. Placa com 24 poços contendo células Vero infectadas com diluições decimais do estoque de ZIKV (10^{-2} a 10^{-6}), mostrando plaques individualizados e contáveis nos orifícios inoculados com 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} , o que permitiu quantificar o estoque de ZIKV em $4,5 \times 10^6$ UFP/mL.

Quanto a CHIKV, células C6/36 no 3º dia pós-infecção, foram submetidas aos mesmos procedimentos confirmatórios citados acima e os sobrenadantes foram armazenados como estoques virais, em *freezer* a -80°C . A quantificação deste estoque, por plaqueamento, mostrou $1,5 \times 10^8$ UFP/mL (**Figura 8**).

Figura 8: Fotografia de placa de titulação do CHIKV. Placa com 24 poços contendo células Vero infectadas com diluições decimais do estoque de CHIKV (10^{-3} a 10^{-7}), mostrando plaques individualizados e contáveis nos orifícios inoculados com 10^{-7} , o que permitiu quantificar o estoque de CHIKV em $1,5 \times 10^8$ UFP/mL.

4.4 Padronização dos EIA-ICCs para ZIKV e CHIKV

Para a padronização dos EIA-ICCs foram realizadas as seguintes etapas: Titulação dos MIAFs anti- Zika e anti-Chikungunya; Teste de reatividade cruzada e Análise de sensibilidade e especificidade dos EIA-ICCs.

4.4.1 Titulação dos MIAFs anti- Zika e anti-Chikungunya

Verificaram-se, por EIA-ICC com os respectivos vírus, os títulos de anticorpos contidos nos MIAFs anti-ZIKV e anti-CHIKV. Também, em seguida, estes MIAFs foram usados como controles positivos nos EIA-ICCs que testaram soros humanos. Para o ensaio, as placas de 96 poços foram preparadas conforme explicado no **item 3.8**. O MIAF anti-ZIKV exibiu título de 6400, como mostra a **Figura 9** e o MIAF anti-CHIKV, mostrou título mais elevado, 102400, **figura 10**.

Figura 9: Titulação dos fluidos ascíticos imunes murinos para ZIKV. Diluições duplas do fluido hiperimune ZIKV, em diluições duplas, utilizando EIA-ICC, evidenciando que este foi 6400. O gráfico mostra as densidades ópticas (D.O.) observadas para cada diluição.

Figura 10: Titulação dos fluidos ascíticos imunes murinos para CHIKV. Diluições duplas do fluido hiperimune CHIKV, em diluições duplas, utilizando EIA-ICC e evidenciando que este foi 102400. O gráfico mostra as densidades ópticas (D.O.) observadas para cada diluição.

4.4.2 Reatividade cruzada no EIA-ICC de ZIKV

Na avaliação da reatividade cruzada, os seguintes MIAFs de *Flavivirus* (anti-DENV tipos 1, 2, 3 e 4, anti-YFV, anti-ILHV, anti-SLEV, anti-WNV e anti-BUSV) foram testados no EIA-ICC de ZIKV, que, também, incluiu como controles negativos os MIAFs anti-CHIKV (*Togaviridae*), anti-PIRY (*Rhabdoviridae*) e anti-OROV (*Peribunyaviridae*). Todos os soros foram testados na diluição 1/100. Os MIAFs anti-DENV1, anti-SLEV, anti-ROCV e anti-

WNV, mostrados na **Figura 11**, exibiram reação positiva (reatividade cruzada) no EIA-ICC para ZIKV e foram titulados em diluições duplas, como mostra a **Tabela 3**.

Figura 11: Teste de reatividade cruzada ZIKV. Reatividade cruzada de 11 MIAFs de Flavivirus por EIA-ICC de ZIKV ressaltando as DOs dos 5 que apresentaram resultado positivo (anti-DENV1, anti-SLEV, anti-ROCV, anti-WNV) incluindo, também, o homólogo anti- ZIKV.

Os títulos dos MIAFs de *Flavivirus* que, como reação cruzada, reagiram positivamente no EIA-ICC de ZIKV foram: anti-ROCV 800, anti-SLEV 200, anti-WNV 100 e anti-DENV1 100, como mostra a **Tabela 3**. O título do MIAF anti-ZIKV, na mesma reação, foi 6400.

Soros								
ZIKV								
ROCV								
SLEV								
WNV								
DENV1								
Diluições	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800

Tabela 3: Titulação dos MIAFs reativos no EIA-ICC ZIKV. Títulos dos dos MIAFs anti-ZIKV, anti-ROCV, anti-SLEV, anti-WNV e anti-DENV-1 no EIA-ICC de ZIKV. A cor cinza indica a máxima diluição no qual o MIAF apresentou positividade.

4.4.3 Reatividade cruzada no EIA-ICC-CHIKV

Na avaliação da reatividade cruzada, os seguintes MIAFs de *Alphavirus* (anti-MAYV, anti-AURAV, anti-MUCV e anti-WEEV) foram testados no EIA-ICC de CHIKV, que,

também, incluiu como controles negativos os MIAFs anti-PIRY (*Rhabdoviridae*), anti-OROV (*Peribunyaviridae*) e anti-ZIKV (*Flavivirus*) e o controle positivo anti-CHIKV. Todos os soros foram testados na diluição 1/100.

Os MIAFs anti-MAYV e anti-MUCV exibiram resultado positivo, por provável reação cruzada, como mostra a **Figura 12** e em seguida, foram titulados.

Figura 12: Teste de reatividade cruzada CHIKV. Reatividade cruzada de 5 MIAFs de Alphavirus, anti-MAYV, anti-MUCV, no EIA-ICC de CHIKV ressaltando suas DOs e incluindo o homólogo anti-CHIKV.

Os 3 MIAFs de *Alphavirus* que tiveram reação positiva exibiram os seguintes títulos no EIA-ICC de CHIKV: MAYV 1600, MUCV 800 e o homólogo CHIKV 102400, como mostra a **Tabela 4**.

CHIKV											
MAYV											
MUCV											
	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400
	DILUIÇÕES										

Tabela 4: Titulação dos MIAFs reativos no EIA-ICC CHIKV. Títulos dos MIAFs de Alphavirus anti-MAYV, anti-MUCV e anti-CHIKV, no EIA-ICC de CHIKV. A cor cinza indica a máxima diluição no qual o MIAF apresentou positividade.

4.4.4 Sensibilidade e especificidade do EIA-ICC de ZIKV

Amostras de pacientes suspeitos de infecção arboviral, em número de 39, foram testadas por IgM e IgG EIA-ICC para ZIKV e estes resultados foram comparados a aqueles

obtidos com os mesmos soros, quando submetidos ao teste rápido Zika Vírus IgG/IgM Combo *Test Card* (Quick Profire™, USA), como mostra na **tabela 5**.

