

Câmpus
Anápolis de Ciências
Exatas e Tecnológicas
Henrique Santillo



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE

CHRISTIANE OLIVEIRA LIMA LICÍNIO

**RELEVÂNCIA DA VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
USADO PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ZIKA VÍRUS**

ANÁPOLIS-GO

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE

CHRISTIANE OLIVEIRA LIMA LICÍNIO

**RELEVÂNCIA DA VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO SOROLÓGICO
USADO PARA DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE ZIKA VÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

ANÁPOLIS-GO

2020

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

OL711 Oliveira Lima Licínio, Christiane
r Relevância da Validação de um Ensaio Sorológico Usado
para Diagnóstico Diferencial de Zika Vírus / Christiane
Oliveira Lima Licínio; orientador Flávio Monteiro
Ayres. -- ANÁPOLIS, 2020.
176 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2020.

1. Zika vírus. 2. Síndrome de Guillain-Barrè. 3.
Diagnóstico in vitro. 4. Sensibilidade. 5.
Especificidade. I. Monteiro Ayres, Flávio , orient. II.
Título.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019** sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor (a)

Nome Completo: Christiane Oliveira Lima Licínio

E-mail: chrislima28@hotmail.com

Dados do trabalho

Título: Relevância da Validação de um Ensaio Sorológico Usado para Diagnóstico Diferencial de Zika Vírus.

Tipo

() Tese (X) Dissertação

Curso/Programa: Programa de Pós Graduação *strictu sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde

Concorda com a liberação documento [X] SIM [] NÃO¹

Anápolis, 01/06/2022

Local Data

CHRISTIANE OLIVEIRA
LIMA
LICINIO:89524187191

Assinado de forma digital por
CHRISTIANE OLIVEIRA LIMA
LICINIO:89524187191
Dados: 2022.06.01 12:48:17 -03'00'

Christiane Oliveira Lima Licínio - Autora

Flávio Monteiro Ayres - Orientador

¹ Casos de impedimento:

- Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.



SERVIÇO PÚBLICO ESTADUAL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS A
PRODUTOS PARA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 038

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO- No dia vinte e oito do mês de fevereiro do ano de 2020, às 9:00h, reuniram-se os componentes da banca Examinadora: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres - Orientador, Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro e Profa. Dra. Andréia Juliana Rodrigues Caldeira, sob a presidência da primeiro, e em sessão realizada na Sala 4 dos mestrados no Bloco IV do Câmpus Central – Sede-Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás, procederam à avaliação da defesa de dissertação de Mestrado intitulada: **“Relevância da validação de um ensaio sorológico usado para diagnóstico diferencial de Zika vírus”** de autoria de **Christiane Oliveira Lima Licínio**, discente do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (PPGCAPS) da Universidade Estadual de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação **Christiane Oliveira Lima Licínio** que, em 37 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. A dissertação foi APROVADA por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE, na área de concentração “Pesquisa e Obtenção de Produtos para Saúde”, na linha de pesquisa- “Desenvolvimento de Produtos para a Saúde” pela Universidade Estadual de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGCAPS, da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 10 minutos a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de Mestrado e para constar eu, Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres, presidente da banca lavrei presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres
Presidente da Banca

Prof. Dr. Valdirene Neves Monteiro
UEG/CAPS

Profa. Dra. Andréia Juliana Rodrigues Caldeira
UEG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pela vida, pelos ensinamentos, pelo meu passado. Dedico ao meu amigo e companhia da vida, Daniel, pelo incentivo, por me aceitar como eu sou, pelo meu presente. Finalmente dedico ao meu futuro, às minhas filhas; que o meu esforço sirva de espelho a vocês na trilha de um caminho de felicidade e realização profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por sempre me incentivarem a querer mais, a não me conformar com a primeira resposta, nem com a explicação mais fácil. Agradeço ao meu pai, Benedito, por me ensinar a ser proativa dinâmica e sempre ir à busca de novos desafios. Agradeço à minha mãe, Celeadir, que me ensinou a não desistir, a ser positiva e a confiar em mim mesma. Agradeço à minha irmã Gabrielle, que sempre me incentivou a ser o meu melhor e a conquistar meus objetivos.

Agradeço ao meu marido, Daniel, pela paciência, pelo companheirismo, pelo compromisso em seguirmos na mesma direção e pelo propósito de formarmos uma família. Agradeço profundamente por estar ao meu lado, me dando suporte para alçar os vãos mais altos que eu podia alcançar e por incentivar a sempre ir mais longe.

Agradeço as minhas filhas, que hoje ainda não entendem o esforço e a dedicação da mamãe, mas no futuro eu explicarei que elas foram o maior incentivo na realização deste trabalho. Vocês são luz na minha vida e me dão força com um simples sorriso, para não desistir nunca. Que eu possa retribuir toda a felicidade que vocês me proporcionam.

Agradeço ao Prof. Dr. Flávio Ayres, que me recebeu de braços abertos, como uma ilustre desconhecida e mesmo assim confiou num projeto, que podia simplesmente não dar certo. Sua confiança e positividade foram essenciais à realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de CAPS, que realizaram trabalhos maravilhosos e se tornaram mestres de forma honrosa e magnífica. O período em que estivemos juntos trouxe muita alegria e ensinamentos.

Agradeço aos professores e demais colaboradores da UEG, que não mediram esforços em nos ajudar e proporcionar um ambiente de crescimento científico.

Agradeço ao Dr. José Eduardo Levi e à Dr^a. Alvina Clara Félix, do IMTUSP, por me auxiliarem com as amostras para a realização dos ensaios. Sem a ajuda de vocês, este trabalho estaria incompleto. Gratidão eterna pela generosidade e colaboração tão preciosas.

Agradeço a Deus, por me proporcionar a oportunidade de encontrar todas as pessoas que citei acima, me tornando um ser humano melhor, me fazendo crescer e aprender com o convívio e com as diferenças. Obrigada Pai de Infinita Bondade por me abençoar sempre e por iluminar o meu caminho!

*“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta,
aperfeiçoamento sem sacrifício, assim como não existe
tranquilidade sem paciência.”*

Chico Xavier

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo Geral	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Delineamento do Estudo.....	24
3.2. Amostras Biológicas.....	24
3.3. Local	26
3.4. Materiais e Instrumentos	26
3.5. Procedimentos para a Pesquisa.....	27
3.6. Princípios do <i>kit</i> de ELISA	27
3.7. Preparo dos Reagentes.....	29
3.7.1. Microplaca.....	30
3.7.2. Controles.....	31
3.7.3. Tampão de lavagem concentrado	31
3.7.4. Conjugado enzimático	32
3.7.5. Diluente de amostra	32
3.7.6. Cromógeno/Substrato	32
3.7.7. Solução de parada	32
3.8. Realização dos Ensaios.....	32
3.8.1. Análises de Dados	34
3.9. Controle de Qualidade Interno	35
3.10. Interpretação dos Resultados	36
4. RESULTADOS	38

CAPÍTULO 1 – Aspectos Relevantes sobre o Diagnóstico do Zika Vírus	40
CAPÍTULO 2 – Antibody-dependent Enhancemet (ADE) de Zika vírus Causado por Infecção Prévía de Dengue	56
CAPÍTULO 3 – O Uso do PCR em Tempo Real no Diagnóstico das Arboviroses	76
CAPÍTULO 4 – Validação de Ensaio Imunoenzimático Estruturado para a Detecção de Anticorpos IgG de Zika vírus	97
CAPÍTULO 5 – Relato de Caso de Síndrome de Guillain-Barrè	122
5. CONCLUSÃO	132
6. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	134
7. REFERÊNCIAS	135
8. ANEXOS	149
8.1. ANEXO I – Parecer Consubstanciado do CEP	150
8.2. ANEXO II – Normas para publicação da Enciclopédia Biosfera	154
8.3. ANEXO III – Normas para publicação do Jornal Bras. Patol. Clínica e Med. Lab.	158
8.4. ANEXO IV – Normas para publicação da Revista Soc. Bras. de Med. Tropical	166
9. APÊNDICES	174
9.1. APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	175
9.2. APÊNDICE I – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.....	179
9.3. APÊNDICE I – Questionário de Informações do Paciente	183

LISTA DE TABELAS

- **Introdução e Materiais e Métodos**

Tabela 1 - Nível de significância versus tamanho amostral25

Tabela 2 - Componentes do *Kit* ELISA IgG para Zika vírus28

Tabela 3 - Valores mínimos de DO para cada parâmetro, a fim de validar o ensaio.35

- **Capítulo 4 – Validação de Ensaio Imunoenzimático Estruturado para a Detecção de Anticorpos IgG de Zika vírus**

Tabela 1 - Relação entre Absorbância da Amostra (S) e o cut-off do teste (Co) 101

Tabela 2 - Distribuição do sexo das amostras coletadas 102

Tabela 3 - Distribuição de idade dos participantes do estudo 103

Tabela 4 - Estatísticas Descritivas das replicatas do Controle Negativo..... 103

Tabela 5 - Cálculo de cut-off a partir das absorbâncias do Controle Negativo..... 104

Tabela 6 - Teste de Kolmogorov-Smirnov para replicatas do Controle Negativo 104

Tabela 7 - Diluição seriada da amostra positiva..... 106

Tabela 8 - Correlações entre a amostra positiva diluída e os valores esperados desta diluição 106

Tabela 9 - Teste do Qui-Quadrado (R^2) para a amostra positiva diluída e os valores esperados desta diluição 108

Tabela 10 - Estatísticas Descritivas da Repetitividade de amostra positiva..... 108

Tabela 11 - Teste de Kolmogorov-Smirnov para ensaio de Repetitividade de amostra positiva..... 110

Tabela 12 - Teste de McNemar para resultados das amostras clínicas 111

Tabela 13 - Cálculo de Sensibilidade e Especificidade das amostras clínicas, comparando os resultados obtidos com os resultados prévios..... 112

Tabela 14 - Cálculo do Índice Kappa em comparação aos resultados do ensaio de amostras clínicas e os resultados prévios..... 112

Tabela 15 - Área sob a curva ROC da comparação entre os resultados obtidos e resultados prévios das amostras clínicas 112

Tabela 16 - Teste de Wilcoxon para a comparação dos resultados de absorbância em soro e papel filtro 114

Tabela 17- Teste de Friedman para a comparação dos resultados de absorbância em soro e papel .. 115

- **Capítulo 5 - Relato de Caso de Síndrome de Guillain-Barrè**

Tabela 1 - Resultados do Hemograma realizado durante a internação hospitalar 125

LISTA DE FIGURAS

• Introdução e Materiais e Métodos	
Figura 1 - Esquema da técnica de ELISA INDIRETO, com seus componentes básicos	20
Figura 2 - Materiais utilizados para coleta de sangue nos participantes da pesquisa	27
Figura 3 - Kit para Detecção de Anticorpos IgG para Zika vírus.....	27
Figura 4 - Lavadora de microplaca de ELISA, marca Bioeasy	29
Figura 5 - Leitora de microplacas de ELISA, marca Robonik	30
Figura 6 - Microplaca e dessecante	31
• Capítulo 1 - Aspectos Relevantes sobre o Diagnóstico do Zika Vírus	
Figura 1 – Estrutura detalhada do Zika Vírus.....	43
Figura 2 - Árvore Filogenética do Zika Vírus	44
Figura 3 - Oportunidade de detecção do Zika vírus, segundo a metodologia laboratorial	49
Figura 4 - Algoritmo laboratorial para amostras suspeitas de microcefalia relacionada ao Zika Vírus – Rede Pública de Saúde	49
Figura 5 - Algoritmo de testes para detecção de arbovírus em casos de suspeita de Zika, Chikungunya ou Dengue – Rede Particular de Saúde	50
• Capítulo 2 - Antibody-dependent Enhancement (ADE) de Zika vírus Causado por Infecção Prévia de Dengue	
Figura 1 - Estrutura do RNA dos Flavivírus e a poliproteína codificada após a transcrição reversa....	60
Figura 2 – Provável mecanismo de ADE de ZIKV mediado por reação cruzada com anticorpos de DENV	65
• Capítulo 3 – O Uso do PCR em Tempo Real no Diagnóstico das Arboviroses	
Figura 1 - Fluxograma das etapas de busca e seleção dos artigos analisados	81
• Capítulo 4 – Validação de Ensaio Imunoenzimático Estruturado para a Detecção de Anticorpos IgG de Zika vírus	
Figura 1 - Histograma da distribuição da idade dos participantes.....	102
Figura 2 - Gráfico de probabilidade do ensaio de controle negativo.....	105
Figura 3 - Gráfico do teste de Qui-Quadrado das amostras positiva.....	107
Figura 4 - Repetitividade das replicatas de amostra positiva	109
Figura 5 - Curva ROC de comparação entre os resultados obtidos pelo teste e resultados prévios da amostras clínicas.....	113

LISTA DE QUADROS

- **Introdução e Materiais e Métodos**

Quadro 1 - Lista de materiais, instrumentos e equipamentos usados para validação do <i>kit</i>	26
Quadro 2 - Esquema do Ensaio de ELISA IgG para ZIKV.....	34
Quadro 3 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um teste de ELISA e o diagnóstico verdadeiro da doença.....	35
Quadro 4 - Análise de erros que podem ter ocorrido, após a validação do ensaio.....	36
Quadro 5 - Relação entre Absorbância da Amostra (S) e o cut-off do teste (Co).....	37

- **Capítulo 1 - Aspectos Relevantes sobre o Diagnóstico do Zika Vírus**

Quadro 1 - Vantagens e Desvantagens das Metodologias de Diagnóstico para Zika vírus	51
---	----

- **Capítulo 3 – O Uso do PCR em Tempo Real no Diagnóstico das Arboviroses**

Quadro 1 - Artigos selecionados durante etapas da pesquisa da Revisão Integrativa. Autoria, tipo de estudo e ano de publicação	82
Quadro 2 – Objetivos dos artigos selecionados, amostras utilizadas nos estudos e breve resumo dos principais resultados	83
Quadro 3 - Eficácia dos ensaios de PCR tempo real, realizados nos artigos selecionados na Revisão Integrativa.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIMO – Associação Brasileira da Indústria de Artigos e Equipamentos Médicos e Odontológicos

ABTS - ácido 5-aminosalicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC – *Centre of Disease Control and Prevention*

CHIKV – Chikungunya virus

Co – Cut off

CSZ – Síndrome Congênita da Zika

DENV – Dengue vírus

DHF/DSS - Dengue Hemorrágica ou a Síndrome do Choque da Dengue

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

ELISA – *Enzima Linked Immuno Sorbent Assay*

FLE - epítipo *fusion loop*

FN – Falso negativo

FP – Falso positivo

GBS - Síndrome de Guillain-Barrè

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IMTUSP - Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo

LEE – Laboratório de Epidemiologia e Estatística da USP

OPD – Ortofenilenodiamina

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PCR-RT – *Polymerase Chain Reaction Reverse Transcriptase*

qPCR – *Real time Polymerase Chain Reaction*

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RNA – Ácido ribonucléico

S – Absorbância da amostra

SGB – Síndrome de Guillain Barrè

TALE – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TMB – Tetrametilbenzidina

TCLE - Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido

VN – Verdadeiro negativo

VP – Verdadeiro positivo

VPN – Valor preditivo negativo

VPP - Valor preditivo positivo

YFV – Febre Amarela

ZIKV – Zika vírus

RESUMO

O surto de Zika Vírus (ZIKV) já não é mais um emergência em saúde pública no Brasil, porém as sequelas do primeiro evento ainda ressoarão por um longo período. Os principais sintomas clínicos são: erupção macular ou maculopapular com presença de prurido, dor de cabeça, artralgia, mialgia, prostração, conjuntivite não-purulenta, e pode, ou não, estar associada a febre baixa. Há vários impactos sociais e econômicos em decorrência do surto de ZIKV de 2015 no Brasil, como a microcefalia e a Síndrome de Guillain-Barrè. A SGB é uma complicação neurológica inflamatória, que pode acontecer pós-infecção por ZIKV, geralmente diagnosticada pelos sintomas apresentados pelo paciente como fraqueza nos músculos, perda de sensibilidade nas extremidades e diminuição dos reflexos. DENV e ZIKV são RNA vírus homólogos. Chegam a compartilhar, ao menos, 41% de semelhança na sequência de aminoácidos da proteína E, primeira a ser reconhecida pelo organismo durante a infecção. A principal reação cruzada que pode ocorrer em infecções por DENV e ZIKV é a *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE). Esse fenômeno pode causar um asseveramento na infecção, trazendo consequências até letais, como no caso da Febre da Dengue Hemorrágica, na infecção pelo DENV. A diferenciação entre ZIKV e DENV, feita somente por diagnóstico clínico não é confiável. O diagnóstico laboratorial é essencial para essa diferenciação, principalmente nos casos de estágio de convalescência da doença. As reações cruzadas com os demais Flavivirus são comuns, devido à semelhança genética entre os vírus. O PCR em tempo real é realizado durante a fase aguda da doença, restrita a um período de 3 a 5 dias. Os testes sorológicos são realizados tanto na fase aguda (anticorpos do tipo IgM) quanto na fase de convalescência (anticorpo do tipo IgG). O desenvolvimento de um *kit* de ELISA é feita em três estágios: Desenvolvimento, Otimização e Validação. A fase de validação verifica o desempenho do *kit* quanto à sensibilidade, especificidade e precisão. Este estudo tem como objetivo estabelecer a diferenciação do diagnóstico de Zika vírus, por meio da estruturação de um ensaio imunoenzimático, metodologia ELISA, para detecção de anticorpos da classe IgG. Em sua maioria, os testes de ELISA são importados de outros países, já que o Brasil não os produz internamente ou possuem qualidade inferior aos produtos importados. Isso significa menor custo para os laboratórios e maior qualidade nos produtos nacionais. A Linearidade e a Exatidão do *kit* foi comprovada. A Sensibilidade Analítica do *kit* foi de 97,8% ajustado. A Especificidade Analítica foi de 100%. Não houve reação cruzada com os anticorpos anti-DENV em nenhuma das amostras analisadas.

