

ROBERT ANDREATA SANTOS

**Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para
infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências com ênfase em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Corrigida

Março/2021

Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes.

Robert Andreatta Santos¹, Luís Carlos de Souza Ferreira²

^{1,2} Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, Brasil.

randreatta@usp.br¹, lcsf@usp.br²

RESUMO

Os vírus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) são arbovírus evidentes no cenário internacional atual que apresentam dificuldade na geração de dados epidemiológicos acurados. Tal fato ocorre devido à grande semelhança dos sintomas clínicos compartilhados pelas doenças, além da elevada reação cruzada observada entre alguns desses vírus quando avaliados em testes de diagnóstico sorológico. A disponibilidade de testes sorológicos sensíveis, específicos e de baixo custo contra esses vírus ainda é limitada no país. Diante disso, o presente projeto teve por objetivo desenvolver plataformas de diagnóstico sorológico uniplex (ELISA) e multiplex (Luminex), baseadas em formas recombinantes de proteínas DENV, ZIKV e CHIKV. Após avaliação *in silico*, porções da proteína não estrutural 1 (NS1) de DENV e ZIKV (denominadas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV1-4), e da proteína 2 do envelope (E2) de CHIKV (denominada E2.1 CHIKV) apresentaram baixa homologia entre si e com as mesmas regiões de vírus próximos a DENV, ZIKV e CHIKV, sendo escolhidas como antígenos de diagnóstico. As proteínas foram implementadas nas plataformas de sorodiagnóstico, as quais foram otimizadas e validadas com a utilização de painéis de soros humanos fornecidos por colaboradores. Todos os testes gerados na plataforma de ELISA apresentaram valores de sensibilidade e especificidade iguais ou superiores aos testes atualmente disponíveis no mercado, com destaque para o teste ELISA ZIKV, o qual proporcionou uma parceria público privada que culminou na aprovação da sua comercialização pela ANVISA. Resultados similares foram observados com a implementação dos antígenos à plataforma Luminex, corroborando o potencial dos antígenos desenvolvidos. O sucesso do desenvolvimento do presente projeto salienta a importância do estudo e do desenvolvimento de metodologias diagnósticas, bem como ilustra de forma clara como a pesquisa acadêmica pode ser feita em sintonia com empresas voltadas para o desenvolvimento de tecnologias na área da saúde.

Palavras-Chave: Epidemiologia, Dengue, Proteínas recombinantes, Diagnóstico Sorológico, Chikungunya, Zika.

Development of uniplex and multiplex diagnostic platforms for arbovirus infection using recombinant proteins

Robert Andreato Santos¹, Luís Carlos de Souza Ferreira²

^{1,2}Laboratory of Vaccine Development, Institute of Biomedical Sciences II,
University of São Paulo, Brazil.
randreato@usp.br¹, lcsf@usp.br²

ABSTRACT

The Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses are arboviruses evident in the current international scenario that present difficulties in the generation of accurate epidemiological data. This fact occurs due to the great similarity among the clinical symptoms shared by the diseases, in addition to the high cross reaction observed among some of these viruses when evaluated by serological diagnostic tests. The availability of sensitive, specific and low-cost serological tests against these viruses is still limited in Brazil. Therefore, this project aimed to develop uniplex (ELISA) and multiplex (Luminex) serological diagnosis platforms, based on recombinant forms of DENV, ZIKV and CHIKV proteins. After *in silico* evaluation, portions of the non-structural protein 1 (NS1) of DENV and ZIKV (called Δ NS1 ZIKV and Δ NS1 DENV1-4), and of the envelope protein 2 (E2) of CHIKV (called E2.1 CHIKV) presented low homology among themselves and with the same regions of viruses close to DENV, ZIKV and CHIKV, being chosen as diagnostic antigens. The proteins were implemented on the serodiagnosis platforms, which were optimized and validated using human serum panels provided by collaborators. All tests generated on the ELISA platform showed sensitivity and specificity values equal to or higher than the tests currently available on the market, with emphasis on the ELISA ZIKV test, which provided a public-private partnership that culminated in the approval of its commercialization by ANVISA. Similar results were observed with the implementation of the antigens to the Luminex platform, corroborating the potential of the developed antigens. The success of the development of this project highlights the importance of studying and developing diagnostic methodologies, as well as illustrate clearly how academic research can be done in tune with companies focused on the development of technologies in the health area.