Detecção	EIA-ICC ZIKV		Combo <i>Test Card</i> ZIKV	
	IgG	IgM	IgG	IgM
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
1				
4				
15				
16				
17				
18				
19				

Detecção	EIA-ICC ZIKV		Combo <i>Test Card</i> ZIKV	
	IgG	IgM	IgG	IgM
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				

Tabela 5: Resultados de positividade IgG e IgM anti-Zika obtidos por EIA-ICC-ZIKV, também incluindo Combo Test Card vírus Zika. **Legenda:** Verde: Teste positivo; Rosa: Não detectado.

Na comparação de resultados com o teste rápido Zika Vírus IgG/IgM Combo *Test Card*, a detecção de IgM pelo EIA-ICC de ZIKV, exibiu: 14 amostras positivas em ambos os testes, 1 positivo no EIA-ICC e negativo no Combo *Test Card*, 22 amostras negativas em ambos os testes e 2 foram positivas no Combo *Test Card* e negativas por EIA-ICC, como mostra a **tabela 6**. Portanto, o EIA-ICC de ZIKV, nesta comparação, apresentou 87,5% de sensibilidade, 95,6% de especificidade, valor preditivo positivo (VPP) de 93,3% e valor preditivo negativo (VPN) de 91,6%, como mostra a **tabela 7**.

IgM		Resultado Zika Vírus IgG/IgM	
		Combo Test Card	
		Positivo	Negativo
Resultado EIA-ICC ZIKV	Positivo	A 14	B 1
	Negativo	C 2	D 22

Tabela 6: Comparação de resultados obtidos pelos IgM ZIKV-EIA-ICC e pelo Combo Test Card de ZIKV.

Parâmetro avaliado	Fórmula	Resultado (%)
Sensibilidade	$A/(A+C)$	$14/(14+2) = 0,875 \times 100 = 87,5\%$
Especificidade	$D/(B+D)$	$22/(1+22) = 0,9565 \times 100 = 95,65 \%$
Valor Preditivo Positivo	$A/(A+B)$	$14/(14+1) = 0,9333 \times 100 = 93,33\%$
Valor Preditivo Negativo	$D/(C+D)$	$22/(2+22) = 0,9166 \times 100 = 91,66\%$

Tabela 7: Resultados comparados de IgM pelo EIA-ICC do ZIKV com os do Combo Test Card determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem. Os valores utilizados para cálculo encontram-se na tabela 6.

Na comparação de resultados com o teste rápido Zika Vírus IgG/IgM *Combo Test Card*, a detecção de IgG pelo EIA-ICC de ZIKV foram consideradas: 21 amostras positivas (P), 3 divergentes entre positividade (DP), 15 amostras negativas e nenhuma divergente entre negatividade (DN), dados mostrados na **tabela 8**. Das análises realizadas concluiu-se que o IgG detectado no EIA-ICC de ZIKV exibiu 100% de sensibilidade (Se), 83,33% de especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) de 87,5% e valor preditivo negativo (VPN) de 100%, como mostra a **tabela 9**.

IgG		Resultado Zika Vírus IgG/IgM	
		Combo Test Card	
		Positivo	Negativo
Resultado EIA-ICC ZIKV	Positivo	A 21	B 3
	Negativo	C 0	D 15

Tabela 8: Comparação de resultados obtidos pelos IgG ZIKV-EIA-ICC e pelo Combo Test Card de ZIKV.

Parâmetro avaliado	Fórmula	Resultado (%)
Sensibilidade	$A/(A+C)$	$21/(21+0) = 1 \times 100 = 100\%$
Especificidade	$D/(B+D)$	$15/(3+15) = 0,8333 \times 100 = 83,33 \%$
Valor Preditivo Positivo	$A/(A+B)$	$21/(21+3) = 0,875 \times 100 = 87,5\%$
Valor Preditivo Negativo	$D/(C+D)$	$15/(0+15) = 1 \times 100 = 100\%$

Tabela 9: Resultados comparados de IgG pelo EIA-ICC do ZIKV com os do Combo Test Card determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem. Os valores utilizados para cálculo encontram-se na tabela 8.

4.4.5 Sensibilidade e especificidade do EIA-ICC de CHIKV

Amostras de pacientes suspeitos de infecção arboviral, em número de 59, foram testadas por IgM e IgG EIA-ICC para CHIKV e estes resultados foram comparados a aqueles obtidos com os mesmos soros, quando submetidos a um ELISA utilizando a proteína rE2 de CHIKV como antígeno. Estes resultados são mostrados na **tabela 10**.

Número amostra	EIA-ICC CHIKV		rE2-CHIKV	
	IgG	IgM	IgG	IgM
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				

Número amostra	EIA-ICC CHIKV		rE2-CHIKV	
	IgG	IgM	IgG	IgM
30				
31				
32				
33				
34				
35				
36				
37				
38				
39				
40				
41				
42				
43				
44				
45				
46				
47				
48				
49				
50				
51				=
52				
53				
54				
55				
56				
57				
58				
59				

Tabela 10: Resultados de positividade IgG e IgM anti-Chikungunya obtidos por EIA-ICC CHIKV, também incluindo ELISA proteína rE2-CHIKV. Legenda: Verde: Teste positivo; Rosa: Não detectado.

Na comparação de resultados IgM do EIA-ICC de CHIKV com o IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 de CHIKV como antígeno, foram considerados os seguintes resultados comparativos: 22 amostras positivas (P), 15 divergentes entre positividade (DP), 10 amostras negativas (N) e 12 divergentes entre negatividade (DN), mostrados na **tabela 11**. Com base nestes resultados, o IgM EIA-ICC de CHIKV apresentou 64,7% de sensibilidade, 40% de

especificidade, valor preditivo positivo (VPP) de 59,45% e valor preditivo negativo (VPN) de 45,45%, como mostra na **Tabela 12**.

IgM		Resultado ELISA CHIKK	
		Positivo	Negativo
Resultado EIA-ICC CHIKV	Positivo	A 22	B 15
	Negativo	C 12	D 10

Tabela 11: Comparação de resultados obtidos pelos IgM CHIKV-EIA-ICC e pelo IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV.

Parâmetro avaliado	Fórmula	Resultado (%)
Sensibilidade	$A/(A+C)$	$22/(22+12) = 0,647 \times 100 = 64,7\%$
Especificidade	$D/(B+D)$	$10/(15+10) = 0,4 \times 100 = 40 \%$
Valor Preditivo Positivo	$A/(A+B)$	$22/(22+15) = 0,5945 \times 100 = 59,45\%$
Valor Preditivo Negativo	$D/(C+D)$	$10/(12+10) = 0,4545 \times 100 = 45,45\%$

Tabela 12: Resultados comparados de IgM pelo EIA-ICC do CHIKV com os do IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem. Os valores utilizados para cálculo encontram-se na tabela 11.