Palavras-chave: Zika vírus, Síndrome de Guillain-Barrè, Diagnóstico *in vitro*, Sensibilidade, Especificidade

ABSTRACT

The Zika Virus (ZIKV) outbreak is no longer a public health emergency in Brazil, but the sequels of the first event will still resonate over a long period. The main clinical symptoms are: macular or maculopapular rash with pruritus, headache, arthralgia, myalgia, prostration, non-purulent conjunctivitis, and may or may not be associated with low fever. There are several social and economic impacts due to the 2015 ZIKV outbreak in Brazil, such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome. GBS is an inflammatory neurological complication that can happen after ZIKV infection, usually diagnosed by the symptoms presented by the patient, such as weakness in the muscles, loss of sensation in the extremities and decreased reflexes. DENV and ZIKV are RNA virus closely related. They share at least 41% similarity in the amino acid sequence of protein E, the first to be recognized by the body during infection. The main cross reaction that can occur in infections by DENV and ZIKV is Antibody-Dependent Enhancement (ADE). This phenomenon can cause severe infection, bringing even lethal consequences, as in the case of Dengue Hemorrhagic Fever, in the DENV infection. The differentiation between ZIKV and DENV, made only by clinical diagnosis is not reliable. Laboratory diagnosis is essential for this differentiation, especially in cases of convalescence stage of the disease. Cross reactions with other Flaviviruses are common, due to the genetic similarity between viruses. Real-time PCR is performed during the acute phase of the disease, restricted to a period of 3 to 5 days. Serological tests are performed both in the acute phase (IgM type antibodies) and in the convalescence phase (IgG type antibodies). The development of an ELISA kit is done in three stages: Development, Optimization and Validation. The validation phase checks the kit's performance for sensitivity, specificity and accuracy. This study aims to establish the differentiation of the Zika virus diagnosis, by structuring an immunoenzymatic assay, ELISA methodology, for the detection of IgG class antibodies. Most ELISA tests are imported from other countries, since Brazil does not produce them domestically or have lower quality than imported products. This means lower cost for laboratories and higher quality for national products. The kit's Linearity and Accuracy has been proven. The Analytical Sensitivity of the kit was 97.8% adjusted. The Analytical Specificity was 100%. There was no cross reaction with anti-DENV antibodies in any of the samples analyzed.

Key-words: Zika virus, Guillain-Barré syndrome, in vitro Diagnosis, Sensitivity, Specificity

1. INTRODUÇÃO

A epidemia de Zika vírus (ZIKV) se alastrou rapidamente pelo Brasil e por vários outros países em todo o continente americano. Há relatos de ocorrência de surto, no Brasil, de uma doença exantemática não reconhecida, em dezembro de 2014. Somente em maio de 2015, houve a confirmação por diagnósticos laboratoriais de que se tratava do ZIKV, espalhado por toda a região nordeste do país, principalmente nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Bahia. Outros estados também relataram ocorrências, com algumas exceções ao Sul, onde o clima não é favorável ao vetor, e estados de pouca densidade ao Norte (LOWE, 2018).

Há três teorias sobre a introdução do Zika Vírus no Brasil: a primeira é de que o vírus foi introduzido durante a Copa do Mundo de 2014; a segunda teoria é de que ocorreu durante um evento de Canoagem em 2014 no Rio de Janeiro, em que um atleta oriundo da Ásia estivesse com a viremia; e a última hipótese seria de que a introdução ocorreu em 2013, nos jogos da Copa das Confederações. Inicialmente, a contaminação pelo ZIKV pode ter passado despercebida, pelos sintomas serem bastante semelhantes aos causados pelo vírus da Dengue (DENV) e o surto somente chamou a atenção das autoridades sanitárias, quando houve a associação entre a doença e os casos de microcefalia em neonatos (Síndrome Congênita da Zika) e as desordens neurológicas (Síndrome de *Guillan-Barrè*) (CALVET, 2018).

Os principais sintomas clínicos do ZIKV são: erupção macular ou maculopapular com presença de prurido, dor de cabeça, artralgia, mialgia, prostração, conjuntivite não purulenta, e podem, ou não, estar associados à febre baixa. Cerca de 80% dos casos são assintomáticos, o que dificulta um levantamento epidemiológico satisfatório em relação a esta doença. No Brasil, foram relatados três casos de morte em decorrência de ZIKV até maio de 2016 (CALVET, 2018). Os sintomas clínicos e os achados laboratoriais mais simples, que são trombocitopenia e leucopenia no hemograma, são típicos de outras arboviroses, principalmente causados por DENV e Chikungunya vírus (CHIKV). (FELIX, 2017). De todas as arboviroses, Febre Amarela (YFV), DENV e CHIKV são as mais relevantes quanto ao diagnóstico, pelo grande número de casos das três doenças em território brasileiro. Todas as doenças citadas, incluindo o ZIKV, são co-circulantes e transmitidas pelo mesmo vetor, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (MAGALHÃES, 2017).

Há vários impactos sociais e econômicos em decorrência do surto de ZIKV de 2015 no Brasil. O primeiro deles é a alta incidência de casos de microcefalia, ou outros agravos após o nascimento, devido à Síndrome Congênita da Zika. A microcefalia é responsável pelo mau desenvolvimento da criança, que envolve a família e toda a comunidade ao redor, uma vez que as limitações são diversas. A partir desse impacto social, houve grande disseminação de casais que passaram a evitar a

concepção neste período, receosos de serem atingidos pela infecção. Assim, o CDC (*Centre of Disease Control and Prevention*) declarou que os casais que haviam sofrido com uma infecção de ZIKV, deveriam esperar ao menos 180 dias para a concepção, já que foi encontrado material genético do vírus em sêmen depois de 188 dias de infecção e, após oito semanas, em secreção vaginal (LOWE, 2018).

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é importante, mesmo em momentos em que há controle de surtos e menos casos de infecção. Isso se deve ao grande impacto socioeconômico causado pelos casos de microcefalia em neonatos e dos distúrbios neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré. Além disso, é relevante a necessidade de diferenciação entre as demais arboviroses, tornando eficazes o diagnóstico, o tratamento e a prevenção de novos casos (DONALISIO et al., 2017; KUROSAKI et al., 2017). O diagnóstico da Zika é feito tanto por detecção do genoma viral via PCR-RT, quanto por sorologia na fase aguda (IgM) ou convalescência (IgG), sendo detectada em soro, plasma, saliva, urina, sêmen, secreção vaginal e leite materno (CALVET, 2018). O problema do diagnóstico do ZIKV está relacionado ao alto índice de reações cruzadas com DENV e CHIKV. Mesmo os testes de biologia molecular (PCR-RT ou qPCR) podem causar resultados falsos-negativos, devido à semelhança genética entre os vírus. O desafio é criar ensaios sorológicos, que custem menos, possuam técnica mais simplificada e usem equipamentos mais baratos, mais sensíveis e mais específicos para o ZIKV (NICOLINI, 2017).

O anticorpo IgM é o marcador de infecção aguda e pode ser encontrado no sangue contaminado por até 2 meses após o início dos sintomas. A soroconversão é a etapa mais confiável de detecção, justamente por quase descartar a reação cruzada com as demais arboviroses (CALVET, 2018). A detecção do anticorpo IgM é indicada em casos de suspeita pelos sintomas clínicos, quando o resultado é negativo na metodologia por PCR (MUNOZ-JORDAN, 2017). A maioria dos produtos disponíveis no mercado mundial usam antígenos NS1 (*non-structure protein 1*), NS5 (*non-structure protein 1*) e proteína E (Envelope) do ZIKV, em busca de se aumentar a especificidade dos kits (NICOLINI, 2017). O anticorpo marcador de infecção tardia é o IgG, que é detectado a partir da soroconversão. Ele é classificado como uma imunidade definitiva, pois a produção desta classe de imunoglobulina pelo organismo é de longa duração, na maioria dos casos pelo resto da vida. Para maior confiabilidade de um resultado positivo para ZIKV, uma amostra do paciente deve ser novamente testada após 2 a 3 semanas do início dos sintomas, identificando a presença dos anticorpos IgG (CALVET; DOS SANTOS; SEQUEIRA, 2016).

Os testes sorológicos ou imunoenaios são procedimentos utilizados para a detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos, utilizando ou não reagentes marcados. Desde os primeiros estudos, realizados por Rosalyn Yalow e Solomon Berson em 1950, houve um crescimento na

utilização dos imunoenaios. Inicialmente, os imunoenaios foram utilizados para a detecção de hormônios, mas vários testes foram rapidamente desenvolvidos para monitoramento de drogas terapêuticas, doseamento de enzimas, marcadores tumorais, lipoproteínas, vitaminas e outros vários metabólitos. Com isso, os imunoenaios foram além da detecção da presença ou não de anticorpos/antígenos de doenças infectocontagiosas, variando as suas aplicações não só na medicina diagnóstica, como também em ciências farmacêuticas, veterinárias, ambientais, forenses, militares e alimentares (WILD, 2013). Desde meados da década de 1980, houve um avanço ainda mais significativo nos imunoenaios, tanto no desenvolvimento de antígenos e anticorpos usados nos ensaios, bem como no aprimoramento das técnicas e métodos usados para o diagnóstico (FERREIRA; MORAES, 2013)

O imunoensaio mais utilizado para detecção de substâncias de interesse biológico são os ensaios imunoenzimático. O enzimaensaio, como também é chamado o ensaio imunoenzimático, mede a atividade enzimática sobre um substrato, já que se utiliza de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, permitindo a detecção, titulação e quantificação do analito pesquisado na amostra biológica (VAZ, 2007). O enzimaensaio mais comumente usado é o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), cujo termo foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlmann em 1971 e identifica ensaios enzimáticos heterogêneos. O ELISA baseia-se na imobilização de um dos reagentes em fase sólida e a ligação do outro reagente com uma enzima, preservando-se tanto a ação enzimática como a atividade imunológica do anticorpo (FERREIRA; MORAES, 2013).

As enzimas são a classe de substâncias mais populares e versáteis utilizadas para os imunoenaios. O uso destas substâncias ainda será perpetuado por um longo período, devido a fatores favoráveis em relação aos demais imunoenaios, como alta sensibilidade, possibilidade de quantificação do analito pesquisado, facilidade do uso e execução dos testes, não radioatividade dos reagentes. Alguns desses fatores influenciam no menor risco ao usuário, além de poder ser adaptado tanto para testes simples como para testes com automações sofisticadas. Os sistemas de detecção, ou seja, como o sinal da ligação antígeno-anticorpo será visualizado, varia desde uma leitura visual à leitura fotométrica, através da presença de cor (substratos coloridos) (FERREIRA; MORAES, 2013; WILD, 2013)

Quando o analito a ser pesquisado na amostra biológica é um antígeno, utiliza-se um anticorpo na sensibilização da placa. É feita uma adsorção do anticorpo anti-antígeno específico, ou seja, o anticorpo específico para o antígeno pesquisado é fixado no fundo da microplaca de ELISA. Este anticorpo fixado deve ter alta afinidade e a concentração dele aderida à placa vai gerar uma curva dose-resposta com grande inclinação. Quando o analito a ser pesquisado na amostra biológica é

um anticorpo, o antígeno deve estar na sua forma mais pura, podendo-se utilizar antígenos purificados por cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais, peptídeos sintéticos ou peptídeos obtidos a partir de tecnologia recombinante (FERREIRA; MORAES, 2013)

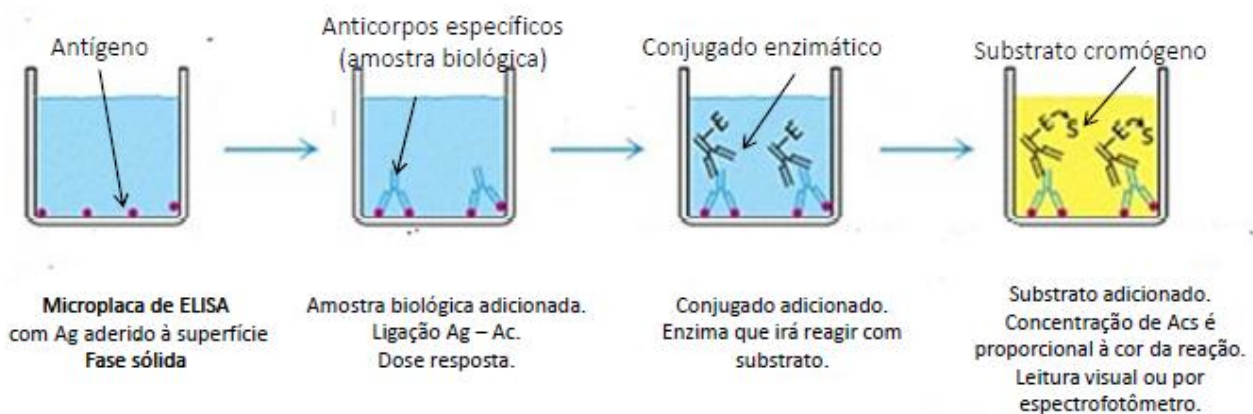
Quanto às amostras utilizadas nos testes de ELISA, é importante que estejam dentro da faixa de concentração da quantidade de antígeno ou anticorpo aderido à microplaca utilizada. Isto é, a quantidade de analito pesquisada na amostra não pode ser superior à quantidade de partículas aderidas à microplaca. Caso contrário, será percebido um efeito chamado Pró-zona, que é um excesso de analito em relação ao antígeno ou anticorpo adsorvido, que promove uma leitura errônea do resultado do teste (aumento da densidade óptica). Para se evitar esse efeito, é necessário diluir a amostra. Além disso, existe a possibilidade de adsorção não-específica de componentes da amostra na placa, devido aos vários componentes heterólogos da amostra. Esse efeito pode ser reduzido incluindo-se um detergente não iônico, como o Tween 20 e/ou uma proteína (leite desnatado, gelatina, BSA, caseína, etc.) no diluente de amostra (FERREIRA; MORAES, 2013). O acréscimo da proteína vai bloquear os sítios de ligação remanescentes na fase sólida do ensaio, de forma a não interferir no resultado do sistema antígeno-anticorpo em estudo (VAZ, 2007).