Keywords: Epidemiology, Dengue, Recombinant proteins, Serological diagnosis, Chikungunya, Zika.

1. INTRODUÇÃO

A presença de doenças virais acometendo humanos é datada desde a antiguidade, porém o termo arbovírus (do inglês *arthropod born vírus*) somente passou a ser empregado em 1881, quando o Dr. Carlos Finlay propôs a transmissão do vírus da Febre Amarela (YFV) por mosquitos (CHAVES-CARBALLO, 2005). Dentre esses vetores destacam-se os mosquitos do gênero *Aedes*, responsáveis pela transmissão de três das arboviroses de maior importância epidemiológica no cenário nacional e mundial da atualidade, causadas pelos vírus: Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). Pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, os DENV e ZIKV apresentam parentesco com outros vírus emergentes como o YFV, o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus do Nilo Ocidental (VNO) (LINDENBACH; RICE, 2007; TOGNARELLI et al., 2016). Esses vírus são caracterizados por possuir genoma constituído de um RNA de fita simples, com orientação positiva que codifica 3 proteínas estruturais (C, prM e E), que constituirão a partícula viral formada, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), que estão envolvidas na replicação viral e evasão do sistema imunológico dos hospedeiros (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; FAYE et al., 2014).

O CHIKV, por sua vez, pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, possuindo parentesco com outros arbovírus de importância nacional, como o vírus Mayaro (MAYV) (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). O CHIKV é caracterizado por possuir genoma também de simples e com orientação positiva, sendo seu tamanho de 11,8 kb (KHAN et al., 2002). Esse vírus apresenta eficiência de replicação extremamente elevada em *Aedes albopictus* quando comparado com outros vetores do mesmo gênero (TSETSARKIN et al., 2007). Seu genoma codifica 3 proteínas estruturais principais (C, E1 e E2), que constituirão a partícula viral, e quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que estão envolvidas na replicação viral no hospedeiro (WEAVER; LECUIT, 2015).

Além de transmitidos por vetores *Aedes*, DENV, ZIKV e CHIKV também possuem origens semelhantes a partir de primatas não humanos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; TSETSARKIN; CHEN, 2011; VASILAKIS et al., 2011). O DENV atualmente consiste em umas das arboviroses de maior relevância econômica e epidemiológica, atingindo um número estimado de 390 milhões de infecções por ano, sendo que destas aproximadamente 96 milhões apresentam algum grau de

severidade que levam para cerca de 30 mil mortes anuais (BHATT et al., 2013; STAHL et al., 2013; CONSTENLA; GARCIA; LEFCOURT, 2015).

O ZIKV teve sua primeira infecção em humanos registrada na década de 60 em Uganda (MOORE et al., 1975; HAMEL et al., 2015). Em 2007 foi documentado o primeiro surto de infecções associadas ao ZIKV na ilha de Yap na Micronésia, com cerca de 73% da população infectada (DUFFY et al., 2009; IOOS et al., 2014). Na América o primeiro surto registrado ainda está em curso no Brasil, sendo estimado pelo Ministério da Saúde a ocorrência de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos somente no período de maio a dezembro de 2015 (IOOS et al., 2014; HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Em escala global, 75 países reportaram transmissão do ZIKV por mosquitos desde 2007 e atualmente o Brasil já possui mais de 2.000 casos confirmados de Síndrome Congênita de ZIKV (SCZ) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A emergência do CHIKV tem registros iniciais no continente africano, com primeiro caso reportado em 1879, seguido de vários surtos e epidemias isoladas e posterior disseminação para ilhas do Oceano Índico e Ásia (WEAVER; LECUIT, 2015). Em 2016, o CHIKV se disseminou para as Américas, tendo sido reportado em 51 países americanos, e causou cerca de 135 mortes, decorrentes de 121 mil infecções confirmadas, sendo dessas 120 mortes apenas no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O risco de surgimento de novos surtos ou manutenção de endemias em regiões que contenham o mosquito transmissor demanda o controle epidemiológico das regiões afetadas, de forma a estabelecer planos de combate à infecção pelo CHIKV e outras arboviroses.