Na comparação de resultados com os do IgG-ELISA utilizando a proteína rE2 de CHIKV como antígeno, os valores calculados foram de 24 amostras positivas (P), 1 divergente entre positividade (DP), 32 amostras negativas (N) e 2 amostras divergentes entre negatividade (DN), mostrados na **tabela 13**. Foi encontrado para IgG do EIA-ICC de CHIKV 92,3% de sensibilidade (Se), 96,96% de especificidade (Es), valor preditivo positivo (VPP) foi de 96% e o valor preditivo negativo (VPN) de 94,11%, **tabela 14**.

IgG		Resultado ELISA CHIKK	
		Positivo	Negativo
Resultado EIA-ICC CHIKV	Positivo	A 24	B 1
	Negativo	C 2	D 32

Tabela 13: Comparação de resultados obtidos pelos IgG CHIKV-EIA-ICC e pelo IgG-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV.

Parâmetro avaliado	Fórmula	Resultado (%)
Sensibilidade	$A/(A+C)$	$24/(24+2) = 0,923 \times 100 = 92,3\%$
Especificidade	$D/(B+D)$	$32/(1+32) = 0,9696 \times 100 = 96,96 \%$
Valor Preditivo Positivo	$A/(A+B)$	$24/(24+1) = 0,96 \times 100 = 96\%$
Valor Preditivo Negativo	$D/(C+D)$	$32/(2+32) = 0,9411 \times 100 = 94,11\%$

Tabela 14: Resultados comparados de IgG pelo EIA-ICC do CHIKV com os do IgM-ELISA utilizando a proteína rE2 do CHIKV determinando: Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo em porcentagem. Os valores utilizados para cálculo encontram-se na tabela 13.

4.5 Análise das amostras de pacientes com doença febril aguda por EIA-ICC de ZIKV e de CHIKV

Amostras séricas de 172 pacientes (soro, sangue ou plasma) com doença febril aguda e suspeita de infecção viral, coletadas entre 2016 e 2017, foram testadas pelos EIA-ICCs de ZIKV e CHIKV pesquisando IgG e IgM específicos.

Por **EIA-ICC ZIKV**, das 172 amostras, observou-se apenas IgM em 14 (8,13%) e apenas IgG em 35 (20,34%), também, foram encontrados IgG e IgM positivos em 12 (6,97%) amostras, como mostram a **Tabela 15** e a **Figura 13**.

EIA-ICC ZIKV			
Amostras	IgM	IgG	IgM/IgG
Total	172	172	172
Positivas	14	35	12
% Positivas	8,13%	20,34%	6,97%

Tabela 15: Resultados do IgM/IgG EIA-ICC ZIKV analisando soros de 172 pacientes.

Figura 13: Positividade de anticorpos IgG e IgM para ZIKV detectados pelo EIA-ICC em 172 soros humanos.

Por **EIA-ICC CHIKV** das 172 amostras observou-se apenas IgM em 14 (8,13%), apenas IgG em 9 (16,86%) e em 3 (1,74%) amostras IgM e IgG positivos, como mostram a **Tabela 16** e a **Figura 14**.

EIA-ICC CHIKV			
Amostras	IgM	IgG	IgM/IgG
Total	172	172	172
Positivas	14	29	3
% Positivas	8,13%	16,86%	1,74%

Tabela 16: Resultados do IgM/IgG EIA-ICC CHIKV analisando soros de 172 pacientes.

Figura 14: Positividade de anticorpos IgG e IgM para CHIKV detectados pelo EIA-ICC em 172 soros humanos.

Finalmente, algumas amostras séricas exibiram anticorpos no EIA-ICC para ambos os vírus, ZIKV e CHIKV. Das amostras IgG positivas para ZIKV, 3 apresentaram IgG anti-CHIKV, 2 IgM anti-CHIKV e 1 IgM e IgG positivos anti-CHIKV. Também, observou-se que 2 amostras IgM positivas para CHIKV eram IgG positivas para ZIKV. Ainda, dentre as amostras IgG e IgM positivas para ZIKV encontrou-se 1 IgG-positiva para CHIKV. Estes resultados sugerem possíveis coinfeções ou pacientes que tiveram previamente uma destas arboviroses. Estes resultados são mostrados em detalhe na **Tabela 17**.

		EIA-ICC ZIKV		
		IgG	IgM	IgG/IgM
EIA-ICC CHIKV	IgG	3	2	1
	IgM	2	2	
	IgG/IgM	1		

Tabela 17: Resultados observados com 11 soros de pacientes que reagiram positivamente para ZIKV e CHIKV.

5. DISCUSSÃO

Durante os últimos anos, emergiram no Brasil os vírus Zika e Chikungunya causando enormes epidemias com grande morbidade e significativa mortalidade. O vírus zika, até então, conhecido como causador de uma doença febril aguda sem maiores repercussões, chegou ao Brasil em dezembro de 2015, se espalhando por todo o país e causando mais de 1 milhão de casos. Entretanto, no Brasil, este vírus revelou-se capaz de produzir graves doenças como a paralisia flácida de Guillain-Barré e principalmente uma inédita doença congênita, com repercussões gravíssimas e que culmina com o nascimento de bebês micricefálicos. Foram mais de 2000 casos nos últimos 3 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Diante de tal quadro, a OMS declarou tratar-se de uma “emergência de saúde pública de interesse internacional” (GULLAND, 2016). Desde então, laboratórios de todo o mundo vem desenvolvendo pesquisas com o vírus Zika que, inclusive, mostraram seu neurotrpismo para células primordiais do tecido nervoso, o que explicaria os graves danos neurológicos da doença congênita. Também, vearios grupos de pesquisa vem desenvolvendo métodos diagnósticos em vacinas contra ZIKV.

Em 2015, o vírus Chikungunya surtos no Brasil e havia se espalhado rapidamente para 44 países e territórios (WASHINGTON, 2015). A apresentação clínica da doença causada pelo CHIKV é semelhante à causada por ZIKV e de outras arboviroses, após o período de infecção aguda no qual há um início abrupto de febre, dor de cabeça, erupção cutânea, artralgia e mialgia, que geralmente duram de 1 à 2 semanas (BURT et al., 2012). A maior complicação do CHIKV também está associado aos sistemas cardiovascular, renal, respiratório, hepático, gastrointestinal e adrenal, às vezes coletivamente referidas como “características atípicas” (ECONOMOPOULOU et al., 2009; TANDALE et al., 2009; VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2015). Além disso, um grave distúrbio do sistema nervoso é a complicação grave mais comum da infecção por CHIKV. Em dois estudos investigando manifestações clínicas do vírus em pacientes que necessitam de cuidados intensivos, um distúrbio neurológico foi o o principal sintoma em 61% dos indivíduos (CROSBY et al., 2016) .