As enzimas são partes atuantes na geração do sinal de interação antígeno-anticorpo e são inseridas no ensaio através de um reagente chamado conjugado. Este reagente é composto por antígenos ou anticorpos (varia de acordo com o analito pesquisado na amostra) ligados covalentemente à uma enzima, de forma a resguardar as duas importantes funções das duas moléculas ligadas: a atividade catalítica da enzima e a antigenicidade do antígeno ou especificidade da imunoglobulina (VAZ, 2007). Os conjugados devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade, preferencialmente monoclonais, e extremamente purificados. O método de conjugação, os diluentes e as condições de armazenamento podem influenciar no desempenho do conjugado e a concentração do conjugado deve ser avaliada a cada lote produzido e, inevitavelmente, varia de acordo com o sistema de ensaio (FERREIRA; MORAES, 2013).

Uma vez em que houve a ligação entre o antígeno e o anticorpo, independente da origem, os excessos devem ser retirados do teste. Esse procedimento evita que o sinal gerado seja por fatores alheios à quantidade de ligação antígeno-anticorpo, causando perda do principal objetivo do ensaio. Assim, sempre após um período de incubação, o ensaio passa por uma etapa de lavagem com uma solução salina tamponada (PBS) com uma pequena concentração de detergente não-iônico (Tween 20) na proporção de 0,01 a 0,05% e de pH entre 6,8 e 7,5. São usuais lavagens com 300 a 500 μ L da solução em cada micropoço, após a aspiração total do volume incubado, por 3 a 5 ciclos (WILD, 2013).

Para que haja a geração de sinal, um substrato deve ser inserido no ensaio, para que a enzima aderida ao analito, na primeira incubação, entre em atividade. Os substratos cromógenos empregados para a degradação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, e a densidade óptica da solução pode ser medida espectrofotometricamente. Para a peroxidase (enzima mais usada para a técnica de ELISA), o substrato é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-aminosalicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB). Este último é o mais disseminado comercialmente. A escolha do cromógeno depende da preferência do fabricante do teste de ELISA, e a concentração ótima do substrato (H_2O_2) depende tanto do cromógeno empregado como da fase sólida, devendo ser estabelecida preliminarmente (FERREIRA; MORAES, 2013). A Figura 1 demonstra um esquema da técnica de Elisa Indireto, em que há um antígeno aderido à microplaca e a pesquisa de anticorpos na amostra biológica.

Figura 1 - Esquema da técnica de ELISA indireto, com seus componentes básicos.



Fonte: Autoria própria

O desenvolvimento de um *kit* de ELISA é feito em três estágios: Desenvolvimento, Otimização e Validação. No desenvolvimento, cabe a análise de qual antígeno/anticorpo será usado, que tipo de ELISA será desenvolvido e qual enzima será usada. A fase de otimização consiste em titular os reagentes para se encontrar o melhor desempenho, como o volume de amostra a ser utilizado ou o uso de diluente para se evitar o efeito matriz. A fase de validação verifica o desempenho do *kit* quanto à sensibilidade, especificidade e precisão. Tornar um *kit* de ELISA viável demanda tempo para ser realizado. Usualmente, são requeridos meses ou até anos. A seleção de anticorpos e antígenos, a concentração em que serão utilizados e a formulação dos reagentes que irão gerar o sinal de reação devem ser criteriosamente estudadas para chegar a um produto final com qualidade (WILD, 2013).

No Brasil, a validação final de um *kit* de ELISA é regularizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 36 de 26 de agosto de 2015. Essa resolução dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*. O intuito é regulamentar quais testes e ensaios mínimos devem ser realizados para comprovar a eficácia e a conformidade aos requisitos dos usuários. O artigo 29 da RDC 36 contém todos os itens necessários à Validação do produto, incluindo a sensibilidade, especificidade, precisão, dentre outros. Para efeito de registro de produto, todos os ensaios devem ser executados, porém para o efeito do estudo da eficácia do produto, os estudos analíticos de sensibilidade, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade, são suficientes e comprovam que o produto está apto a desempenhar a função inicialmente proposta.

O surto de ZIKV já não é mais um emergência em saúde pública no Brasil, porém as sequelas deste primeiro evento ainda ressoarão por um longo período, devido aos impactos na sociedade e nas famílias atingidas pelas formas mais severas de sequelas (LOWE et al., 2018). O controle da doença ainda passa pelo controle do vetor, o que tem se mostrado ineficiente, já que também transmite DENV, que ano após ano ressurgem na estação chuvosa no país. Alguns pontos ainda merecem atenção dos pesquisadores, como o fato de um mesmo vetor transmitir quatro arboviroses e DENV ser a de maior prevalência entre elas (DONALISIO et al., 2017; CHAVES et al., 2018; LOWE et al., 2018). A falta de controle destas doenças pode estar intimamente atrelada ao fato de que a grande maioria dos diagnósticos são feitos baseando-se apenas na clínica do infectado. Quando não há um diagnóstico diferencial efetivo, as autoridades sanitárias têm dificuldade em instituir programas de prevenção mais eficientes, de previsão de ressurgimento de novos surtos e epidemias (KUROSAKI et al., 2017).

Os testes de ELISA são confiáveis e reprodutíveis, trazendo resultados satisfatórios, com sensibilidade e especificidade ao fim que se destinam. Além disso, possuem custo relativamente baixo de comercialização e requerem equipamentos de fácil aquisição e manuseio. Em sua maioria, os testes de ELISA são importados de outros países, já que o Brasil não os produz internamente ou, quando há produção, possuem qualidade inferior aos produtos importados.

O mercado consumidor destes testes é crescente e apresentou taxa acima de 55% de crescimento entre 2009 e 2013. O crescimento entre 2014 e 2018 se manteve entre 10%, devido à crise financeira que o país enfrenta. Em 2019 as importações da área diagnóstica decresceram 14,1% e a produção nacional cresceu 6,5%. Outro fator é o de que a produção nacional deste tipo de tecnologia se concentra em estados da região Sudeste do país, concentrando neste espaço geográfico o parque industrial, tecnológico e científico da área de diagnóstico brasileiro (ABIMO, 2019).

A produção nacional de um teste de ELISA significa menor custo para os laboratórios, maior qualidade nos produtos nacionais, trazendo consigo a melhoria no monitoramento da terapêutica. Ao se tratar de um produto de diagnóstico de uma doença de alto impacto na saúde pública, não somente no que diz respeito à Síndrome Congênita da Zika ou Síndrome de Guillain-Barrè, mas também à diferenciação e tratamento dos dados epidemiológicos mais fidedignos das arboviroses, a produção nacional ganha destaque e relevância. Além disso, proporcionaria a disseminação da tecnologia para a Região Centro-Oeste, mais precisamente para o estado de Goiás.

Nesta pesquisa não foi realizada a etapa de Desenvolvimento do *kit* de diagnóstico *in vitro* para detecção de anticorpos IgG de Zika Vírus, nem a etapa de Otimização de alguns componentes. Não haveria tempo hábil para se efetuar todas as etapas de desenvolvimento requeridas, principalmente a sensibilização da microplaca e a determinação da concentração do conjugado utilizado, já que o tempo disponível para toda a execução do projeto é de 24 meses. Sendo assim, estes dois componentes foram adquiridos prontos para uso. Foram desenvolvidos os itens Diluente de Amostras, Solução de Lavagem, Cromógeno Substrato e Solução de Parada.

Apesar de usar dois componentes prontos para uso, o produto final é considerado um produto desenvolvido por tecnologia nacional. Os anticorpos utilizados na metodologia Elisa são o coração deste ensaio, as soluções de diluição e lavagem, são a espinha dorsal. Sem a correta formulação estequiométrica dessas soluções, concentração e aplicação, o ensaio pode sofrer alterações de pH, por exemplo, que inativam as enzimas ou promover a remoção do complexo Ac-Ag (WILD, 2013). Até mesmo a Solução de Parada, em concentração inadequada, pode promover um ocultamento do reação Ac-Ag.

Acredita-se no potencial da tecnologia local, em otimizar e validar um produto nacional para diagnóstico imunoenzimático, metodologia ELISA, para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika Vírus, obtendo um produto com sensibilidade e especificidade superiores a 98%, capaz de suprir a necessidade do mercado de medicina diagnóstica brasileira, oferecendo um recurso diagnóstico mais barato, rápido e de fácil execução aos profissionais de saúde, tornando o mercado independente de produtos importados e de alto custo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer a diferenciação do diagnóstico de Zika vírus, por meio da estruturação de um ensaio imunoenzimático, metodologia ELISA, para detecção de anticorpos da classe IgG.

2.2. Objetivos Específicos

CAPÍTULO 1

- Avaliar dados sobre os diagnósticos do Zika vírus.

CAPÍTULO 2

- Decrever o fenômeno de ADE, decorrente de infecção prévia de vírus da Dengue, como desencadeador dos agravos ocorridos pela infecção do Zika vírus.

CAPÍTULO 3

- Avaliar os dados sobre a eficácia do diagnóstico *gold standard* para o Zika vírus;
- Avaliar os dados de que o diagnóstico *gold standard* para o Zika vírus tem seu uso restrito ao período de viremia da infecção;

CAPÍTULO 4

- Validar a exatidão do *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus.
- Validar a linearidade do *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus .
- Validar a sensibilidade analítica do *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus, com a determinação do *cut-off*.
- Validar a especificidade analítica *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus, através da determinação de ausência de reação cruzada com Dengue.
- Validar a precisão intra-ensaio (repetibilidade) do *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus.
- Validar o uso do *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus com amostras de soro do paciente.
- Demonstrar o não desenvolvimento de efeito prózona no *kit* para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika vírus, com auxílio de amostra do paciente coletada em papel filtro.

CAPÍTULO 5

- Relatar o caso de um paciente que desenvolveu a síndrome de Guillain-Barrè após a infecção pelo Zika vírus;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento do Estudo

Para as revisões de literatura, foram utilizados os bancos de dados PubMed e SciELO, para a pesquisa de artigos científicos em língua inglesa e portuguesa. O período de publicação entre janeiro de 2014 e julho de 2019 foi delimitado, com o intuito de selecionar os mais atuais e relevantes artigos sobre o tema, visto se tratar de assunto mais disseminado a partir de 2014. DECS e MESH foram usados para encontrar os descritores “Zika vírus”, “Dengue vírus”, “ELISA”, “*Guillain Barrè Syndrome*”, “*Mircocephaly*”, “*Antibody-dependent Enhancement*”. Especificamente para o Capítulo 3 foram utilizados somente os descritores “*Real Time PCR*”, “*arbovirus*” e “*molecular diagnosis*”. Foram utilizados os operadores booleanos “AND” na busca do banco de dados PubMed, e “OR” no banco de dados SciELO. Não foi aplicada restrição quanto ao desenho do artigo.

O ensaio com amostras biológicas foi do tipo transversal prospectivo, com amostragem não probabilística por conveniência. Este tipo de amostragem foi justificada pela necessidade de amostras de pacientes que já tenham apresentado algum sintoma relacionado à doença causada por ZIKV.

3.2. Amostras biológicas

Os participantes da pesquisa foram selecionados a partir da afirmação de que já tiveram a infecção por Zika vírus ou ao menos a manifestação de sintomas clínicos parecidos com os sintomas de uma arbovirose: dores de cabeça, artralgia, mialgia e erupção cutânea. Foram convidados a participar da pesquisa por meio de um questionário de informações e da coleta de aproximadamente 10 mL de sangue venoso, e gotas de sangue para a coleta em papel filtro (3 áreas do papel filtro). Foram informados sobre o sigilo da pesquisa, de que seus dados não seriam divulgados, incluindo explicação sobre condições de participação do estudo e as normas éticas, incluindo a assinatura o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) ou TALE (termo de assentimento livre e esclarecido). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Goiás, sob o protocolo nº 11018119.2.0000.8113.

A pesquisa dos anticorpos IgG foi realizada com 30 amostras. O risco ao paciente foi mínimo, pois foram coletadas as amostras e as informações de forma a resguardar a saúde e privacidade. Não houve intercorrências durante a coleta dos pacientes. O ambiente de coleta foi preparado e o procedimento realizado por pessoas treinadas e capacitadas para o procedimento. Os pacientes doadores de amostras foram selecionados por busca ativa na sociedade, sendo 8 pacientes ao todo. Foram coletados 10 mL de sangue, por punção venosa, em seringas descartáveis. O soro foi obtido

pela centrifugação dos tubos com sangue, sendo então separados, identificados e armazenados sob congelamento em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sangue seco foi obtido com a aplicação do sangue fresco do paciente em papel filtro S&S 903 (Schleicher & Schuell 903), no momento da coleta. O armazenamento das amostras se faz obrigatório pelo período de validade dos testes mais um ano, segundo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Para completar as amostras utilizadas no ensaio, 15 foram obtidas pela solicitação de amostras positivas de ZIKV, coletadas em 2016, durante o surto da doença. Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Eduardo Levi, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP). Como são amostras conhecidamente positivas, foram utilizadas como controle positivo para o ensaio. As amostras doadas são de soro e estavam congeladas a -20°C no IMTUSP. Esta mesma temperatura foi mantida durante o transporte até o laboratório onde o ensaio foi realizado e as amostras foram armazenadas nestas mesmas condições, após o recebimento.

Para o cálculo da amostragem foi levada em consideração a prevalência estadual (Goiás) de DENV, no ano de 2016. Os dados para ZIKV são inconsistentes, vez que a maioria do diagnóstico é feita por anamnese clínica, não sendo realizados os testes laboratoriais confirmatórios para a doença. Como a DENV é uma arbovirose, assim como o ZIKV, consideramos a epidemiologia para o cálculo da amostra. Além disso, muitos dos casos diagnosticados clinicamente como DENV podem ser outras arboviroses, mas não são devidamente diagnosticadas.

O cálculo da amostra foi feito pelo sistema LEE (Laboratório de Epidemiologia e Estatística da USP - http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/calculo_amostra.html), conforme Tabela 1, considerando-se:

- Proporção na população: 1,42%
- Precisão Absoluta: 5
- Nível de significância: 5%
- Tamanho da amostra calculada: 15 (total de amostras) – triplicamos a quantidade da amostragem para maior robustez da pesquisa.

Tabela 1 - Nível de significância versus tamanho amostral

Nível de significância	Tamanho da amostra
0,1%	43
1%	26
5%	15
10%	11

Fonte: LEE, 2018

3.3. Local

A coleta de dados e de material foi realizada pela aluna de mestrado, Christiane Oliveira Lima Licínio, que é biomédica, profissional habilitada e com capacitação para sua realização. O material biológico e as informações também foram manipulados pela aluna de mestrado, em laboratório apropriado para execução de ensaios imunoenzimáticos, em a colaboração com o Laboratório de Pesquisa Genética da UEG (Universidade Estadual de Goiás), Faculdade do Esporte, campus ESEFFEGO, em Goiânia-GO.

3.4. Materiais e Instrumentos

O Quadro 1 descreve os materiais, instrumentos e equipamentos usados no laboratório para a produção dos componentes do kit e para a validação dos ensaios.