Os efeitos deletérios causados por DENV, CHIKV e ZIKV em quadros mais acentuados são bastante característicos. A dengue em sua forma mais grave apresenta um quadro marcante de hemorragia, com uma redução acentuada no nível de plaquetas e em alguns casos também de leucócitos (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009), enquanto a CHIKV apresenta casos semelhantes à artrite que podem perdurar durante meses devido à permanência dos vírus nas articulações (LUM; NG, 2015). A infecção pelo ZIKV é autolimitada em adultos, com raras exceções (encefalite aguda), mas foi identificado como potencial causador de microcefalia em bebês de mães que contraíram o vírus durante a gravidez (BRASIL et al., 2016; DRIGGERS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Contudo, a grande maioria dos quadros clínicos iniciais são semelhantes, com sintomas variáveis e sem

especificidade clínica clara, o que torna a diferenciação dessas doenças dependente da evolução clínica do paciente e de exames laboratoriais. No entanto, dados epidemiológicos, prospectivos e retrospectivos, são incompletos pela falta de testes de diagnóstico sorológico específicos para essas arboviroses em postos de saúde.

A existência de elevada reação cruzada foi relatada para arboviroses quando avaliadas em testes de diagnósticos sorológicos (ALLWINN et al., 2002; MANSFIELD et al., 2011). Tais reações ocorrem devido à grande semelhança antigênica presente nos arbovírus, principalmente entre os *Flavivirus*, e que se tornam frequentes durante as fases de infecções agudas. Durante esse período ocorrem expansões clonais de linfócitos B produtores de anticorpos que, por muitas vezes, apresentam reatividade cruzada frente a outros arbovírus e patógenos não virais (PAPA; KARABAXOGLU; KANSOUZIDOU, 2011; PRIYAMVADA et al., 2016).

A alternativa utilizada à sorologia consiste na utilização de técnicas de diagnóstico molecular, as quais são capazes de detectar o material genético viral no sangue de pessoas infectadas até 14 dias após a infecção (CDC, 2016). A detecção do ZIKV já foi comprovada em primatas não humanos no Brasil (FAVORETTO et al., 2016), porém, como já observado para DENV e o próprio ZIKV, o quadro virêmico dessas espécies, assim como em humanos, é transiente (HANLEY et al., 2014; OSUNA et al., 2016). Portanto, a sorologia se faz necessária tanto em casos em que há necessidade de se conhecer o estado imunológico prévio dos pacientes, assim como para o monitoramento de contato de primatas não humanos de zonas urbanas ou não urbanas com arbovírus. Tais fatos limitam a utilização dos testes moleculares como única ferramenta de diagnóstico durante períodos de epidêmicos ou mesmo em regiões endêmicas para DENV, ZIKV e CHIKV.

Frequentemente, pela reduzida disponibilidade de testes sorológicos específicos, utilizam-se testes de neutralização de placas virais (PRNT) em associação com diagnósticos moleculares específicos. O PRNT, apesar de ser considerado como padrão ouro para a soroconversão, consiste em uma técnica de elevado custo, trabalhosa, que necessita uma semana para gerar resultados e também sofre com a reatividade cruzada de anticorpos, particularmente, em amostras de pacientes oriundos de regiões endêmicas (HALSTEAD; ROJANASUPHOT; SANGKAWIBHA, 1983; MANSFIELD et al., 2011). De fato, mesmo resultados baseados em PRNT demandam avaliação crítica de possíveis casos falso-positivos e/ou falso-negativos. Além disso, já foi relatado que infecções prévias por outros

Flavivirus aumentam a reatividade cruzada de anticorpos IgM (LANCIOTTI et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico específicos para arboviroses se mostra de extrema importância. Para isto, a geração de antígenos adequados para tal aplicação representa uma etapa limitante, devendo-se evitar regiões conservadas entre diferentes vírus.