O diagnóstico laboratorial de ZIKV e CHIKV pode ser feito de quatro formas diferentes basicamente: pesquisa de genoma, isolamento viral, pesquisa sorológica ou estudos de imuno-histoquímica em casos fatais (SBPC/ML, 2016). Nos casos graves, podem ser utilizadas ferramentas de detecção molecular por RT-PCR de ZIKV e CHIKV, assim como em gestantes e recém nascidos, onde também pode ser realizada a pesquisa de anticorpos no sangue, cordão umbilical ou em amostras de líquido quando se fizer necessário (SBPC/ML, 2016). Para detectar

o RNA de ZIKV no início da doença, a RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) tem sido comumente usada durante as primeiras duas semanas após o início da doença no soro de pacientes (PAZ-BAILEY et al., 2017). Apesar de vários ensaios de RT-PCR do ZIKV descritos, uma avaliação recente mostrou que alguns tinham baixa sensibilidade e incompatibilidade com a epidemia atualmente em circulação das estirpes de ZIKV pertencentes à linhagem asiática/americana (CORMAN et al., 2016). Além disso, estima-se que de 20-80% dos pacientes infectados pelo ZIKV podem não ser diagnosticados devido às baixas cargas virais nestas amostras clínicas do paciente (CORMAN et al., 2016). Assim, teste sorológico para ZIKV e CHIKV para detectar IgM e IgG específica para ZIKV ou CHIKV foi desenvolvido.

O EIA-ICC, um ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas com vírus como antígeno foi descrito, primeiramente, em 1987, por Figueiredo e Shope para o diagnóstico de Dengue utilizando células C636 infectadas com o vírus da Dengue. Este teste possui algumas vantagens em relação a outras metodologias, pois elimina laboriosos procedimentos para a preparação de antígeno, permite rápida triagem de um grande número de soros (em aproximadamente 5 horas) e ainda, as placas com células infectadas, fixadas com formalina, podem ser estocadas por meses a -20 ou -70°C (FIGUEIREDO; SHOPE, 1987). O uso do EIA-CC já foi descrito como importante ferramenta no diagnóstico rotineiro de Dengue, concluindo ser “um método específico e confiável (...) possuindo, inclusive, as vantagens de ser todo desenvolvido *in house*, além de ser simples e rápido após o preparo das placas”(BARREIRA et al., 2010).

Devido a grande quantidade de casos de ZIKV e CHIKV e suas complicações, metodologias diagnósticas de rápido desenvolvimento são extremamente importantes. No presente trabalho, reconhecendo a praticidade e o potencial do EIA-ICC, decidimos utilizá-lo para diagnóstico de infecções por vírus Zika e por vírus Chikungunya

ZIKV e CHIKV tiveram suas identidades confirmadas por RT-PCR, buscando genoma viral e IFI para busca de antígeno viral. Estes, em conjunto com o ensaio de plaque de lise, confirmaram infectividade destes vírus.

Neste presente trabalho foi realizado o aperfeiçoamento da técnica para o uso no diagnóstico de infecções pelos vírus Zika e Chikungunya. Como mencionado no item 3.8 células C6/36 foram inoculadas com ZIKV, incubadas por 6 dias, suspensas para semear placas de 96 poços. Estas foram fixadas para teste. Primeiramente foi realizada titulação de anticorpos monoclonais. O anticorpo testado mostrou-se reativo ao vírus Zika, apresentando título de 6400. O CHIKV, seguindo mesma metodologia, apresentou título elevado de 102400.

Posteriormente, placas inoculadas com ZIKV foram testadas quanto à reatividade cruzada a anticorpos policlonais murinos de vírus da mesma família, sendo eles SLEV, ROCV, WNV, YFV e DENV1-4. Também foram testados anticorpos policlonais de outras famílias virais, como os vírus OROV, PIRY e CHIKV, que foram utilizados como controles negativos, estes não apresentaram reatividade. Estas placas apresentaram reatividade cruzada com DENV1 (título de 100), SLEV (título de 200), ROCV (título de 800) e WNV (título de 100). ZIKV apresenta 58% - 60% de identidade nucleotídica com DENV, SLEV e WNV (YE et al., 2016) e esta semelhança pode influenciar no diagnóstico, concordando com nossos resultados de reatividade cruzada. Kim e colegas demonstraram ter encontrado reação cruzada com o DENV (16,7% e 5,6% para IgG e IgM, respectivamente) na confecção de um teste sorológico rápido pra ZIKV, usando proteína não estrutural NS1, não encontrou reatividade cruzada com o YFV, assim como no EIA-ICC, porém, em relação ao WNV não foi encontrado reatividade cruzada, discordando dos nossos resultados (KIM et al., 2018). Lee e colegas também encontraram extensa reatividade cruzada entre DENV e ZIKV no teste de soroneutralização (LEE et al., 2018). Quanto a reatividade cruzada do ROCV, já foi demonstrada a relação do mesmo com WNV e SLEV (AMARILLA et al., 2018), sendo assim, a possível reação no teste com o ZIKV não poderia ser descartada. Infecções por ROCV causaram epidemias locais nas áreas costeiras de São Paulo entre 1973 e 1980, porém, posteriormente não houve mais relatos desta infecção (LORENZ et al., 2017). Ao avaliar reação cruzada no EIA-ICC CHIKV foi encontrado positividade, configurando reatividade cruzada com os anticorpos murinos anti-MAYV (título de 1600) e anti-MUCV (título de 800), o homólogo anti-CHIKV por sua vez apresentou título de 102400, sendo assim, é possível confirmar a positividade para o vírus específico se comparar as duas técnicas.

Quando comparado com um teste rápido (*Combo Test Card – Quick Profire*, EUA) utilizando amostras positivas e negativas, o EIA-ICC-ZIKV apresentou alta sensibilidade, alta especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo altamente viáveis, tanto para anticorpos IgM quanto para IgG. O EIA-ICC-CHIKV quando comparado a um ELISA utilizando a proteína E de CHIKV, apresentou baixa especificidade e sensibilidade para a detecção de anticorpos IgM, porém apresentou resultado satisfatório na detecção de anticorpos IgG, com alta sensibilidade e especificidade, o que mostra que o teste, ainda assim, pode ser utilizado em inquérito soro-epidemiológico para CHIKV, já que anticorpos IgM para o vírus costumam ser encontrados por volta dos primeiros 10 dias de doença, onde. Assim, a detecção de anticorpos IgG se mostra de grande importância.

Os resultados obtidos na análise das amostras por EIA-ICC ZIKV encontrou 8,13% IgM, 20,34% IgG e 6,97% de IgG e IgM anti-ZIKV nas 172 amostras testadas. O EIA-ICC CHIKV encontrou 8,13% IgM, 16,86% IgG e 1,74% de IgG e IgM nas 172 amostras testadas. Em 6,3% destas amostras foi detectado anticorpos do ZIKV e CHIKV na mesma amostra. Esses dados apresentados confirmam diversos trabalhos que mostram a co-circulação destas arboviroses no surto que ocorreu no Brasil entre os anos de 2015-2016 (LIMA-CAMARA, 2016; SARDI et al., 2016; MAGALHAES et al., 2017; MEHTA et al., 2018).