Quadro 1 - Lista de materiais, instrumentos e equipamentos usados para validação do *kit*

Questionários dos participantes da pesquisa	Termohigrômetro
Seringas descartáveis	Estufa 37°C
Tubos de coleta de sangue	PHmetro
Luvas de procedimento cirúrgico descartáveis	Deonizador de água
Garrote	Banho maria digital
Estantes para tubos	Termômetro
Caixa para armazenamento de amostras	Lavadora ELISA
Caixa para descarte de perfurocortantes	Leitora de ELISA
Centrífuga	Multitimer
Ponteiras 0-200 µL e 200-1000 µL	Descarte para perfurocortantes
Agitador para microplaca	Pipeta de vidro (1, 2, 5, 10 mL)
Freezer para armazenamento de amostra	Pipeta automática de volume variável
Geladeira para armazenamento dos testes	Suporte para micropipeta
Proveta (100, 150, 250, 500, 1000 mL)	Balão volumétrico (100, 150, 250 mL)
Erlenmeyer (150, 250, 500, 1000 mL)	Becker (150, 250, 500, 1000 mL)
Estante para tubos	Tubo de Ensaio de Vidro 12x75
Tubo Eppendorf para armazenamento amostras	Jalecos
Óculos Proteção	Touca

Fonte: Autoria própria

3.5. Procedimentos para a Pesquisa

O sangue foi coletado por punção venosa, em ambiente ambulatorial e identificado com um código para cada participante, com material apropriado e descartável, como visto na Figura 2. O mesmo código usado no questionário é o código dos tubos coletados, evitando-se assim trocas de materiais biológicos. Foi mantido sob refrigeração até o laboratório de controle de qualidade, onde sofreu processamento: centrifugação e separação do soro e eluição do sangue seco. As amostras foram congeladas a -20°C , para conservação durante os ensaios.

Figura 2 - Materiais utilizados para coleta de sangue nos participantes da pesquisa



Fonte: Autoria própria

3.6. Princípios do Kit de ELISA

O kit para detecção de anticorpos IgG do Zika Vírus (Figura 3) se presta ao diagnóstico de forma qualitativa, ou seja, ele indica a presença ou ausência dos anticorpos nas amostras humanas. O princípio do teste utilizado é chamado de ELISA do tipo Indireto, pois o conjugado enzimático é constituído de um anti-anticorpo IgG humano. A lista de componentes do produto, suficientes para 96 testes, está descrita na Tabela 2.

As microplacas foram revestidas com a proteína NS1 do vírus de Zika vírus sintéticos. Elas foram adquiridas prontas para uso, importadas da empresa italiana Dia.pro. Na primeira incubação, a fase sólida entrou em contato com o soro do paciente, em conjunto com o diluente de amostras.

Assim, caso estivessem presentes, os anticorpos anti-Zika vírus IgG seriam capturados pelos antígenos presos à microplaca. A lavagem, realizada em equipamento semi-automatizado (Figura 4), após a primeira incubação, retirou todos os componentes não específicos à reação antígeno-anticorpo.

Figura 3 - Kit para Detecção de Anticorpos IgG para Zika vírus



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Componentes do *Kit* ELISA IgG para Zika vírus

ITEM	QUANTIDADE	VOLUME
Microplaca	01	12 poços x 8 tiras
Controle Negativo	01	2,0 mL
Controle Positivo	01	2,0 mL
Solução de Lavagem Concentrado	01	60,0 mL
Conjugado Enzimático	01	16,0 mL
Cromógeno Substrato	01	16,0 mL
Solução de Parada	01	15,0 mL
Diluyente de Amostra	02	60,0 mL

Fonte: Autoria própria

Em seguida foi adicionado o conjugado enzimático, também pronto para uso, importado da empresa italiana Dia.pro. Ao adicionar o conjugado enzimático, foi adicionando à reação os anti-anticorpos humanos IgG, marcados com a peroxidase (HRP). Uma nova incubação foi realizada e ao final foi adicionado o complexo substrato/cromógeno. O substrato se liga à enzima peroxidase e gerou um sinal óptico proporcional à quantidade de anticorpos anti-Zika IgG presentes na amostra, e que foi detectado por uma leitora ELISA, na faixa de 450 a 630 nm. A leitura foi realizada em equipamento semi automatizado (Figura 5). A presença é determinada pelo cálculo de *cut-off*, discriminando as amostras entre positivas e negativas.

Figura 4 - Lavadora de microplaca de ELISA, marca Bioeasy



Fonte: Autoria própria

3.7. Preparo de Reagentes

Alguns dos componentes do *kit* foram adquiridos prontos para uso, como a microplaca e o conjugado enzimático. Os demais componentes – diluente de amostras, cromógeno/substrato, solução de lavagem, solução de parada – foram preparados e alicotados em frascos para uso nos *kits*. Ao total, foram preparados reagentes para a montagem de 06 *kits* de Zika vírus IgG. Após o preparo dos

Figura 5 - Leitora de microplacas de ELISA, marca Robonik



Fonte: Autoria própria

reagentes, os *kits* foram montados em caixas de papelão, com uma divisão interna que mantém os frascos na posição vertical e separados entre si. A estocagem foi feita em temperatura controlada entre +2°C e +8°C, por até 3 meses após a primeira abertura.

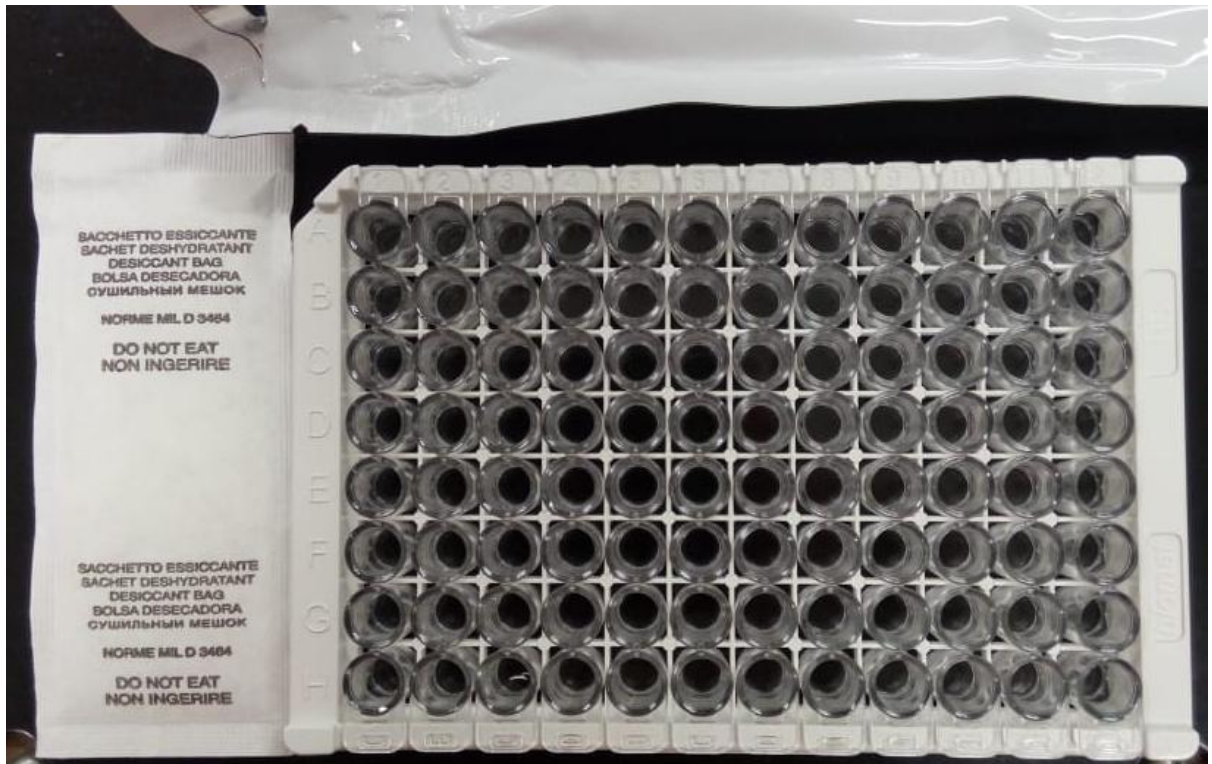
Os *kits* e as amostras foram deixados em bancada para que atinjam a temperatura ambiente. Esse processo levou aproximadamente 30 minutos para ser feito. Sem que os componentes e as amostras estivessem todos à mesma temperatura, interferências na performance das enzimas podem ocorrer. Após a temperatura ambiente ser atingida por todos os componentes, foi feito o preparo dos reagentes, conforme instrução de uso do produto. O conteúdo não utilizado foi novamente acondicionado na caixa de papelão, devidamente vedado e estocado a +2° a +8°C.

3.7.1. Microplaca:

A microplaca (Figura 6) é composta por 12 poços, de fundo chato, em 8 tiras destacáveis, produzidas em poliestireno de alta transparência. Ela possui identificação alfanumérica e área para marcação/identificação na lateral e foi embalada em laminado de alumínio e dessecante para manutenção de baixa umidade e conservação.

Tiras não-utilizadas foram colocadas de volta na bolsa de alumínio, devidamente vedada, e foi estocada a +2°C a +8°C. Quando aberto pela primeira vez, as tiras permanecem estáveis até o indicador de umidade de o dessecante mudar de amarelo para verde.

Figura 6 - Microplaca e dessecante



Fonte: Autoria própria

3.7.2. Controles

O controle negativo foi composto por 1% de soro de cabra, sendo 0 arbU/mL de anticorpos anti-ZIKV. O controle positivo foi composto por 1% de soro de cabra, anti-Zika Vírus IgG humano inativado, sendo 100 arbU/mL de anticorpos anti-ZIKV. Antes do uso o frasco foi agitado cuidadosamente em vórtex, para homogeneização.

3.7.3. Tampão de lavagem concentrado

A solução de lavagem concentrada foi elaborada durante a preparação do *kit*. Para o preparo foram utilizados 10 mM tampão fosfato pH 7,0 \pm 0,2, 0,05% Tween 20, e 0,05% preservativo Kathon GC, água bidestilada q.s.p 60 mL A solução de lavagem possui efeito detergente, retirando os interferentes e componentes inespecíficos da reação antígeno-anticorpo.

Ao realizar os testes, todo o conteúdo da solução concentrada foi diluído 20x em água bi-destilada e delicadamente misturado em vórtex antes da utilização. Durante a preparação, a formação de bolhas de ar foi evitada, para que não afetassem a eficiência durante o ciclo de lavagem.

3.7.4. Conjugado enzimático:

O conjugado enzimático foi composto por HRP conjugado com anticorpos humanos policlonais IgG, 5% BSA, 10 mM de tampão Tris pH 6,8 \pm 0,1, 0,1% Kathon GC e 0,02% de sulfato de gentamicina como preservativos.

Toda e qualquer contaminação do líquido com agentes químicos oxidantes, pó ou contaminação microbiológica, foi evitada, a fim de não comprometer o desempenho.

3.7.5. Diluente de amostra:

O diluente de amostra foi elaborado durante a preparação do *kit*. Foram utilizados 2% de caseína, 10 mM de tampão citrato de sódio pH 6,0 \pm 0,1, 0,1% Tween 20, 0,09% azida sódica, 0,1% preservativo Kathon GC.

3.7.6. Cromógeno/Substrato:

O cromógeno/substrato foi elaborado durante a preparação do *kit*. Foram utilizados 50 mM de tampão citrato fosfato pH 3,5 – 3,8, 4% dimetilsulfóxido, 0,03% tetrametilbenzidina (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio. Foi cuidadosamente agitado em vórtex antes do uso. Toda e qualquer contaminação do líquido com agentes químicos oxidantes, pó ou contaminação microbiológica, foi evitada, a fim de não comprometer o desempenho. O reagente não foi exposto a luz forte e superfícies metálicas.

3.7.7. Solução de parada:

A solução de parada foi elaborada durante a preparação do *kit*. Foram utilizados 0,3 M de solução de ácido sulfúrico. Foi cuidadosamente agitado em vórtex antes do uso.

Atenção: Irritante aos olhos e pele.

3.8. Realização do Ensaio

Os testes *in vitro* foram realizados com o soro e sangue seco coletados dos sujeitos da pesquisa, com os *kits* para detecção de anticorpos IgG do ZIKV, metodologia ELISA. Foram seguidas as instruções de uso do produto e os procedimentos operacionais padrão (POP) do laboratório de pesquisa em genética da UEG, conforme legislação vigente. Os equipamentos

utilizados nos ensaios foram calibrados e/ou qualificados para o desempenho das atividades, bem como todo o pessoal envolvido foi treinado, tanto para o ensaio quanto para a manipulação do produto para diagnóstico.

Os testes *in vitro* foram realizados e liberados através da leitora e lavadora de ELISA, com *software* apropriado para os cálculos dos resultados obtidos. Foram realizadas duas baterias de testes com a mesma amostra: um ensaio com o soro coletado e um ensaio com sangue seco eluído, sendo três replicatas de cada matriz biológica. Assim, cada amostra foi testada 6 vezes para o mesmo parâmetro, a fim de se identificar os seguintes itens:

- sensibilidade do teste em desenvolvimento;
- especificidade do teste em desenvolvimento;
- eficiência (precisão) do teste em desenvolvimento;
- reprodutibilidade do teste em desenvolvimento;
- valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN).

Abaixo, a descrição de cada uma das etapas realizadas para a execução do ensaio de ELISA:

1. As amostras foram diluídas na proporção 1:101 em um tubo de ensaio – por exemplo 1000 µL de Diluente de Amostra e 10 µL de amostra. Os controles negativo e positivo não foram diluídos. Agitar cuidadosamente em vórtex.

2. Foi colocado o número necessário de tiras no suporte das microplacas. O poço A1 foi deixado vazio para o Branco. Foi dispensado 100 µL do Controle Negativo em duplicata, 100 µL do Controle Positivo em duplicata e 100 µL das amostras diluídas em cada poço identificado para tal. Os poços foram selados com a folha adesiva, para evitar a perda de líquido por evaporação.

3. INCUBAÇÃO Nº 1 - a microplaca foi incubada a +37°C por 60 minutos.

4. LAVAGEM Nº 1 – a microplaca foi lavada por 4-5 ciclos contemplando aspiração e posterior dispensação de 350 µL de solução de lavagem por poço. Este procedimento é correspondente a 1 ciclo. Esses ciclos foram o suficiente para assegurar que o ensaio saia como esperado.

5. Foram pipetados 100 µL de conjugado enzimático em todos os poços, com exceção do A1. Após a adição do conjugado, a cor das amostras passa de amarelo a vermelho. Os poços foram novamente selados.

6. INCUBAÇÃO Nº 2 – a microplaca foi incubada a +37°C por 60 minutos.

7. LAVAGEM Nº 2 - a microplaca foi lavada por 4-5 ciclos, contemplando aspiração e posterior dispensação de 350 µL de solução de lavagem por poço. Este procedimento é correspondente a 1 ciclo.

8. Foram pipetados 100 µL de cromógeno substrato em todos os poços, incluindo o A1. Essa etapa foi realizada de forma a não ter incidência de luz direta sobre a reação.

9. INCUBAÇÃO Nº 3 – a microplaca foi incubada a temperatura ambiente (18° a 25°C) por 30 minutos. Os poços com o controle positivo e as amostras positivas passaram de incolores a azul.

10. A reação enzimática foi bloqueada pipetando 100 µL de Ácido Sulfúrico em todos os poços e utilizando a mesma seqüência de pipetagem utilizada na fase 8. A adição do ácido fez com que o controle positivo e as amostras positivas passassem da cor azul à amarela. Em seguida, a intensidade da cor foi medida com um leitor de microplacas a 450nm (leitura), utilizando o poço A1 (Branco) para zerar o equipamento. O Quadro 2 apresenta um resumo do ensaio, com as etapas descritas acima.