A utilização de proteínas recombinantes no desenvolvimento de testes sorológicos é uma prática difundida (CUZZUBBO et al., 2001; BALAMURUGAN et al., 2010). De fato, a proteína NS1 de DENV é base para a confecção de testes laboratoriais, como os testes imunocromatográficos de captura de antígeno ou de anticorpos (CUZZUBBO et al., 2001). Os testes imunocromatográficos são amplamente distribuídos, sendo utilizados como ferramentas de diagnóstico conclusivo em regiões endêmicas. Contudo, com o recente espalhamento de novos *Flavivirus*, como o ZIKV, a utilização da sequência completa dessa proteína se tornou motivo de questionamento na comunidade científica, já que sua conservação entre *Flavivirus* pode gerar resultados potencialmente errôneos (MULLER; YOUNG, 2013; GYURECH et al., 2016; MATHEUS et al., 2016). Dessa forma, se faz necessária a reformulação dos antígenos base para o diagnóstico sorológico de tais doenças, seja pela fragmentação dos antígenos não estruturais atualmente utilizados, seja pela utilização de outras proteínas virais que confirmam maior especificidade às respostas sorológicas detectáveis em indivíduos infectados.

As glicoproteínas do envelope viral também apresentam certo nível de conservação entre *Flavivirus*, visto que o processo de invasão celular nesses vírus é semelhante. Contudo, regiões responsáveis pela ligação viral às células susceptíveis apresentam grande variação, mesmo entre vírus semelhantes e do mesmo gênero (PRIYAMVADA et al., 2016). As diferenças observadas nos receptores reconhecidos por cada vírus refletem os diferentes reservatórios e sítios de replicação entre eles. Um exemplo interessante é representado pela permanência do ZIKV (NICASTRI et al., 2016), mas não do DENV em sêmen humano. Tais subdomínios de receptores virais foram caracterizados para DENV (DENV EDIII), ZIKV (ZIKV EDIII) e CHIKV (CHIKV E2) e possuem baixa similaridade entre si, o que os torna potenciais candidatos a antígenos discriminatórios para testes sorológicos entre as infecções causadas pelos três vírus.

Contudo, mesmo com a obtenção de bons antígenos discriminatórios para infecções causadas por esses três vírus, deve-se levar em conta a disponibilidade e

acessibilidade aos testes desenvolvidos quando se pensa na aplicação em estudos epidemiológicos, particularmente quando delineados para uso em condições de campo. Testes com um alto valor tecnológico agregado ficam concentrados nos grandes centros e não surtem o efeito desejado quando se busca utilizá-los em países de dimensões continentais, como o Brasil, onde regiões inteiras com menor poder aquisitivo podem ser prejudicadas pela falta de disponibilidade de testes diagnósticos de alta qualidade. Necessita-se, portanto, de testes precisos padronizados com metodologias simples e acessíveis, mas não menos robustas.

Diante dessa situação, destaca-se o ensaio imunoenzimático, popularmente conhecido como ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). A plataforma de ELISA foi inicialmente descrita em 1971 pelos pesquisadores Eva Engvall and Peter Perlman (ENGVALL; PERLMANN, 1971), tendo se popularizado devido à sua simplicidade, praticidade, robustez e baixo custo. A técnica consiste na detecção de anticorpos ou antígenos de forma direta ou indireta por meio da utilização de anticorpos conjugados a enzimas que, após terem suplementação com seus respectivos substratos, emitem sinais detectados por leitores de densidade ótica (DO). Desde a década de 80, testes de ELISA têm sido desenvolvidos (ZHANG et al., 2015) para detecção de anticorpos ou antígenos do DENV e, mais recentemente, também para ZIKV ou CHIKV (MARRERO-SANTOS et al., 2013; MENDOZA et al., 2019). Além disso, a plataforma de ELISA é padronizada em todos os laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública do Brasil, sendo utilizada no diagnóstico de leptospirose, sífilis, HIV, YFV e mesmo DENV. Assim, pode-se considerar a plataforma de ELISA como uma das técnicas laboratoriais com maior potencial de aplicação para políticas públicas em território nacional.