Os EIA-ICCs para ZIKV e CHIKV, mostraram-se adequados para a detecção de anticorpos específicos e diagnóstico destas viroses. Tratam-se de testes de simples realização e de rápido desenvolvimento, representando uma relevante ferramenta nesta área.

Essa técnica, sensível e específica, poderá ser empregada no diagnóstico de infecções por esses vírus em todo o país, durante epidemias ou circulação silenciosa. Também, trata-se de um teste de baixo custo, de fácil execução e as placas podem, ainda, ser preparadas e deixadas em freezer -20 ou -70 por até 2 meses, facilitando assim a detecção destes vírus em possíveis surtos, já que este teste tem a capacidade de triar um grande número de amostras. Enfim, esta técnica desenvolvida neste laboratório deverá ser muito útil nestes casos e também poderá ser expandida para outros possíveis surtos de arboviroses em nosso país.

6. CONCLUSÃO

- ✓ O ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas com vírus Zika (EIA-ICC ZIKV), mostrou-se adequado para uso rotineiro no diagnóstico sorológico destas infecções porque em comparação a ensaio comercial e previamente validado, exibiu, na detecção de IgM, 87,5% de sensibilidade e 95,6% de especificidade e na detecção de IgG, 100% de sensibilidade e 83,33% de especificidade.
- ✓ O ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas com vírus Chikungunya (EIA-ICC CHIKV), mostrou-se adequado para uso rotineiro no diagnóstico sorológico destas infecções porque, em comparação a ensaio similar utilizado rotineiramente, mostrou, na detecção de IgG, 92,3% de sensibilidade e 96,96% de especificidade.
- ✓ Entretanto, o ensaio imunoenzimático utilizando células infectadas com vírus Chikungunya (EIA-ICC CHIKV), mostrou-se inadequado para uso rotineiro no diagnóstico sorológico destas infecções porque, em comparação a ensaio similar já utilizado rotineiramente, mostrou, na detecção de IgM, 64,7% de sensibilidade e 40% de especificidade.

7. REFERÊNCIAS

AMARILLA, A. A.; FUMAGALLI, M. J.; FIGUEIREDO, M. L.; LIMA-JUNIOR, D. S.; SANTOS-JUNIOR, N. N.; ALFONSO, H. L.; LIPPI, V.; TRABUCO, A. C.; LAURETTI, F.; MULLER, V. D.; COLÓN, D. F.; LUIZ, J. P. M.; SUHRBIER, A.; SETOH, Y. X.; KHROMYKH, A. A.; FIGUEIREDO, L. T. M.; AQUINO, V. H. Ilheus and Saint Louis encephalitis viruses elicit cross-protection against a lethal Rocio virus challenge in mice. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–12, 2018.

ASSUNCAO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 973516, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/973516>>.

BALEOTTI, F. G.; MORELI, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Brazilian Flavivirus Phylogeny Based on NS5. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 3, p. 379–382, 2003.

BARREIRA, L. A. C.; MACHADO, A. M.; AQUINO, V. H.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. M. Padronização e uso de um método imunoenzimático que utiliza células infectadas como antígeno no diagnóstico rotineiro do dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 268–271, 2010.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim epidemiológico 22. v. 49, n. 85, p. 1–13, 2018.

BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: A re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.

CORMAN, V. M.; RASCHE, A.; BARONTI, C.; ALDABBAGH, S.; CADAR, D.; REUSKEN, C. B.; PAS, S. D.; GOORHUIS, A.; SCHINKEL, J.; MOLENKAMP, R.; KÜMMERER, B. M.; BLEICKER, T.; BRÜNINK, S.; ESCHBACH-BLUDAU, M.; EIS-HÜBINGER, A. M.; KOOPMANS, M. P.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; GROBUSCH, M. P.; DE LAMBALLERIE, X.; DROSTEN, C.; DREXLER, J. F. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 12, p. 880–892, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/bulletin/volumes/94/12/16-175950.pdf>>.

CROSBY, L.; PERREAU, C.; MADEUX, B.; COSSIC, J.; ARMAND, C.; HERRMANN-STORKE, C.; NAJIOULLAH, F.; VALENTINO, R.; THIÉRY, G. Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013-2014 Caribbean outbreak. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, n. 2016, p. 78–80, 2016.

DAS, T.; HOARAU, J. J.; BANDJEE, M. C. J.; MARIANNE, M.; GASQUE, P. Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 2, p. 294–310, 2015.

DE MORAIS BRONZONI, R. V. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb 2005.

DE OLIVEIRA MOTA, M. T.; RIBEIRO, M. R.; VEDOVELLO, D.; NOGUEIRA, M. L. Mayaro virus: A neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015.

DICK, G. W. .; KITCHEN, S. .; HADDOW, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952. Disponível em: <[https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4)>.

DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M.; DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M.; KOOL, J. L.; LANCIOTTI, R. S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A. J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B. J.; FISCHER, M.; HAYES, E. B. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034>>.

ECONOMOPOULOU, A.; DOMINGUEZ, M.; HELYNCK, B.; SISSOKO, D.; WICHMANN, O.; QUENEL, P.; GERMONNEAU, P.; QUATRESOUS, I. Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534–541, 2009.

FIGUEIREDO, L. T. Uso de células de *Aedes albopictus* C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae e Rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 23, n. 1, p. 13–18, 1990.

FIGUEIREDO, L. T. M.; SHOPE, R. E. An enzyme immunoassay for dengue antibody using infected cultured mosquito cells as antigen. **Journal of Virological Methods**, v. 17, n. 3–4, p. 191–198, 1987.

FUMAGALLI, M. J.; DE SOUZA, W. M.; ESPOSITO, D. L. A.; SILVA, A.; ROMEIRO, M. F.; MARTINEZ, E. Z.; DA FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 112, 2018.

GEROLD, G.; BRUENING, J.; WEIGEL, B.; PIETSCHMANN, T. Protein Interactions during the Flavivirus and Hepacivirus Life Cycle. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 4 suppl 1, p. S75–S91, 2017. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.R116.065649>>.

GÖERTZ, G. P.; VOGELS, C. B. F.; GEERTSEMA, C.; KOENRAADT, C. J. M.; PIJLMAN, G. P. Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 2017.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i657, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1136/bmj.i657>>.