Quadro 2 - Esquema do Ensaio de ELISA IgG para ZIKV.

Operação	Procedimento		
	Pipetagem	Incubação	Lavagem
Controles Negativo e Positivo	100 µL		
Amostras diluídas 1:101	100 µL		
1ª incubação		60 min a +37°C	
Etapas de Lavagem			4-5 ciclos
Conjugado enzimático	100 µL		
2ª incubação		60 min a +37°C	
Etapas de Lavagem			4-5 ciclos
Cromógeno Substrato	100 µL		
3ª incubação		20 min a T.A.	
Ácido Sulfúrico	100 µL		
Leitura DO - 450nm			

Fonte: Autoria própria

3.8.1. Análise de Dados:

Os dados resultantes dos testes *in vitro* foram tratados de forma estatística, sendo calculados desvio padrão, média e coeficiente de variação, sempre que aplicável. Também foi usado o programa IBM SPSS Statistics versão 25 e Minitab Statistic Software versão 19, para os cálculos inferenciais. Os resultados obtidos foram comparados através dos métodos de validação dos testes, seguindo a seguinte combinação binária, conforme demonstrado no Quadro 3:

Quadro 3 - Combinação binária entre os resultados prováveis obtidos em um teste de ELISA e o diagnóstico verdadeiro da doença.

TESTES	DOENÇA – Diagnóstico Verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN
Total	VP + FN	FP + VN

Fonte: Autoria própria

Onde:

VP – Verdadeiro positivo // FN – Falso negativo // FP – Falso positivo // VN – Verdadeiro negativo

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{Eficiência} = \frac{VP + VN}{VP + VN + FP + FN}$$

3.9. Controle de Qualidade Interno

O uso dos controles sempre que o *kit* for utilizado garantem a qualidade da performance do ensaio. Valores mínimos de DO (densidade óptica) em 450nm foram determinados para certificar que o desempenho é válido. A Tabela 3 apresenta os valores mínimos de cada parâmetro e a Quadro 4 apresenta possíveis problemas ocorridos, caso os valores mínimos não tenham sido atingidos.

Tabela 3 - Valores mínimos de DO para cada parâmetro, a fim de validar o ensaio

PARÂMETROS	REQUISITOS
Poço do Branco	Valor DO 450nm < 0,100
Controle Negativo	Valor DO 450nm < 0,100, após descontar o branco
Controle Positivo	Valor DO 450nm ≥ 1,000
CV %	< 20%

Fonte: Autoria própria

Quadro 4 - Análise de erros que podem ter ocorrido, após a validação do ensaio

PROBLEMA	VERIFICAR
Poço Branco > 0,100 OD450nm	A solução de Cromógeno/Substrato foi contaminada durante o ensaio.
Controle Negativo > 0,150 OD450nm após o branco	<ol style="list-style-type: none">1. O procedimento de lavagem e os passos de lavagem são os validados durante o estudo de pré-qualificação;2. Foi utilizada a solução de lavagem correta e a lavadora foi purgada com a mesma antes do uso;3. Ocorreu um erro durante o procedimento de ensaio (dispensação do Controle Positivo em vez do Controle Negativo);4. Ocorreu uma contaminação do Controle Negativo ou de seus poços, devido a gotas de amostras positivas ou de conjugado enzimático;5. As micropipetas foram contaminadas com amostras positivas ou com o conjugado enzimático;6. As agulhas da lavadora estão bloqueadas ou parcialmente obstruídas
Controle Positivo < 1,000 OD450nm	<ol style="list-style-type: none">1. O procedimento foi executado corretamente;2. Ocorreram erros durante a sua dispensação (ex: dispensação de controle negativo no lugar do controle positivo. Neste caso, o Controle Negativo irá resultar em um Valor OD450nm > 0,150);3. O procedimento de lavagem e as definições da lavadora são os validados durante o estudo de pré-qualificação;4. Não ocorreu nenhuma contaminação externa do controle positivo.

Fonte: Autoria própria

3.10. Interpretação dos Resultados

Os resultados do teste foram interpretados com a relação entre a DO 450nm da amostra (S) e o valor do *cut-off* (Co), matematicamente S/Co , de acordo com o Quadro 5.

Um resultado negativo indica que não foram detectados anticorpos IgG para o ZIKV, na amostra pesquisada. Um resultado positivo indica uma infecção tardia pelo Zika vírus. A faixa de interpretação como “Indeterminado”, deve ser considerado positivo para IgG do Zika vírus correlacionando os dados clínicos do paciente.

Quadro 5 - Relação entre Absorbância da Amostra (S) e o cut-off do teste (Co)

S/Co	Interpretação
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Indeterminado
> 1.1	Positivo

Fonte: Autoria própria

4. RESULTADOS

Os resultados foram obtidos e descritos em forma de artigos científicos, compondo cada capítulo desta pesquisa:

- **Capítulo 1** - Aspectos Relevantes sobre o Diagnóstico do Zika Vírus

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é demasiadamente importante, mesmo em momentos em que há controle de surtos e menos casos de infecção detectados. Isso se deve ao grande impacto sócio-econômico causado pelos casos de microcefalia em neonatos, além da suma necessidade de diferenciação entre as demais arboviroses. As reações cruzadas entre as arboviroses ainda é um empecilho ao diagnóstico preciso. Mesmo os testes de PCR-RT podem causar resultados falsos, devido à semelhança genética entre os vírus. Os ensaios sorológicos, que custam menos, possuem técnica mais simplificada e usam equipamentos mais baratos, são os testes mais acessíveis. Apesar de que existem epítomos sendo usados para minimizar a reação cruzada, ela ainda não é completamente descartada nessa metodologia. Não há vacina contra o Zika vírus e o controle da infecção é ainda uma questão de medidas de saneamento básico.

- **Capítulo 2** - *Antibody-dependent Enhancement* (ADE) de Zika vírus Causado por Infecção Prévia de Dengue

A ADE de ZIKV em decorrência de uma infecção prévia por DENV é um fenômeno de ocorrência factível no organismo humano. As vias de ação da ADE seja celular ou humoral, através das citocinas envolvidas no processo, são produzidas tanto neste fenômeno *in vitro* quanto *in vivo*. A conclusão sobre o ADE de ZIKV causada por infecção prévia de DENV ainda é vaga, pois os vários estudos sobre esse assunto permanecem controversos entre si. A maioria destes estudos é feita em células de linhagem mielóide (*in vitro*) ou em organismos que não refletem corretamente a infecção no organismo humano (*in vivo*). Os estudos epidemiológicos são fundamentais para a conclusão sobre o assunto. Os dados epidemiológicos, prévios e posteriores à infecção pelo ZIKV, vão esclarecer o entendimento da interação imunológica entre ZIKV e DENV, no organismo humano. Assim sendo, o desenvolvimento de novos meios de se diferenciar as infecções, com sensibilidade e especificidade suficientes são as ferramentas adequadas para esse fim.

- **Capítulo 3** – O Uso do PCR em Tempo Real no Diagnóstico das Arboviroses

A metodologia de PCR em tempo real é eficaz no diagnóstico das arboviroses. Ela é capaz de diferenciar os vírus DENV, ZIKV e CHIKV, com baixa ocorrência de reações cruzadas e baixa

reação inespecífica. Além disso, a técnica é capaz de identificar o patógeno mesmo em baixa viremia, o que é importante para o diagnóstico precoce da doença. O diagnóstico é rápido, sensível e específico, tornando-a uma ferramenta diagnóstica de alta confiabilidade. Porém, seu uso é restrito ao período de viremia da infecção, o que restringe o diagnóstico das arboviroses entre 3 a 5 dias pós início dos sintomas.

- **Capítulo 4** – Validação de Ensaio Imunoenzimático Estruturado para a Detecção de Anticorpos IgG de Zika vírus

- O *cut-off* (Co) foi determinado, como 0,198.
- A Linearidade e a Exatidão do kit foi comprovada.
- A Sensibilidade Analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 97,8% ajustado.
- A Especificidade Analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 100%. Não houve reação cruzada com os anticorpos anti-DENV em nenhuma das amostras analisadas.
- A Repetitividade do ensaio foi comprovada, demonstrando a precisão intra-ensaio do *kit*.
- Foi comprovada a conformidade do produto, com as especificações do usuário, através dos testes estatísticos que comprovam a Acurácia e Eficácia do produto.
- Foi comprovado um excelente índice Kappa do produto, após comparação de resultados pela metodologia *gold standard* PCR em tempo real com amostras de soro do paciente.
- Foi comprovado que o produto não sofre o efeito prózona, comparando o uso do produto com amostras coletadas em papel filtro e com o soro do paciente.

- **Capítulo 5** - Relato de Caso de Síndrome de Guillain-Barrè

O paciente pode ter desenvolvido a GBS em decorrência da infecção por Zika vírus. A literatura mostra que nem todas as pessoas que são infectadas pelo ZIKV desenvolvem altos títulos de anticorpos no sangue e em alguns casos, ele pode até ser negativo. Os sintomas clínicos apresentados pelo paciente, à época da infecção, foram determinantes para o diagnóstico da infecção. O resultado indeterminado não exclui a infecção por ZIKV. A baixa viremia do vírus, pode ser um dos motivos de baixa concentração de anticorpos no sangue.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O DIAGNÓSTICO DO ZIKA VÍRUS

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ENCICLOPÉDIA BIOSFERA

QUALIS CAPES B3

ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O DIAGNÓSTICO DO ZIKA VÍRUS

Christiane Oliveira Lima Licínio¹, Flávio Monteiro Ayres²

1. Bacharel em Biomedicina e discente no Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pela Universidade Estadual de Goiás, Goiânia-GO
chrislima28@hotmail.com

2. Doutor em Controle de Funções Biológicas e docente do curso de Mestrado Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde pela Universidade Estadual de Goiás, Goiânia-GO

Recebido em: 22/09/2018 – Aprovado em: 23/11/2018 – Publicado em: 03/12/2018
DOI: 10.18677/EnciBio_2018B93

RESUMO

O Zika vírus é um RNA vírus envelopado, em sentido positivo e de fita simples. Pertence ao gênero *Flavivirus*, assim como a Dengue e a Febre Amarela, sendo também classificado como arbovírus devido à transmissão via mosquitos do gênero *Aedes*. São conhecidas duas linhagens do vírus, a linhagem africana e a linhagem asiática. A doença ficou bastante conhecida depois do surto brasileiro em 2015. Até essa data, apenas dois outros surtos eram conhecidos: em 2007 na ilha Yap e em 2013 na Polinésia Francesa. As consequências mais graves da infecção pelo Zika vírus são a Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome Congênita da Zika, que causou vários casos de microcefalia em neonatos no surto brasileiro. A linhagem encontrada neste surto é a asiática e provavelmente chegou ao país através de imigrantes ilegais e/ou soldados em missão de paz, ambos vindos do Haiti. O diagnóstico da doença é realizado pelos métodos tradicionais de laboratório clínico, como a RT-PCR, PCR em tempo real, os métodos sorológicos e PRTN (Teste de neutralização por redução de placa). As reações cruzadas com os demais *Flavivirus* é bastante comum, devido à semelhança genética entre os vírus, principalmente com o vírus da Dengue. A RT-PCR, PCR em tempo real e PRTN são realizados durante a fase aguda da doença. Os testes sorológicos são realizados tanto na fase aguda (anticorpos do tipo IgM) quanto na fase de convalescência (anticorpo do tipo IgG).

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico Zika, Microcefalia, Síndrome Guillain-Barré, Testes sorológicos, Zika vírus.

RELEVANT ASPECTS OF ZIKA VIRUS DIAGNOSIS

ABSTRACT

The Zika virus is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus. It belongs to the genus *Flavivirus*, as well as Dengue and Yellow Fever, being also classified as arbovirus due to the transmission via mosquitoes of the genus *Aedes*. Two lineages of the virus are known, the African lineage and the Asian lineage. The disease became well known after the Brazilian outbreak in 2015. Until that date, only two other outbreaks were known: in 2007 on Yap Island and in 2013 in French Polynesia. The most serious consequences of the Zika virus infection are Guillain-Barré

Syndrome and Zika Congenital Syndrome, which caused several cases of microcephaly in neonates in the Brazilian outbreak. The lineage found in this outbreak is Asian and probably arrived in the country through illegal immigrants and / or soldiers on a peace mission, both from Haiti. The diagnosis of the disease is performed by traditional clinical laboratory methods, such as RT-PCR, real-time PCR, serological methods and PRTN (Plaque-reduction Neutralization Test). Cross-reaction with other Flaviviruses are quite common, due to the genetic similarity between viruses, especially with the Dengue virus. RT-PCR, real-time PCR and PRTN are performed during the acute phase of the disease. Serological tests are performed both in the acute phase (IgM type antibodies) and in the convalescent phase (IgG type antibody).

KEYWORDS: Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome, Serological Tests, Zika diagnostics, Zika virus.

INTRODUÇÃO

A grande maioria da literatura científica sobre o Zika Vírus é escassa sobre a disseminação anterior a 2014. Há relatos de um surto na ilha Yap na Micronésia em 2007 e outro na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014. Após o aparecimento de casos no Brasil, em 2015, seguidos de relatos de nascimento de crianças com microcefalia em decorrência da contaminação da mãe por Zika Vírus, houve um crescimento significativo de produção científica a respeito desta doença (CALVET et al., 2016).

A epidemia de Zika se alastrou rapidamente pelo Brasil e por mais 50 países no continente americano. Uma doença exantemática não reconhecida foi relatada em dezembro de 2014 no Brasil, mas a confirmação por diagnóstico laboratorial de que se tratava do Zika Vírus, ocorreu a partir de maio de 2015. O vírus se espalhou por toda a região nordeste do país, principalmente nos estados de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Bahia. Outros estados também relataram ocorrências, com algumas exceções ao Sul, onde o clima não é favorável ao vetor, e estados de pouca densidade ao Norte (LOWE et al., 2018).

Neste artigo é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a infecção por Zika Vírus, enfatizando as particularidades do vírus, a infecção pelo vírus e as metodologias de diagnóstico. O banco de dados Pubmed foi utilizado para a pesquisa de artigos científicos de livre acesso, em língua inglesa. O período de publicação entre 2015 e 2018 foi delimitado, com o intuito de selecionar os mais atuais e relevantes artigos sobre o tema, visto se tratar de assunto mais disseminado a partir de 2015. DECS e MESH foram usados para encontrar os descritores “Zika Virus” ou “microcephaly” ou “Guillain-Barré syndrome” ou “serologicals tests” ou “Zika diagnostics”. As publicações foram selecionadas pelo contexto como tratavam o tema, sendo excluídos os artigos que não traziam informações sobre diagnóstico. Foram incluídos artigos que tratavam das particularidades do vírus e da infecção.

PARTICULARIDADES DO ZIKA VÍRUS

O Zika Vírus foi descoberto em 1947, a partir de macacos da espécie *Rhesus* provenientes da Floresta Zika, em Uganda, quando pesquisadores estudavam sobre a Febre Amarela. Neste estudo, foi identificada a presença do vírus em mosquitos do gênero *Aedes*, coletados na mesma floresta. O Zika Vírus pertence ao gênero *Flavivirus* assim como Dengue Vírus (DENV) e Febre Amarela (YFV). Também foi

classificado como sendo um arbovírus (*arthropod-borne vírus*), que são os vírus transmitidos aos humanos via artrópodes hematófagos, como o mosquito (MUSSO; GUBLER, 2016).