Por outro lado, com o intuito de melhorar a confiabilidade ou mesmo a praticidade da realização de testes diagnósticos, não se pode deixar de lado a contínua evolução de técnicas e metodologias, dada a possibilidade de se tornarem obsoletas. Um exemplo característico pode ser dado pelo desenvolvimento do PCR em tempo real quantitativo que, após ser desenvolvido, permitiu a detecção individual confiável de variados patógenos em uma mesma reação, o que tornou os métodos baseados em PCR convencional obsoletos. No campo da sorologia uma situação semelhante poderá ocorrer em função do contínuo desenvolvimento de novas tecnologias de detecção multiplex, as quais permitem que o diagnóstico de diferentes doenças possa ser feito em uma mesma reação. Apesar de mais custosas, tais

técnicas podem apresentar vantagens econômicas quando aplicadas de modo simultâneo a diversos patógenos, demandando menores quantidades de material para teste, com economia de tempo, amostras e dinheiro.

Diante do exposto, o presente projeto tem por objetivo contribuir para a geração de novas metodologias de diagnóstico sorológico específicas e de baixo custo, por meio da adaptação das plataformas de ELISA e Luminex às proteínas estruturais e não estruturais de DENV, ZIKV, e CHIKV, de forma a proporcionar um melhor monitoramento epidemiológico desses vírus no país.

2. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente tese de doutorado demonstraram que foi possível obter os antígenos derivados das proteínas NS1 de DENV e ZIKV, bem como os fragmentos Δ NS1 ZIKV, Δ NS1 DENV1-4 e E2.1 CHIKV, previstos no projeto inicial. A antigenicidade, funcionalidade e imunogenicidade dos fragmentos Δ NS1 e E2.1 foram preservadas e mostraram-se compatíveis com a aplicação em ensaios sorológicos para DENV, ZIKV e CHIKV.

Os testes de ELISA ZIKV, DENV e CHIKV, quando avaliados com painéis de soro de pacientes oriundos de regiões endêmicas e comparadas com o atual teste padrão ouro para a detecção de anticorpos contra *Flavivirus* (PRNT), mostraram valores de sensibilidade e especificidade semelhantes ou superiores aos resultados obtidos com os testes atualmente disponíveis comercialmente. Como consequência, o teste ELISA ZIKV teve sua comercialização aprovada pela ANVISA e encontra-se disponível no mercado.

De modo semelhante, os antígenos produzidos se mostraram compatíveis com a plataforma Luminex. As condições ótimas de sensibilização das *beads* utilizadas pela tecnologia foram estabelecidas e as misturas de *beads* foram avaliadas frente a painéis de soros oriundos de regiões endêmicas ou não, sendo identificados desafios a serem superados para a completa padronização de um kit multiplex.

A implementação da tecnologia Luminex no LDV também pôde ser considerada um sucesso. A produção de resultados de forma independente e confiável dentro da Universidade de São Paulo significa a aquisição de mais uma metodologia a ser utilizada em projetos científicos futuros.

Diante do apresentado, permite-se afirmar que o potencial identificado nas proteínas Δ NS1 e E2.1 produzidas durante o projeto é grande, permitindo a geração de métodos sorológicos discriminatórios e, conseqüentemente, parcerias entre a academia e empresas, permitindo a disseminação do conhecimento gerado em forma de produtos que terão impacto na sociedade.

3. REFERÊNCIAS

- ALLWINN, R. et al. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 4, p. 199–202, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005333>>.
- AMORIM, J. H. et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 2, p. 186–192, ago. 2010.
- ANDREATA-SANTOS, R. et al. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 276–278, jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220302289>>.
- ARRAGAIN, L. et al. Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, p. piw058, 19 out. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jpids/article-lookup/doi/10.1093/jpids/piw058>>.
- AUBRY, M. et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 669–672, abr. 2017. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/4/16-1549_article.htm>.
- BALAMURUGAN, V. et al. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 731–753, 9 set. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erm.10.61>>.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, 4 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt1029>>.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. **The New England journal of medicine**, p. [Epub ahead of print], 2016.
- BRITO-CARVALHO, A. A. V. **DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA UTILIZANDO A PROTEÍNA**

ESTRUTURAL 2 (E2). 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29396410>>.