KIM, Y. H.; LEE, J.; KIM, Y.-E.; CHONG, C.-K.; PINCHEMEL, Y.; REISDÖRFER, F.; COELHO, J. B.; DIAS, R. F.; BAE, P. K.; GUSMÃO, Z. P. M.; AHN, H.-J.; NAM, H.-W. Development of a Rapid Diagnostic Test Kit to Detect IgG/IgM Antibody against Zika Virus Using Monoclonal Antibodies to the Envelope and Non-structural Protein 1 of the Virus. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 56, n. 1, p. 61–70, 2018. Disponível em: <<http://parasitol.kr/journal/view.php?doi=10.3347/kjp.2018.56.1.61>>.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J.; STANFIELD, S. M.; DUFFY, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LEE, W. T.; WONG, S. J.; KULAS, K. E.; DUPUIS II, A. P.; PAYNE, A. F.; KRAMER, L. D.; DEAN, A. B.; ST GEORGE, K.; WHITE, J. L.; SOMMER, J. N.; LEDIZET, M.; LIMBERGER, R. J. Development of Zika virus serological testing strategies in New York State. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85042599082&doi=10.1128%2FJCM.01591-17&partnerID=40&md5=253ff0cfc04d1c56d2127ea9aa1f08b4>>.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. p. 1–7, 2016.

LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B. S.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; SUESDEK, L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2017.

MAGALHAES, T.; BRAGA, C.; CORDEIRO, M. T.; OLIVEIRA, A. L. S.; CASTANHA, M. S.; MACIEL, A. P. R.; AMANCIO, N. M. L.; GOUVEIA, P. N.; PEIXOTO-DA-SILVA, V. J.; PEIXOTO, T. F. L.; BRITTO, H.; LIMA, P. V.; LIMA, A. R. S.; ROSENBERGER, K. D.; JAENISCH, T.; ERNESTO, T. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. v. 26, p. 1–25, 2017.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957.

MEHTA, R.; SOARES, C. N.; MEDIALDEA-CARRERA, R.; ELLUL, M.; DA SILVA, M. T. T.; ROSALA-HALLAS, A.; JARDIM, M. R.; BURNSIDE, G.; PAMPLONA, L.; BHOJAK, M.; MANOHAR, R.; DA SILVA, G. A. M.; ADRIANO, M. V.; BRASIL, P.; NOGUEIRA, R. M. R.; DOS SANTOS, C. C.; TURTLE, L.; DE SEQUEIRA, P. C.; BROWN, D. W.; GRIFFITHS, M. J.; DE FILIPPIS, A. M. B.; SOLOMON, T. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, 2018.

PAZ-BAILEY, G.; ROSENBERG, E. S.; DOYLE, K.; MUNOZ-JORDAN, J.; SANTIAGO, G. A.; KLEIN, L.; PEREZ-PADILLA, J.; MEDINA, F. A.; WATERMAN, S. H.; GUBERN, C. G.; ALVARADO, L. I.; SHARP, T. M. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Preliminary Report. **New England Journal of Medicine**, p. NEJMoa1613108, 2017. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1613108>>.

PEREIRA-SILVA, J. W.; DO NASCIMENTO, V. A.; BELCHIOR, H. C. M.; ALMEIDA, J. F.; PESSOA, F. A. C.; NAVECA, F. G.; RÍOS-VELÁSQUEZ, C. M. First evidence of zika virus venereal transmission in aedes aegypti mosquitoes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 1, p. 56–61, 2018.

RAMANI, S.; PAUL, A.; SARAVANABAVAN, A.; MENON, V. K.; ARUMUGAM, R.; SOWMYANARAYANAN, T. V.; SAMUEL, P.; KANG, G. Rotavirus Antigenemia in Indian Children with Rotavirus Gastroenteritis and Asymptomatic Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 11, p. 1284–1289, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/657069>>.

ROMEIRO, M. F.; DE SOUZA, W. M.; TOLARDO, A. L.; VIEIRA, L. C.; HENRIQUES, D. A.; DE ARAUJO, J.; SIQUEIRA, C. E. H.; COLOMBO, T. E.; AQUINO, V. H.; DA FONSECA, B. A. L.; DE MORAIS BRONZONI, R. V.; NOGUEIRA, M. L.; DURIGON, E. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. A real-time RT-PCR for rapid detection and quantification of mosquito-borne alphaviruses. **Archives of Virology**, v. 161, n. 11, p. 3171–3177, 2016.

SARDI, S.; SOMASEKAR, S.; NACCACHE, S. N.; BANDEIRA, A. C.; TAURO, L. B.; CAMPOS, G. B.; CHIU, C. Y. Co-Infections from Zika and Chikungunya Virus in Bahia, Brazil Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. v. 54, n. 9, p. pii: JCM.00877-16, 2016.

SBPC/ML. Posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial referente ao diagnóstico laboratorial do Zika vírus. **Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicinal Laboratorial**, p. 4, 2016. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/sbpcml_posicionamento_zika_virus.pdf>.

SCHILTE, C.; COUDERC, T.; CHRETIEN, F.; SOURISSEAU, M.; GANGNEUX, N.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; KRAXNER, A.; TSCHOPP, J.; HIGGS, S.; MICHAULT, A.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; COLONNA, M.; PEDUTO, L.; SCHWARTZ, O.; LECUIT, M.; ALBERT, M. L. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 2, p. 429–442, 2010. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090851>>.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S.; SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies Find the latest version : Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies. v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; OLIVER, M.; LEPARC-GOFFART, I.; MARIMOUTOU, C. Chikungunya virus infection. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 3, p. 218–228, 2011.

TANDALE, B. V.; SATHE, P. S.; ARANKALLE, V. A.; WADIA, R. S.; KULKARNI, R.; SHAH, S. V.; SHAH, S. K.; SHETH, J. K.; SUDEEP, A. B.; TRIPATHY, A. S.; MISHRA, A. C. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 2, p. 145–149, 2009.

VILLAMIL-GÓMEZ, W.; ALBA-SILVERA, L.; MENDO-RAMOS, A.; GONZALEZ-VERGARA, A.; MOLINARES-PALACIOS, T.; BARRIOS-CORRALES, M.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Congenital chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: A case series. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 61, n. 5, p. 386–392, 2015.

WANG, C. Y.; TENG, H. J.; LEE, S. J.; LIN, C.; WU, J. W.; WU, H. S. Efficacy of various larvicides against *Aedes aegypti* immatures in the laboratory. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 66, n. 4, p. 341–344, 2013.

WASHINGTON, D. Relatório sobre a transmissão e o impacto do vírus Chikungunya na região das américas. **Ministério da Saúde**, n. 4, 2015.

YE, Q.; LIU, Z.-Y.; HAN, J.-F.; JIANG, T.; LI, X.-F.; QIN, C.-F. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 43, p. 43–49, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156653>>.