Os *Flavivirus* são RNA vírus envelopados, em sentido positivo, de fita simples (FOCOSI et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016). Ao contaminar a célula hospedeira, o RNA viral é traduzido em um polipeptídeo no citoplasma celular, sendo posteriormente processado pelas proteases do hospedeiro em três proteínas estruturais - envelope, capsídeo e precursor de membrana - e em sete proteínas não estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 – (Figura 1) (FOCOSI et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; RASTOGI et al., 2016; SHANKAR et al., 2017).

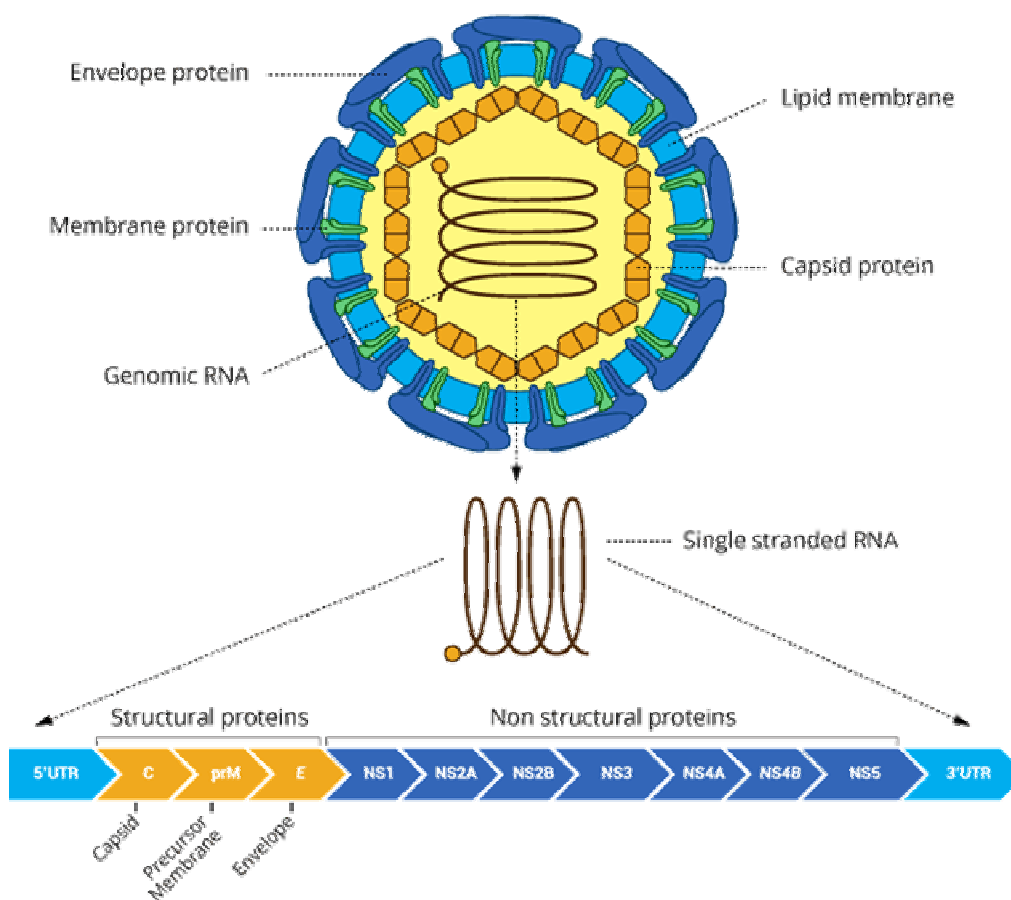


FIGURA 1 – Estrutura detalhada do Zika Vírus

Fonte: <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/inspiration/zika-perspectives-responses/>

A proteína NS1 é responsável pela replicação viral e é diretamente ligada à indução do sistema imune. Algumas regiões da proteína NS1 são idênticas entre os *Flavivirus*, o que causa a maioria das reações cruzadas nos ensaios que utilizam essa proteína como antígeno (RASTOGI et al., 2016). As reações cruzadas são entre os ZIKV, Dengue Vírus, Febre Amarela, West Nilo Vírus ou Vírus da Encefalite Japonesa, principalmente com o DENV, são devido às suas semelhanças filogenéticas (Figura 2) (MUSSO; GUBLER, 2016).

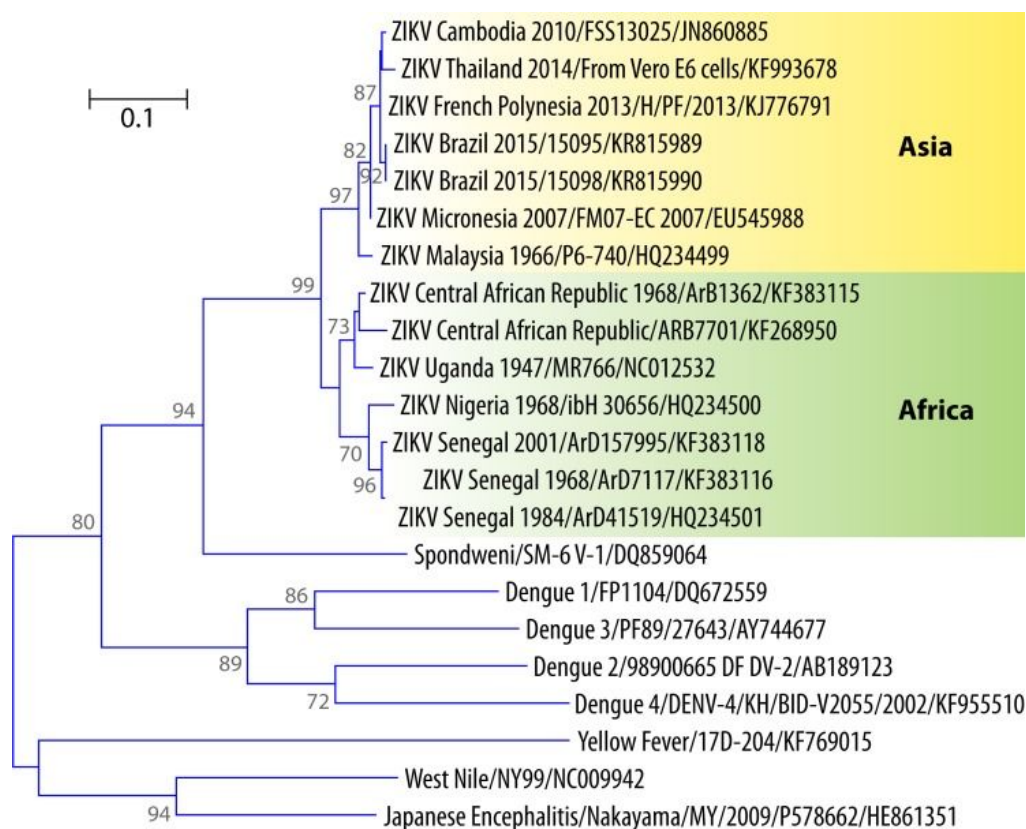


FIGURA 2 - Árvore Filogenética do Zika Vírus

Fonte: Musso (2016)

Três genótipos de Zika Vírus são conhecidos – Oeste Africano, Leste Africano e Asiático – derivados de duas linhagens – Africana e Asiática (FOCOSI et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; LEE et al., 2017; LOWE et al., 2018), sendo que essa distinção entre os três genótipos foi esclarecida após a completa descrição da região codificante ligado à proteína NS5 (MUSSO; GUBLER, 2016). O genoma da linhagem africana (ZIKV MR 766) foi decifrado em 2007, contudo o genoma da linhagem asiática também já está disponível em bancos de dados *on line*. Com uso de recursos computadorizados, as duas linhagens foram comparadas e a semelhança entre elas é de 88,9% (MUSSO; GUBLER, 2016).

A região próxima ao glicano Asn154 da glicoproteína E, responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira, é a parte estrutural do ZIKV que mais se distancia do DENV. Tal glicano é citado como sendo o responsável pela neurovirulência em cepas de vírus West Nilo. Em laboratório, ratos infectados com cepas sem esse glicano apresentaram baixa neurovirulência (BOEUF et al., 2016).

A princípio, três teorias sobre a introdução do Zika Vírus no Brasil foram formuladas:

- a) a primeira é de que o vírus foi introduzido durante a Copa do Mundo de 2014;
- b) a segunda é de que ocorreu durante um evento de Canoagem em 2014 no Rio de Janeiro, em que um atleta oriundo da Ásia estivesse com a viremia;
- c) a última hipótese seria de que a introdução ocorreu em 2013, nos jogos da Copa das Confederações (CALVET et al., 2016).

Um estudo filogenético realizado pela Fiocruz Pernambuco, com 4.035 amostras de genomas dos vírus Zika, Dengue e Chikungunya, evidenciou que a introdução do Zika Vírus não ocorreu pelas três hipóteses acima, e sim por cepas da América Central, especificamente do Haiti. Sendo assim, a introdução do vírus em solo brasileiro teria ocorrido por imigrantes ilegais e por militares que atuaram em missões no Haiti. (CAMPOS et al., 2018).

A linhagem encontrada no surto brasileiro de 2015 é a asiática, sendo 99% compatível ao vírus circulante na Polinésia Francesa em 2013 (MUSSO; GUBLER, 2016; SHANKAR et al., 2017; LOWE et al., 2018). Esta possui grande virulência e foi responsável pelo surto mais negativo, em relação às consequências da infecção. A hipótese a esse fato é de que, pela grande incidência do vírus nos surtos brasileiro (acima de 1.000.000 casos) e na Polinésia Francesa (acima de 30.000 casos), a frequência da Síndrome de Guillain-Barrè (em ambos os surtos) e de microcefalia (surto brasileiro) foi mais evidente (FREIRE et al., 2015; CALVET et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; LOWE et al., 2018). Sendo assim, em surtos pequenos como nas Ilhas Cook em março de 2014, onde foram relatados 905 casos, não se excluiu o fato da cepa não ser capaz de provocar as síndromes, apenas não houve casos em número suficiente para uma maior manifestação (MUSSO; GUBLER, 2016).

Não há relatos de grandes surtos com a linhagem africana, sendo os números de casos na África inferiores ao restante do planeta e sem relatos de agravamento da doença, como o ocorrido no Brasil (FREIRE et al., 2015; MUSSO; GUBLER, 2016). Outra hipótese sobre a virulência distinta entre as cepas de ZIKV é de que a viremia em humanos é menor quando infectados pela linhagem africana, em decorrência do pouco sucesso desta linhagem nos mosquitos *A. aegypti* (FREIRE et al., 2015).

INFECÇÃO PELO ZIKA VÍRUS

Inicialmente, a contaminação pelo vírus pode não ter sido notada pelos sintomas serem bastante semelhantes aos causados pela Dengue. O surto de Zika Vírus chamou a atenção das autoridades sanitárias quando houve a associação entre a infecção pelo vírus e os casos de microcefalia em neonatos (Síndrome Congênita da Zika) e as desordens neurológicas (Síndrome de Guillain-Barrè) (CALVET et al., 2016).

Os principais sintomas clínicos da doença são: erupção macular ou maculopapular com presença de prurido, dor de cabeça, artralgia, mialgia, prostração, conjuntivite não-purulenta, e pode ou não estar associada a febre baixa. Os casos assintomáticos contabilizam 80%, o que dificulta um levantamento epidemiológico satisfatório em relação à doença. Os relatos de morte em decorrência da Zika são escassos, sendo três casos relatados até maio de 2016 no Brasil (CALVET et al., 2016). As duas condições severas em decorrência da infecção pelo ZIKV envolvem danos neurológicos:

- a) Síndrome de Guillain-Barrè (GBS) - os nervos periféricos do paciente são atacados pelo seu sistema imune;
- b) Síndrome Congênita do Zika (CSZ) - vários espectros de má formação neurológica durante o desenvolvimento fetal, ainda em avaliação das várias consequências e sequelas ao longo do tempo. Primeira evidência do surto foi a microcefalia, caracterizada pela diminuição do perímetro cefálico (LOWE et al., 2018).

Os sintomas clínicos e os achados laboratoriais mais simples, trombocitopenia e leucopenia no hemograma ou alterações nas transaminases hepáticas, são típicos de várias outras doenças causadas por arbovírus, principalmente Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV). Atualmente, nove doenças com essas características são circulantes no Brasil: Dengue, Chikungunya, Febre Amarela, Vírus da Encefalite Saint Louis, Mayaro, Oropouche, Vírus West Nilo, sendo essa última raríssima com apenas um caso relatado no país (MUSSO; GUBLER, 2016; FELIX et al., 2017). De todas essas doenças, Febre Amarela, DENV e CHIKV são as mais relevantes quanto ao diagnóstico, pelo grande número de casos das três doenças em território brasileiro, sendo todas, incluindo o ZIKV, co-circulantes e transmitidas pelo mesmo vetor, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (MUSSO; GUBLER, 2016; MAGALHÃES et al., 2017; LOWE et al., 2018).

Uma pesquisa realizada em Recife, entre 2015 e 2016, logo após a epidemia de Zika na região, identificou que 60% dos pacientes que apresentavam sintomas semelhantes à Dengue estavam, na verdade, com infecções de Zika ou Chikungunya (MAGALHÃES et al., 2017). Apesar de que um grande número de casos de Dengue foi notificado nessa área em 2015, os ensaios moleculares e sorológicos realizados comprovaram que a incidência dessa doença caiu com o surgimento dos casos de Zika e Chikungunya no mesmo período. Com a diminuição dos casos de Zika em setembro de 2015, o número de casos de Chikungunya começou a subir. Tal conclusão indica que o diagnóstico de arboviroses utilizando a clínica do paciente nem sempre reflete a real causa da infecção, visto que ao menos três doenças estão circulantes na mesma região. Ao diagnosticar a doença com auxílio dos ensaios laboratoriais, pode-se inferir em reações cruzadas entre os *Flavivirus* (MAGALHÃES et al., 2017).

Não há um consenso sobre a quantidade de pessoas contaminadas pelo ZIKV. A Organização Mundial de Saúde diz que o padrão-ouro para estimar a incidência cumulativa de soroprevalência numa população, é o desenvolvimento de um estudo longitudinal das amostras de indivíduos em fase aguda e convalescência da infecção, o que durante um surto é muito difícil de acompanhar, principalmente em estágios iniciais. Com isso o número exato de pessoas contaminadas pelo Zika Vírus é desconhecido. Outro método é um estudo transversal de pacientes antes do surto e depois do surto e prever a incidência cumulativa. Esse tipo de estudo foi usado no caso do surto de H1N1 (WHO, 2016).

Dentre as arboviroses, somente a Zika tem a transmissão também via sexual e vertical, de mãe para o feto (LOWE et al., 2018). A transmissão vertical foi verificada através da barreira placentária, durante o parto com o contato do bebê e os fluidos maternos, e durante a amamentação, visto que o vírus foi encontrado no leite materno (SHANKAR et al., 2017). Após a descoberta da via sexual da transmissão viral, houve grande disseminação de casais que passaram a evitar a concepção neste período, receosos de serem atingidos pela infecção. Assim, o CDC (*Centre of Disease Control and Prevention* – Agência de Saúde Norte Americana) declarou que os casais que haviam sofrido com uma infecção de Zika vírus, deveriam esperar ao menos 180 dias para a concepção, já que foi encontrado material genético do vírus em sêmen depois de 188 dias de infecção e em secreção vaginal após oito semanas (LOWE et al., 2018).

Pesquisadores encontraram indícios de que a mutação sofrida pelo ZIKV na natureza contribuiu para o aumento da patogenicidade do vírus, tornando-o apto a uma disseminação explosiva. As proteínas NS1, NS3 e NS5 são prioritariamente

mais ligadas ao reconhecimento dos *Flavivirus* após a infecção. Porém, após uma infecção por DENV, a proteína NS5 promove uma maior ativação das células T no hospedeiro. Tal fato comprova uma grande reação cruzada entre o vírus da Dengue e o da Zika (DELGADO et al., 2018).