CALVET, G. A. et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 49, 22 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-2965-4>>.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616005626>>.

CDC. Guidance for U.S. Laboratories Testing for Zika Virus Infection. <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>, v. November, p. 1–12, 2016.

CHAVES-CARBALLO, E. Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. **Military Medicine**, v. 170, n. September 2004, p. 881–885, 2005.

CHO, B. et al. Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 5, p. 828, 2008. Disponível em: <<https://eymj.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2008.49.5.828>>.

CONSTENLA, D.; GARCIA, C.; LEFCOURT, N. Assessing the Economics of Dengue: Results from a Systematic Review of the Literature and Expert Survey. **PharmacoEconomics**, 6 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048354>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

CUZZUBBO, A. J. et al. Use of Recombinant Envelope Proteins for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection in an Immunochromatographic Assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1150–1155, 1 nov. 2001. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.8.6.1150-1155.2001>>.

DE FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the americas: Chikungunya and mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-

- dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 23 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.3515>>.
- DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837–45, set. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3203132>>.
- 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: <[http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4)>.
- DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1601824>>.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, jun. 2009.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, set. 1971. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001927917190454X>>.
- ESTOFOLETE, C. F. et al. Unusual clinical manifestations of dengue disease – Real or imagined? **Acta Tropica**, v. 199, p. 105134, nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X19305911>>.
- FAVORETTO, S. et al. **First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/049395>>.
- FAWCETT, P. T.; O'BRIEN, A. E.; DOUGHTY, R. A. An adsorption procedure to increase the specificity of enzyme-linked immunosorbent assays for lyme disease without decreasing sensitivity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 32, n. 8, p. 1041–1044, ago. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anr.1780320814>>.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.
- FELIX, A. C. et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 8, p.

- 1477–1479, ago. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24789>>.
- FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>>.
- GLUSHAKOVA, L. G. et al. Multiplexed kit based on Luminex technology and achievements in synthetic biology discriminates Zika, chikungunya, and dengue viruses in mosquitoes. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 418, 14 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3998-z>>.
- GYURECH, D. et al. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. **Swiss Medical Weekly**, 9 fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.emh.ch/smw.2016.14296>>.
- HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 1, p. 154–6, jan. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/824120>>.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. JVI.00354-15-, 2015.
- HANLEY, K. A. et al. Infection Dynamics of Sylvatic Dengue Virus in a Natural Primate Host, the African Green Monkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 672–676, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0492>>.
- HASTE ANDERSEN, P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2558–2567, nov. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.062405906>>.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 3, p. 55–8, 2016.
- HU, D. et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 47, 2011. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-47>>.
- HUZLY, D. et al. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 16, p. 30203, 21 abr. 2016. Disponível em:

<<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21450>>.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–7, jul. 2014.

JULKUNEN, I. et al. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. **Clinical and experimental immunology**, v. 60, n. 1, p. 130–8, abr. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988830>>.

KAM, Y.-W. et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28838147>>.

KANNO, A. I. et al. Optimization and scale-up production of Zika virus Δ NS1 in *Escherichia coli*: application of Response Surface Methodology. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1, 31 dez. 2020. Disponível em: <<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-019-0926-y>>.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.

KHAN, N.; BHATTI, J. M. A Case Report on Dengue Encephalitis With Optic Neuropathy. **Cureus**, 6 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.cureus.com/articles/32960-a-case-report-on-dengue-encephalitis-with-optic-neuropathy>>.

KRIEGER, E.; VRIEND, G. YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. **Bioinformatics**, v. 30, n. 20, p. 2981–2982, 15 out. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu426>>.

LANCIOTTI, R. S. et al. 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.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, p. 1101–1151, 2007.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>>.