ZANLUCA, C.; DE MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. V.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

Anexo 1 – comitê de ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de Métodos Sorológicos para Diagnóstico de Infecções causadas pelos Vírus Zika e Chikungunya

Pesquisador: Angélica Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 83391617.9.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.641.138

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa, nível mestrado, da graduada em Ciências Biológicas, Angélica Silva, sob a orientação do Professor Doutor Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. Na natureza, vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) são mantidos em um ciclo de transmissão horizontal entre vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados. Tropismos de arbovírus no vetor mosquito têm sido estudados entre *Aedes aegypti* e vírus da dengue (DENV, família Flaviviridae) (SALAZAR et al., 2007). Os arbovírus constituem problema sério de saúde pública no mundo. O DENV tem número estimado de 400 milhões de infecções por ano, com 3,6 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco para a transmissão da epidemia (BHATT et al., 2013). O Vírus da Zika (ZIKV, família Flaviviridae) tem mecanismo de transmissão similar aos vírus da dengue e a febre amarela (KUNO et al., 1998). Assim como outros Flavivirus, o ZIKV possui genoma de RNA de cadeia simples e sentido positivo, contendo 10794 kb e incluindo cadeia aberta de leitura que codifica uma poliproteína e duas regiões flanqueadoras não codificantes (5'-C- prM -E -NS1- NS2a- NS2B NS3- NS4ANS4B-NS5- 3'). Em seguida, a poliproteína é clivada nas proteínas do capsídeo (C), precursor da membrana (prM), envelope (E) e em 7 proteínas não estruturais (NS). A proteína E (<53 kDa) é a principal proteína da superfície viral, tendo a importante função de ligar o vírus à membrana celular, iniciando a infecção desta e também atua como indutora de resposta imune sérica, inclusive com anticorpos neutralizantes do vírus. A proteína NS5 (<103 kDa), a maior proteína viral, é uma polimerase de RNA dependente de RNA (RdRP) e a região N terminal

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

não codificadora tem função RNA-capping (KUNO et al., 1998; KLEMA et al., 2015). ZIKV foi inicialmente isolado em 1947, na Floresta Zika em Uganda, pelo sangue do macaco Rhesus em um estudo sobre febre amarela (DICK et al., 1952). Posteriormente, soube-se que o vírus causava infecção humana, confirmado com base em dados sorológicos obtidos na Uganda em 1969 e 1970, Nigéria em 1971 e 1975, Serra Leoa em 1972, Gabão em 1975, República Centro Africano em 1979, Senegal em 1988-1991 e Cote d'Ivoire em 1999 e novamente, Senegal em 2011 e 2012 (LANCIOTTI et al., 2008). Acredita-se que sua infecção em humanos seja transmitido por meio dos mosquitos *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus* e *Aedes aegypti* (MARCHETTE et al., 1969). O primeiro grande surto ocorreu em 2007 na ilha de Yap e outras ilhas na região da Micronésia. Inicialmente suspeitou-se que o causador do surto seria o vírus da Dengue, porém a partir de exames sorológicos e de biologia celular foi identificado o agente etiológico sendo o vírus ZIKA. Neste surto mais de 8.000 pessoas foram afetadas sendo cerca de 70% da população, todos residentes da ilha de Yap, mostrando assim o papel do ZIKV como uma doença emergente (BALM et al., 2012). Os sinais e sintomas da febre Zika surgem cerca de 7 dias após a picada e duram de três a doze dias, também foram relatados casos assintomáticos. Entre esses sintomas temos artralgia, dores de cabeça, dor retro-orbital, febre baixa edema nas extremidades, mialgia, hiperemia conjuntival e erupções cutâneas maculopapulares (geralmente se espalhando para região abaixo do rosto), entre outros sintomas menos frequentes (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015). Em maio de 2015, após a confirmação dos primeiros casos de febre ZIKA,

inicialmente no nordeste do Brasil (ZANLUCA et al., 2015) Em fevereiro de 2016 o ZIKV foi declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como emergência global de preocupação na saúde pública. Este foi o resumo vindo da diretoria-geral pelo resultado do Comitê de Emergência sobre os casos de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). O Vírus Chikungunya (CHIKV) é do gênero dos Alphavirus pertencente a família Togaviridae, são vírus de fita simples de RNA com polaridade positiva. Seu genoma é organizado em três proteínas estruturais: Capsídeo (C), E2 e E1, sintetizados a partir do RNA subgenômico por um promotor interno, e proteínas não estruturais (J. H. STRAUSS & E. G. STRAUSS, 1994). CHIKV é um arbovirus zoonótico que foi primeiramente isolado em um primata, na África, em 1952 (ROBINSONM, 1955). Sua transmissão para os seres humanos é similar ao DENV via vetores artrópodes *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Após a infecção no tecido subcutâneo o CHIKV é fagocitado pelas células dendríticas que migram para os nódulos linfáticos, fazendo a apresentação dos peptídeos virais para o sistema imune adaptativo. O sistema imune

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

inato auxilia no combate ao vírus principalmente pela produção de interferon do tipo I que limita a replicação viral (SCHILTE et al., 2010). Com base em estudos clínicos de pacientes da Ásia e Oceano Índico, a febre Chikungunya se manifesta de 2 a 4 dias após a picada do mosquito infectado. O período de viremia persiste até o quinto dia após o início dos sintomas. Os principais sintomas são febre (92% dos casos), tipicamente associada a artralgia (87%), dor nas costas (67%) e dor de cabeça (62%). A febre pode atingir a temperatura entre 39 e 40°C e persistir de 24 a 48 horas. Foi relatado a ocorrência de erupção cutânea com menor frequência, acometendo a face, membros e tronco, persistindo em torno de 10 dias. Também foram relatadas manifestações neurológicas (convulsões febris, meningite e encefalite) e manifestações oculares (neuroretinite e uveíte). A febre, artrite e erupção pode reaparecer após um período de remissão aparente. Em alguns casos pode ocorrer artrite debilitante. Choque ou morte são raros em infecções CHIKV. Febre Chikungunya permite um diferencial diagnóstico de dengue. No entanto, para a febre Chikungunya, a convalescença requer um período mais longo de repouso em relação a dengue (SIMON et al., 2011). Segundo o Ministério da Saúde, em 2015, o Brasil registrou 38.332 possíveis casos de febre da Chikungunya, com abrangência em 696 municípios do país. Destes 13.236 foram confirmados em 251 municípios. Com 6 óbitos por febre de chikungunya, nas seguintes Unidades da Federação: Bahia (3 óbitos), Sergipe (1 óbito), São Paulo (1 óbito) e Pernambuco (1 óbito). A mediana de idade dos óbitos foi de 75 anos. No mesmo ano, até a SE 32, foram registrados 20.598 casos prováveis de febre de chikungunya, com uma taxa de incidência de 10,1 casos/100 mil habitantes. Em 2016, até a SE 32, foram registrados 216.102 casos prováveis de febre de chikungunya no país (taxa de incidência de 105,7 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.248 municípios; destes, 102.638 casos foram confirmados. Incidência de casos prováveis (número de casos/100mil hab.), por regiões geográficas, demonstra que a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência: 335,6 casos/100 mil hab. Entre as Unidades da Federação, destacam-se Rio Grande do Norte (649,1 casos/100 mil hab.), Pernambuco (434,7 casos/100 mil hab.), e Alagoas (397,9 casos/100 mil hab.). Até março de 2016 foram notificados 13.676 casos prováveis de febre de chikungunya, destes, 550 foram confirmados. Em 2015, no mesmo período foram registrados 4.890 prováveis, quase três vezes inferior se comparado ao ano de 2016. Apenas os estados do Rio de Janeiro e de Mato Grosso não registraram casos suspeitos neste ano. Foram confirmados 2 óbitos por febre de chikungunya no Brasil, sendo 1 na Bahia e 1 em Pernambuco. Existem 4 óbitos em investigação na Paraíba, Minas Gerais e Alagoas que possuem diagnóstico laboratorial de chikungunya, mas a causa do óbito ainda está em

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

investigação (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Desenvolver metodologias sorológicas para diagnóstico dos vírus Zika e Chikungunya.