Há relatos sobre a imunidade cruzada entre o ZIKV e outras infecções por *Flavivirus*, principalmente o DENV. A rápida disseminação do ZIKV geograficamente em alguns meses, em contraponto ao longo tempo que o DENV levou para a mesma disseminação, provavelmente é devido a esse fato (LOWE et al., 2018). As proteínas NS1 dos vírus, responsáveis pela invasão dos vírus nos linfócitos T CD4 e CD8, além de serem geneticamente semelhantes, induzem o reconhecimento dos mesmos epítomos nas células B. Tal fato explicaria o agravamento de uma infecção secundária por ZIKV em pessoas previamente infectadas por DENV (FREIRE et al., 2015; DELGADO et al., 2018). O aprimoramento dependente de anticorpos (ADE – *antibody-dependent enhancement*) do ZIKV como infecção secundária, seria semelhante ao que acontece nas infecções pelos diversos sorotipos de DENV (DELGADO et al., 2018). A infecção prévia por DENV influencia na qualidade dos anticorpos produzidos ao ZIKV. Os anticorpos policlonais do ZIKV como infecção primária são altamente específicos, o que causa baixa reação cruzada com outros *Flavivirus* (ROTH et al., 2018).

A qualidade de anticorpos anti-DENV, secundários a uma infecção prévia por ZIKV, não é recíproco. Esse fato foi evidenciado após o surto de ZIKV em 2015, em que os números de infectados por DENV sofreram uma queda. Em um estudo realizado entre 2009 e 2017, a proporção de soropositividade em amostras testadas para DENV caiu de 37% para 8% (RIBEIRO et al., 2018). Em camundongos imunodeficientes, a prévia imunização pelo ZIKV fez com que a infecção por DENV fosse ainda mais severa, indicando que muito ainda deve ser avaliado para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV (ROTH et al., 2018).

A prevenção à doença é feita como as demais arboviroses, que não possuem vacina. A principal medida é o controle do mosquito vetor (MUSSO; GUBLER, 2016). A maioria das medidas preventivas são também medidas de saneamento básico. A aplicação de inseticidas e larvicidas não têm se mostrado eficaz. Uma outra medida, que se mostra promissora, mas ainda sem resultados visíveis, são os mosquitos geneticamente alterados. Alguns são infectados por uma bactéria (*Wolbachia*) e se tornam estéreis (LOWE et al., 2018).

A vacina contra o ZIKV está em desenvolvimento. São várias linhas de estudo em andamento ao mesmo tempo, a maioria focando a proteína do envelope do vírus. Recentemente, alguns pesquisadores focaram o desenvolvimento da vacina através da proteína NS1 e outros tentam desenvolver uma semelhante à vacina da febre amarela, com o vírus atenuado (KWEK et al., 2018).

DIAGNÓSTICOS DO ZIKA VÍRUS

Devido aos sintomas da doença causados pelo ZIKV serem inespecíficos, facilmente confundidos com os de outras arboviroses, o diagnóstico clínico diferenciando das doenças é difícil. Com isso, o diagnóstico laboratorial diferencial é necessário, principalmente em áreas endêmicas ou de circulação de vários arbovírus ao mesmo tempo (SHANKAR et al., 2017). A presença do vírus em várias matrizes amostrais, como soro, plasma, urina, saliva, fluido amniótico, leite materno, sêmen e secreção vaginal, facilita o desempenho de exames laboratoriais (CALVET et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial da Zika é feito com as metodologias usadas e já usuais para outras arboviroses. O genoma viral é detectado por metodologias moleculares e os anticorpos, tanto na fase aguda (IgM) quanto na convalescência (IgG), por métodos sorológicos (CALVET et al., 2016; WAGGONER; PINSKY, 2016; SHANKAR et al., 2017).

O diagnóstico molecular é feito pela detecção do RNA viral nas amostras humanas, utilizando a técnica de PCR-RT (reação de cadeia polimerase – transcriptase reversa) em duas etapas: i) transcrição reversa do RNA em DNA de fita simples (cDNA); ii) conversão em DNA de fita dupla e sua amplificação (MUSSO; GUBLER, 2016). Comercialmente, vários *kits* foram desenvolvidos com essa metodologia, focando a região codificante da proteína NS5 no gene dos *Flavivirus*, ou as regiões codificantes da proteína E do envelope viral e da proteína NS3 (FOCOSI et al., 2016).

A PCR em tempo real, uma variação do RT-PCR, aprimorou a técnica ao ser realizado em apenas uma etapa e incluiu uma sonda fluorescente. Além disso, há uma variação da PCR em tempo real em que é possível quantificar o genoma viral nos fluidos orgânicos. Essa variação metodológica de amplificação de ácidos nucléicos é chamada de qRT-PCR (MUSSO; GUBLER, 2016). Vários estudos realizados com a PCR em tempo real demonstraram que essa técnica é mais sensível e específica que a RT-PCR e produz menor quantidade de falsos-positivos (SINGH et al., 2018).

Ambas as técnicas se mostraram bem sucedidas na detecção do genoma viral do ZIKV quando realizadas em amostras da fase aguda da doença. Apesar de ser uma forma definitiva de diagnóstico, as técnicas moleculares se limitam à primeira semana de sintomas da doença (CALVET et al., 2016). No sangue, o RNA viral se mostra presente por um breve período de tempo – de três a cinco dias após o início dos sintomas clínicos. Na urina, o RNA viral permanece por mais de 10 dias e no sêmen por mais de dois meses (FOCOSI et al., 2016).

A técnica molecular é bastante sensível, porém pouco específica, já que os *primers* utilizados são os mesmos para os diversos *Flavivirus* circulantes, e isso causa a ocorrência de resultados falso-negativos (MUSSO; GUBLER, 2016). Baixa viremia também pode causar a ocorrência de falso-negativos, o que pode acontecer com frequência devido ao curto período de presença do vírus no sangue. Outro ponto negativo ao uso desta técnica são os altos custos com equipamentos, reagentes, pessoal especializado e o tempo consumido para o ensaio, o que dificulta a disseminação em vários laboratórios (CALVET et al., 2016).

O diagnóstico sorológico tem o diferencial em relação ao diagnóstico molecular por ser possível a detecção da doença também no período de convalescência. O marcador de infecção aguda (IgM) pode ser encontrado no sangue contaminado entre três a cinco dias após o início dos sintomas, se estendendo por até dois meses. A soroconversão é a etapa mais confiável de detecção dos anticorpos e se inicia após o sétimo dia após início dos sintomas (CALVET et al., 2016). O marcador de infecção IgG é detectado a partir da soroconversão e é classificado como uma imunidade definitiva, pois sua produção pelo organismo é de longa duração. A produção dos anticorpos IgG é mantida em níveis detectáveis por pelo menos três meses. Em casos em que a investigação é feita após o fim da fase aguda da infecção, apenas os anticorpos do tipo IgG serão encontrados (NICOLINI et al., 2017). A Figura 3 demonstra, ao longo da infecção por ZIKV, as oportunidades de diagnóstico molecular e sorológico.

O problema relacionado aos testes sorológicos é o alto índice de reações cruzadas com as doenças causadas por outras arboviroses, principalmente pelo DENV. A reação cruzada é ainda mais intensa nas áreas endêmicas. Os resultados dos testes sorológicos devem ser avaliados com muito cuidado, com intuito de evitar os resultados falso-positivos. Mesmo em pacientes que não tiveram contato com infecções por arbovírus, mas foram vacinados contra febre amarela, a reação cruzada nos testes sorológicos pode acontecer (CALVET et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016).

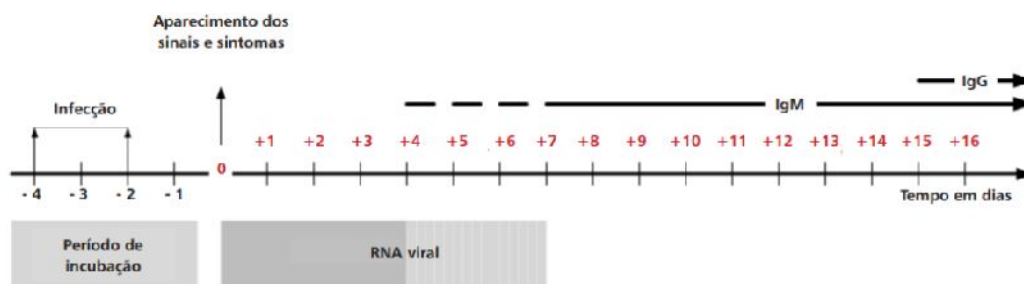
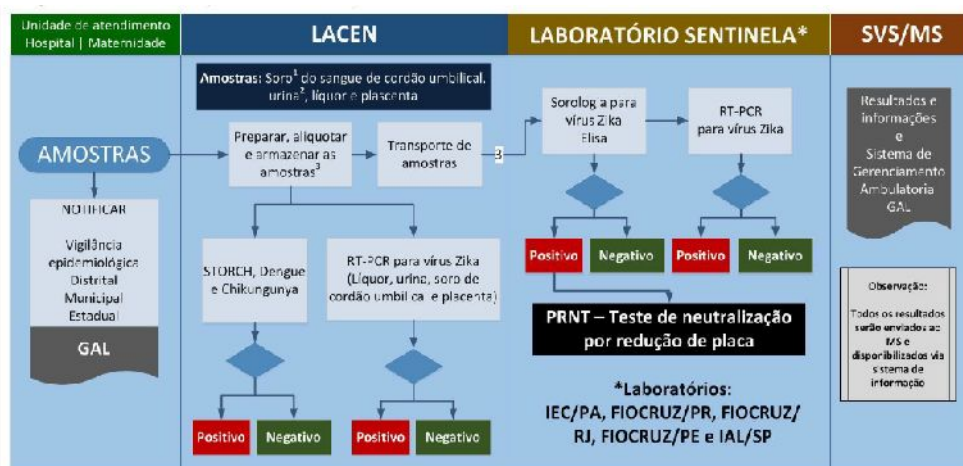


FIGURA 3 – Oportunidade de detecção do Zika vírus, segundo a metodologia laboratorial.
Fonte: SAÚDE (2016) <http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>, acesso em 21/09/2018.

O aparecimento de anticorpos IgG em infecções secundárias por *Flavivirus* é mais rápido do que em infecções primárias. Tais anticorpos surgem quase que imediatamente ao surgimento dos anticorpos IgM. Esse fato acontece principalmente quando a infecção primária foi por DENV e a secundária é por ZIKV (NICOLINI et al., 2017). Com isso, as agências de saúde dos países envolvidos nos surtos de ZIKV e/ou DENV, criaram algoritmos para o diagnóstico dessas doenças, nos casos em que haja a infecção secundária. Apenas o diagnóstico sorológico pode não ser suficiente para a identificação do patógeno, indicando a necessidade de realização de testes em outra metodologia para a diferenciação (CALVET et al., 2016; WAGGONER; PINSKY, 2016). A Figura 4 demonstra o algoritmo usado pelo Ministério da Saúde brasileiro.



1. As amostras de soro devem ser submetidas às análises para Dengue, Chikungunya e STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes)
2. As amostras de urina serão coletadas apenas em gestantes para realização de diagnóstico por RT-PCR
3. LACEN que não realizar RT-PCR para vírus Zika, encaminhar ao Laboratório Sentinela de sua área.

FIGURA 4 - Algoritmo laboratorial para amostras suspeitas de microcefalia relacionada ao Zika Vírus – Rede Pública de Saúde

Fonte: SAÚDE (2016) <http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>, acesso em 21/09/2018.

A técnica PRTN (Teste de neutralização por redução de placa) é o padrão-ouro para a diferenciação da reação cruzada entre os anticorpos produzidos em infecções por *Flavivirus* (CALVET et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016). Esse teste é geralmente usado como secundário ao diagnóstico molecular e testes de ELISA (sorológico) e testa a capacidade dos anticorpos da amostra em neutralizar o vírus suspeito da infecção. A amostra é testada em diluições seriadas em conjunto com uma suspensão do vírus (ZIKV ou DENV ou febre amarela, por exemplo) e a mistura é adicionada a uma cultura de células. Após um período de sete dias de incubação, são contadas as unidades formadoras de placas (PFU) e a titulação é determinada pela diluição realizada (NICOLINI et al., 2017).

Apesar de ser um método muito sensível e muito específico, mais do que a metodologia ELISA, a realização é demorada, requer pessoal e dependências físicas especializadas, de alto custo. Com isso, a realização destes testes é restrita (CALVET et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; NICOLINI et al., 2017). A SBPC/ML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial) desenvolveu um algoritmo a ser usado pelos laboratórios da rede particular, a fim de auxiliar o diagnóstico laboratorial para o ZIKV. A Figura 5 demonstra esse algoritmo (SBPC/ML, 2016).

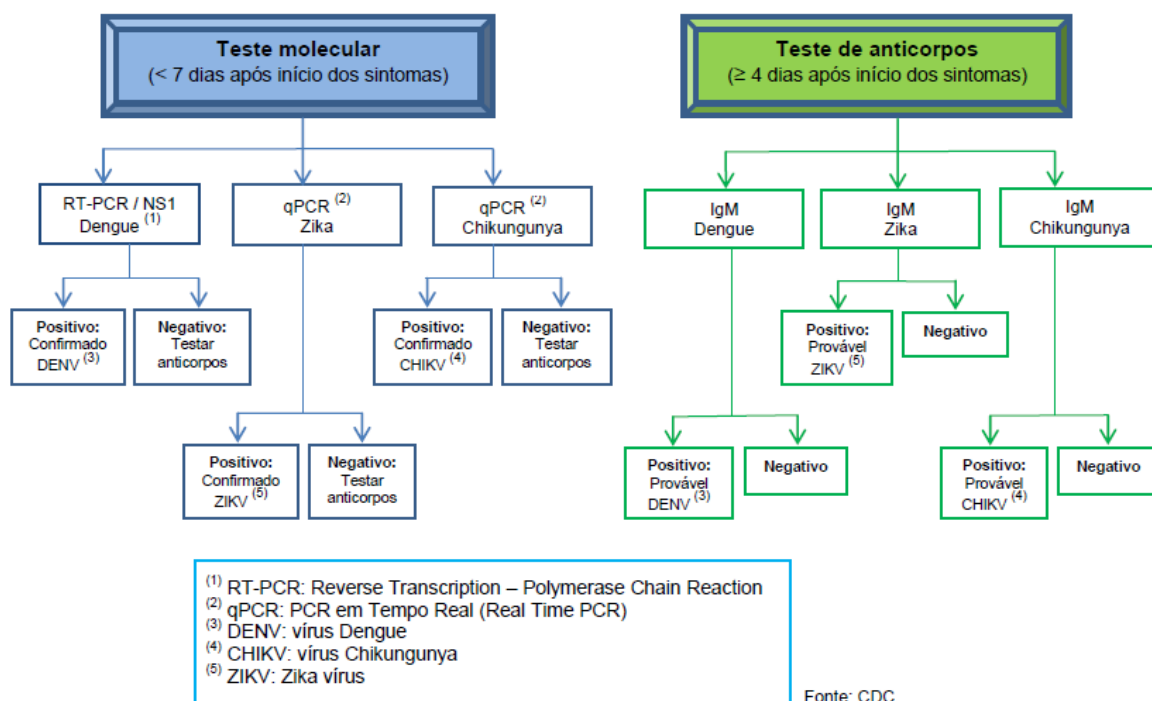


FIGURA 5 - Algoritmo de testes para detecção de arbovírus em casos de suspeita de Zika, Chikungunya ou Dengue – Rede Particular de Saúde.
Fonte: SBPC/ML (2016)

A detecção de anticorpos IgG é muito importante nos casos de mulheres grávidas com suspeita de infecção pelo ZIKV ou em momentos de surto. Mesmo em casos assintomáticos ou em que o RNA viral não foi encontrado, a presença destes anticorpos no sangue materno pode indicar uma infecção congênita e, possivelmente casos de microcefalia (SINGH et al., 2018). Além disso, devido a baixa viremia em vários casos da infecção, inviabilizando o diagnóstico molecular, a sorologia é a melhor opção ao diagnóstico. A sorologia é um método barato,

confiável e robusto, além de permitir a vigilância epidemiológica e ser de fácil manuseio durante surtos (CALVET et al., 2016; MUSSO; GUBLER, 2016; SINGH et al., 2018). A tabela 1 resume as vantagens e desvantagens das metodologias para diagnóstico do ZIKV.