- MAGNARELLI, L. A. et al. ANTIBODIES TO BORRELIA BURGDORFERI IN DEER AND RACCOONS. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 27, n. 4, p. 562–568, out. 1991. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-27.4.562>>.
- MANSFIELD, K. L. et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, p. 2821–2829, 1 dez. 2011. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.031641-0>>.
- MARRERO-SANTOS, K. M. et al. Optimization of the Cutoff Value for a Commercial Anti-Dengue Virus IgG Immunoassay. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 3, p. 358–362, mar. 2013. Disponível em: <<https://cvi.asm.org/content/20/3/358>>.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.
- MATHEUS, S. et al. Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1691–1693, set. 2016. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/16-0725_article.htm>.
- MENDOZA, E. J. et al. Combining anti-IgM and IgG immunoassays for comprehensive chikungunya virus diagnostic testing. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 8, p. 909–917, 26 dez. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12641>>.
- MOORE, D. L. et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 69, n. 1, p. 49–64, mar. 1975.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354213000624>>.
- MURPHY, S. L. et al. Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 1, p. 65–74, jan. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21360>>.
- NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, 24 maio 2019. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/57/6/e00350-19>>.
- NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016.

- Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, p. 30314, 11 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22554>>.
- NOURELDIN, M. S.; EL-SHINNAWY, H.; ABOU ELENIN, A. Serum pretreatment with *Schistosoma mansoni* antigens for serological diagnosis of fascioliasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 157–68, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786027>>.
- OLIVEIRA, D. et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 615, 7 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/11/615>>.
- OLIVEIRA, D. B. L. et al. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 12, p. 1202–4, 22 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27653589>>.
- OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, 3 out. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.4206>>.
- PAPA, A.; KARABAXOGLU, D.; KANSOUZIDOU, A. Acute West Nile virus neuroinvasive infections: Cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1861–1865, out. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.22180>>.
- PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 23 set. 1986. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00367a013>>.
- PAUL, L. M. et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, 16 dez. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/cti.2016.72>>.
- PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S30–S37, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2459>>.
- PRAT, C. M. et al. Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2129–2132, dez. 2014. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/12/14->

1269_article.htm>.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. 7852–7857, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1607931113>>.

RAULINO, R. et al. Multiplex detection of antibodies to Chikungunya, O'nyong-nyong, Zika, Dengue, West Nile and Usutu viruses in diverse non-human primate species from Cameroon and the Democratic Republic of Congo. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0009028, 21 jan. 2021. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0009028>>.

REGLA-NAVA, J. A. et al. Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007080, 11 fev. 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007080>>.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. e935, 4 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000935>>.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607–610, 8 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aav6618>>.

RODRIGUEZ-MANZANO, J. et al. Improving Dengue Diagnostics and Management Through Innovative Technology. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 8, p. 25, 7 ago. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11908-018-0633-x>>.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 29 nov. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-007-9603-6>>.

SAMBROOK, J.; W RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, p. 999, 2001.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–29, jan. 2016. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000100020&lng=en&tlng=en>.

SONG, H. et al. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 5, p. 1–4, 2016.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/pj.2016.37%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088990>>.

STAHL, H.-C. et al. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 1048, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195519>>.

TASSARA, M. P. et al. Neurological manifestations of dengue in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 379–382, jun. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000300379&lng=en&tlng=en>.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

TOPTYGINA, A. P.; PUKHALSKY, A. L.; ALIOSHKIN, V. A. Immunoglobulin G Subclass Profile of Antimeasles Response in Vaccinated Children and in Adults with Measles History. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 7, p. 845–847, 1 jul. 2005. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.12.7.845-847.2005>>.

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

TSETSARKIN, K.; CHEN, R. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current opinion in ...**, v. 1, n. 4, p. 310–317, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625711000551>>.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 13 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2595>>.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Situation Report - Zika Virus, Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome 10 November 2016** Delta. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas , by country or territory 2016 (to week noted) Cumulative cases Epidemiological Week / EW 45 (Updated 11 November 2016)Pan American Health Organization.** [s.l: s.n.].

ZHANG, B. et al. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1745–1761, out. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415001240>>.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820–823, 19 ago. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600820&lng=en&tlng=en>.