Objetivo Secundário: Desenvolvimento de Teste de soroneutralização lido por EIA-ICC para detecção de ZIKV e CHIKV através de anticorpos IgM e IgG; Desenvolver ensaios imunoenzimáticos para pesquisa de anticorpos IgM e IgG contra ZIKV e CHIKV: EIAICC

(enzymme immunoassay using infected cultured cells); Validar resultados positivos através de ensaio de soroneutralização específico para o vírus; Desenvolver teste de soroneutralização lido por EIA-ICC para os vírus Zika e Chikungunya.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No projeto de pesquisa, os autores não avaliam riscos e benefícios da participação na pesquisa. Na Folha de Informações do Projeto diz-se que não haverá riscos pois as amostras de sangue dos pacientes com quadro febril aguda já foram colhidas com o intuito de se realizar diagnóstico clínico. Em relação aos possíveis benefícios, os autores declaram que a pesquisa poderá contribuir para a padronização do Ensaio imunoenzimático e diagnóstico de anticorpos anti-zika e anti-chikungunya a partir do soro de pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A justificativa para a realização do projeto de pesquisa é que as arboviroses constituem sério problema de saúde pública a nível mundial, causam diversas doenças e debilitam seus hospedeiros incapacitando-os para realizar seus trabalhos e mesmo, podendo leva-los à morte. Atualmente, o Brasil passa por problemas graves relacionados aos vírus Zika e Chikungunya. Por isso, faz-se necessário desenvolver técnicas rápidas e específicas para o diagnóstico destas viroses, o que deverá propiciar adequado manejo dos pacientes e também, poderá fornecer subsídios para o controle das epidemias por Zika e Chikungunya. Além disso, o diagnóstico destas viroses permitirá estudos adicionais analisando os padrões de resposta imunológica e suas correlações com evolução clínica dos pacientes e resposta a eventuais tratamentos. Para a realização da pesquisa, os autores pretendem utilizar:

1. Células de mosquito *Aedes albopictus* clone C6/36 serão utilizadas para o preparo das sementes virais. As células serão mantidas em meio de Leibowitz L-15 (GIBCO- New York, USA) contendo 10% de soro fetal (SBF) inativado pelo calor, 10% de caldo de triptose fosfato, 100 U/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina. As colônias de células C6/36 serão cultivadas em

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900	
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

frascos com tampa selada e serão mantidas a 28°C em estufa comum (FIGUEIREDO, 1990).

Amostras Clínicas

As amostras clínicas serão fornecidas pelo Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, obtidas de pacientes com suspeita das doenças provocadas pelo vírus Zika e vírus Chikungunya. Essas amostras serão processadas e estocadas a -70°C no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

As demais etapas para a realização da pesquisa estão adequadamente descritas.

Foi apresentado o cronograma do estudo, bem como foram apresentadas 20 referências bibliográficas pertinentes ao tema.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Trata-se de projeto de pesquisa relevante, plenamente justificado. A Folha de Rosto está devidamente apresentada. Foram apresentados o orçamento do estudo com a informação que será solicitada ajuda financeira da FAPESP para a realização do estudo. Foi apresentada a anuência da instituição para a realização do estudo.

Entretanto, algumas modificações são necessárias para que possam atender as exigências da Resolução 466/12 sobre Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e suas complementares do Conselho Nacional de Saúde, a saber:

- 1) Solicita-se que os autores realizem revisão ortográfica do texto do projeto. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**
- 2) É necessário que incluam no texto do projeto, item relativo à ponderações relativas aos Riscos, Desconfortos e Benefícios da participação no estudo. A frase "o projeto não tem riscos" é inadequada. Os autores podem ponderar que se considera que a participação no estudo envolve riscos mínimos que incluem a quebra do sigilo da identidade. Isso deve ser mencionado e os autores devem garantir que se evitará a quebra do sigilo da identidade desses pacientes. Indaga-se se essas amostras que, inicialmente, foram colhidas com o propósito de tentar esclarecer o diagnóstico de síndrome febril aguda, foram encaminhadas ao laboratório de Virologia desmembradas de identificação dos dados demográficos. **ESSAS INFORMAÇÕES DEVEM CONSTAR TANTO DO PROJETO DE PESQUISA QUANTO DO DOCUMENTO DE JUSTIFICATIVA PARA A SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO. PENDÊNCIA ATENDIDA.**
- 3) Em relação à criação de biorrepositório, o termo está inadequado. Os autores fazem confusão entre Biorrepositório e Biobanco. Sugere-se que os autores consultem a Resolução 441/2011

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

(<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2011/Reso441.pdf>). Biorrepositório constitui coleção de amostras biológicas colhidas e vinculadas a um projeto de pesquisa. Eventualmente as amostras, após o término da pesquisa podem ser transferidas e vinculadas a um outro projeto de pesquisa, desde que devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Por outro lado, Biobanco diz respeito a coleção de amostras biológicas, não necessariamente vinculadas a projeto de pesquisa, cuja autorização, com várias outras exigências deve ser apresentado ao CEP em separado e não associado a um projeto de pesquisa específico. Os autores podem ainda esclarecer dúvidas junto à secretaria do CEP. DIANTE DO EXPOSTO, OS AUTORES PRECISAM DEFINIR E ESCLARECER O QUE PRETENDEM FAZER COM AS AMOSTRAS E APRESENTAR A DOCUMENTAÇÃO ADEQUADA. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Modificado em 15 de março de 2018, assim como a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_973279.pdf	06/04/2018 18:06:24		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	06/04/2018 18:05:38	Angélica Silva	Aceito
Outros	CARTARESPPOSTAPARECER.pdf	06/04/2018 18:03:46	Angélica Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAngelicarevisadomarco.pdf	06/04/2018 18:02:39	Angélica Silva	Aceito
TCLE / Termos de	Solicitacaotclemarco.pdf	06/04/2018	Angélica Silva	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.641.138

Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacaotclemarco.pdf	18:02:09	Angélica Silva	Aceito
--	--------------------------	----------	----------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 08 de Maio de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br