QUADRO 1 - Vantagens e Desvantagens das Metodologias de Diagnóstico para Zika vírus

METODOLOGIA	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Ensaio sorológicos	Fácil desempenho Custo acessível dos kits Automação acessível Baixo tempo para execução Alta sensibilidade	Reações cruzadas Poucos kits disponíveis Falsos-positivo
RT-PCR	Alta especificidade Alta precisão	Reações cruzadas Falsos-negativos Alto custo kits Alto custo automação Restrito à 1ª semana
PCR em tempo real	Alta especificidade Alta precisão Quantificação viral Rapidez na execução Menos falsos-negativo	Reações cruzadas Alto custo kits Alto custo automação Restrito à 1ª semana
PRTN	Alta especificidade Alta sensibilidade Diferenciação entre <i>Flavivirus</i>	Alto custo Pessoal especializado Infraestrutura especializada Longo tempo execução

Fonte: LICÍNIO (2018)

A maioria dos produtos para diagnóstico sorológico disponíveis no mercado mundial usam antígenos NS1 (non-structure protein 1), NS5 e proteína E do vírus Zika, em busca de aumentar a especificidade dos kits. Com isso, o índice de falso-positivos seria diminuído (NICOLINI et al., 2017). Destes, as proteínas do envelope viral são as que mais causam reação cruzada, principalmente com o DENV, o que torna o produto muito sensível, porém pouco específico. Os que utilizam a proteína NS1 como antígeno possuem a sensibilidade e especificidade adequadas, com baixo índice de reação cruzada (LUSTIG et al., 2017).

A proteína NS1 é encontrada circulante no sangue independente se é uma infecção primária ou secundária (RASTOGI et al., 2016). Os testes sorológicos que usam a proteína NS1 recombinante possuem menor índice de reações cruzadas, principalmente com o DENV (SINGH et al., 2018).

A proteína NS1 é encontrada circulante no sangue desde o primeiro dia de infecção e dura até o início da soroconversão IgM para IgG. A identificação de fragmentos não comuns aos demais *Flavivirus* é uma forma de diminuir a reação cruzada entre os demais vírus, vez que identificará de forma específica os anticorpos produzidos pelo organismo após a infecção pelo Zika Vírus, e de forma

precoce, já que a proteína se expressa no início da infecção (FERREIRA et al., 2016).

A identificação de epítomos não comuns aos demais *Flavivirus* é uma forma de diminuir a reação cruzada entre os demais vírus. Vários pesquisadores estão em esforços para alcançar tais epítomos, e concentram-se na proteína E para esse fim (NICOLINI et al., 2017). Testes de metodologia MIA (ensaios multiplex de microesferas) estão sendo desenvolvidos, com a inclusão dos antígenos da proteína E, NS1 e NS5. Isso aumenta a sensibilidade e a especificidade do teste (SINGH et al., 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há vários impactos sociais e econômicos em decorrência do surto de Zika vírus de 2015 no Brasil. O primeiro deles é a grande quantidade de crianças com microcefalia ou outros problemas de nascimento, devido à Síndrome Congênita da Zika, trazendo impactos ao desenvolvimento da criança, envolvendo a sua família e toda a comunidade ao seu redor, uma vez que as limitações são diversas. O surto de ZIKV já não é mais uma emergência em saúde pública no Brasil. Porém, as sequelas deste primeiro evento ainda ressoarão por um longo período, devido aos impactos na sociedade e nas famílias atingidas pelas formas mais severas de consequências à infecção.

O controle da doença ainda passa pelo controle do vetor, o que tem se mostrado ineficiente, já que o mesmo vetor transmite a DENV, que ano após ano ressurgem na estação chuvosa no país. Isto pode estar intimamente atrelado ao fato de que a grande maioria dos diagnósticos serem feitos baseando-se apenas na clínica do infectado, não havendo um diagnóstico diferencial efetivo. Isso dificulta as autoridades sanitárias a instituir programas de prevenção mais eficientes, de previsão de ressurgimento de novos surtos e epidemias.

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é demasiadamente importante, mesmo em momentos em que há controle de surtos e menos casos de infecção detectados. Isso se deve ao grande impacto sócio-econômico causado pelos casos de microcefalia em neonatos, além da suma necessidade de diferenciação entre as demais arbovírus. As reações cruzadas entre as arbovírus ainda é um empecilho ao diagnóstico preciso. Mesmo os testes de PCR-RT podem causar resultados falsos, devido à semelhança genética entre os vírus. Os ensaios sorológicos, que custam menos, possuem técnica mais simplificada e usam equipamentos mais baratos, são os testes mais acessíveis. Apesar de que existem epítomos sendo usados para minimizar a reação cruzada, ela ainda não é completamente descartada nessa metodologia. Não há vacina contra o Zika vírus e o controle da infecção é ainda uma questão de medidas de saneamento básico.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – processo número 201810267000572.

REFERÊNCIAS

BOEUF, P.; DRUMMER, H. E.; RICHARDS, J. S.; SCOLLAR, M. J. L.; BEESON, J. G. The global threat of Zika virus to pregnancy: Epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. **BMC Medicine**, v. 14, n. 1, p. 0–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12916-016-0660-0>>.

CALVET, G. A.; DOS SANTOS, F. B.; SEQUEIRA, P. C. Zika virus infection: Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459–466, 2016. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=27496713>>.

CAMPOS, T. D. L.; DURÃES-CARVALHO, R.; REZENDE, A. M. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International Journal of Genomics**, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ijg/aip/6941735/>>.

DELGADO, F.; TORRES, K.; CASTELLANOS, J.; ROMERO-SÁNCHEZ, C.; SIMON-LORIÈRE, E.; et al.,. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 480, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/9/480>>.

FELIX, A. C.; SOUZA, N. C. S.; FIGUEIREDO, W. M.; COSTA, A. A.; INENAMI, M.; 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, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmv.24789>>.

FERREIRA, L.C.S.; ALVES, R.P.S.; PEREIRA, L.S.; SANTOS, R.A. Sequência de ácido nucléico, antígeno recombinante, kits de diagnóstico, e usos dos mesmos. Depositante: Universidade de São Paulo. **BR1020160113180**, 18 may.2016, 05 dec.2017. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO2017197477A1/pt>. Acesso em: 13 mar 2018.

FOCOSI, D.; MAGGI, F.; PISTELLO, M. Zika virus: Implications for public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 227–233, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299941290_Zika_Virus_Implications_for_Public_Health>.

FREIRE, C. C. M.; IAMARINO, A.; NETO, D. F. L.; SALL, A. A.; MARINHO, P.; ZANOTTO, A. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. **bioRxiv**, v. 2015, n. August, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2015/11/25/032839>>.

KWEK, S. SEN; WATANABE, S.; CHAN, K. R.; ONG, E. Z.; TAN, H. C.; NG, W. C.; NGUYEN, et al.,; A systematic approach to the development of a safe live attenuated Zika vaccine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03337-2>>.

LEE, A. J.; BHATTACHARYA, R.; SCHEUERMANN, R. H.; PICKETT, B. E. Identification of diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-borne Flaviviruses. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0178199>>.

LOWE, R.; BARCELLOS, C.; BRASIL, P.; CRUZ, O. G.; HONÓRIO, N. A.; et al.,. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International**

Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/1/96>>.

LUSTIG, Y.; ZELENA, H.; VENTURI, G.; ESBROECK, M. Van; ROTHE, C.; PERRET, C.; et al.,. Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus- Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1894–1901, 2017. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/55/6/1894.long>>.

MAGALHAES, T.; BRAGA, C.; CORDEIRO, M. T.; OLIVEIRA, A. L. S.; CASTANHA, P. M. S.; et al.,. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006055>>.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1090, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24983096>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4036762>.

NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13036-016-0046-z>>.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>>.

RIBEIRO, G. S.; KIKUTI, M.; TAURO, L. B.; NASCIMENTO, L. C. J.; CARDOSO, C. W.; et al., ; Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 2, p. e140–e141, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30496-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30496-5)>.

ROTH, C.; DELGADO, F. G.; SIMON-LORIÈRE, E.; SAKUNTABHAI, A. Immune responses to dengue and Zika viruses—Guidance for T cell vaccine development. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/385>>.

SAÚDE, M. da. **Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações no Sistema Nervoso Central (SNC)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://combateaes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>>.

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. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/sbpcml_posicionamento_zika_virus.pdf>.

SHANKAR, A.; PATIL, A. A.; SKARIYACHAN, S. Recent perspectives on genome, transmission, clinical manifestation, diagnosis, therapeutic strategies, vaccine developments, and challenges of zika virus research. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603822/>>.

SINGH, R. K.; DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; KHANDIA, R.; et al.,. Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of zika virus: An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02677/full>>.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 860–867, 2016. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/54/4/860.long>>.

WHO. Current Zika Product Pipeline. **Who**, n. March, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/zika-rd-pipeline.pdf>>.

CAPÍTULO 2

ANTIBODY-DEPENDENT ENHANCEMENT (ADE) DE ZIKA VÍRUS CAUSADO POR INFECÇÃO PRÉVIA DE DENGUE

ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA A SER PUBLICADO

RESUMO

Os Flavivírus DENV e ZIKV são RNA vírus homólogos. Chegam a compartilhar, ao menos, 41% de semelhança na sequência de aminoácidos da proteína E, primeira a ser reconhecida pelo organismo durante a infecção. Esta semelhança cria, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, grande reação cruzada na resposta imune ao vírus. A reação cruzada, decorrente da imunidade heteróloga, poderia ser uma explicação ao aparecimento dos casos de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré, em 2015. A resposta celular ao DENV é feita pelas linfócitos T CD8+ e ao ZIKV, preferencialmente, pelas células T CD4+. Numa infecção de ZIKV, secundária a uma infecção por DENV, as células CD8+ tendem a ser ativadas primeiramente. A principal reação cruzada que pode ocorrer em infecções por DENV e ZIKV é a *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE). Esse fenômeno pode causar um asseveramento na infecção, trazendo consequências até letais, como no caso da Febre da Dengue Hemorrágica. A ADE de ZIKV para DENV está bem caracterizada *in vitro*, por ensaios em células de linhagem mielóide. *In vivo* os estudos são controversos: em ratos está caracterizada a ADE, mas não em macacos. Estudos epidemiológicos são necessários para a total caracterização do fenômeno, mas não são realizados pela falta de *kits* diagnósticos sensíveis e específicos. A ocorrência de ADE de ZIKV após infecção prévia de DENV é factível, porém ainda não totalmente esclarecida.

PALAVRAS-CHAVE: ZIKV, DENV, reação cruzada, anticorpos heterólogos

ABSTRACT

DENV and ZIKV are RNA Flaviviruses closely related. They share at least 41% similarity in the aminoacids sequence of protein E, the first recognized by the body during infection. This similarity creates, both *in vivo* and *in vitro*, a large cross reaction in the immune response to the virus. The cross reaction, resulting from heterologous immunity could be an explanation for the appearance of cases of microcephaly and Guillain-Barré syndrome, in 2015. The cellular response to DENV is made by CD8 + T lymphocytes and preferably by CD4 + T cells in ZIKV. In a ZIKV infection secondary to a DENV infection, CD8 + cells tend to be activated first. The main cross reaction that can occur in DENV and ZIKV infections is Antibody-Dependent Enhancement (ADE). This phenomenon can cause the infection to assert, bringing even lethal consequences, as in the case of Hemorrhagic Dengue Fever. ZIKV ADE for DENV is well characterized *in vitro* by assays in myeloid lineage cells. *In vivo* studies are controversial; in rats it is characterized by ADE, but not in monkeys. Epidemiological studies are necessary for the full characterization of the phenomenon, but

are not performed due to the lack of sensitive and specific diagnostic kits. The occurrence of ZIKV ADE after previous DENV infection is feasible, but not yet fully understood.

KEY-WORDS: ZIKV, DENV, cross-reaction, heterologous antibodies

INTRODUÇÃO

Zika vírus (ZIKV) e Dengue vírus (DENV) são pertencentes à família *Flaviviridae* (FOCOSI; MAGGI; PISTELLO, 2016; ST. JOHN; RATHORE, 2019). Os vírus possuem a mesma configuração estrutural e semelhança genética de ao menos 41%. A homologia faz com que haja reações cruzadas imunológicas, em pacientes já imunizados por um destes vírus, numa segunda infecção heteróloga (ROGERS et al., 2017). Tal homologia faz com que alguns autores sugiram que o ZIKV seja uma quinta espécie do DENV (DEJNIRATTISAI et al., 2016)

A preocupação com o ZIKV não é mais apenas pela infecção propriamente dita, mas pelas complicações ocorridas e que permanecem ainda sem serem totalmente esclarecidas. Além disso, novas vacinas, novas drogas e novas terapêuticas para DENV podem ser influenciadas negativamente pela presença de anticorpos contra ZIKV. Não se sabe ao certo o comportamento do sistema imune humano frente a presença da resposta imune para ambas doenças (KHANDIA et al., 2018). O comportamento da resposta humoral, pós infecção pelo ZIKV, já foi bem definida, porém a resposta celular ainda foi pouco explorada (GRIFONI et al., 2017)

A semelhança dos vírus pode causar reações diversas, desde uma atenuação da infecção secundária, por anticorpos neutralizantes, até uma viremia aumentada pela neutralização ineficaz (PRIYAMVADA et al., 2017b). A reação cruzada, a princípio, pode ser benéfica quando resulta na neutralização eficiente do novo invasor. Ao passo que, quando a reação cruzada humoral não é eficiente, pode levar ao aparecimento da amplificação mediada por anticorpos, do inglês *Antibody-Dependent Enhancement*. O ADE pode causar um asseveramento na infecção, trazendo consequências até letais, como no caso da Febre da Dengue Hemorrágica (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018a). Neste contexto, a reação cruzada entre DENV e ZIKV pode ter sido um dos responsáveis pelo aparecimento de casos de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré, principalmente, nos surtos ocorridos após 2013 (LANGERAK et al., 2019).

A presente revisão de literatura visa levantar dados atuais sobre a possível ocorrência do fenômeno de ADE de ZIKV, decorrente de infecção prévia de DENV, correlacionando o ADE como provável desencadeador dos agravos ocorridos pela infecção do ZIKV.

METODOLOGIA

Os bancos de dados Pubmed e Scielo foram utilizados para a pesquisa de artigos científicos de livre acesso, em língua inglesa. O período de publicação entre 2016 e 2019 foi delimitado, com o intuito de selecionar os mais atuais e relevantes artigos sobre o tema, visto se tratar de assunto mais disseminado a partir do surto de ZIKV no Brasil, em 2015. DECS e MESH foram usados para encontrar os descritores “Zika Virus” E “Dengue virus” E “*Antibody-Dependent Enhancement*” E “*Cros-reactivity*”. As publicações foram selecionadas pelo contexto como tratavam o tema, sendo excluídos os artigos que não traziam informações sobre ADE ou que tratavam de outros flavivírus ou arboviroses. Foram incluídos artigos que tratavam das particularidades do mecanismo de ADE e da reação cruzada entre o ZIKV e DENV.

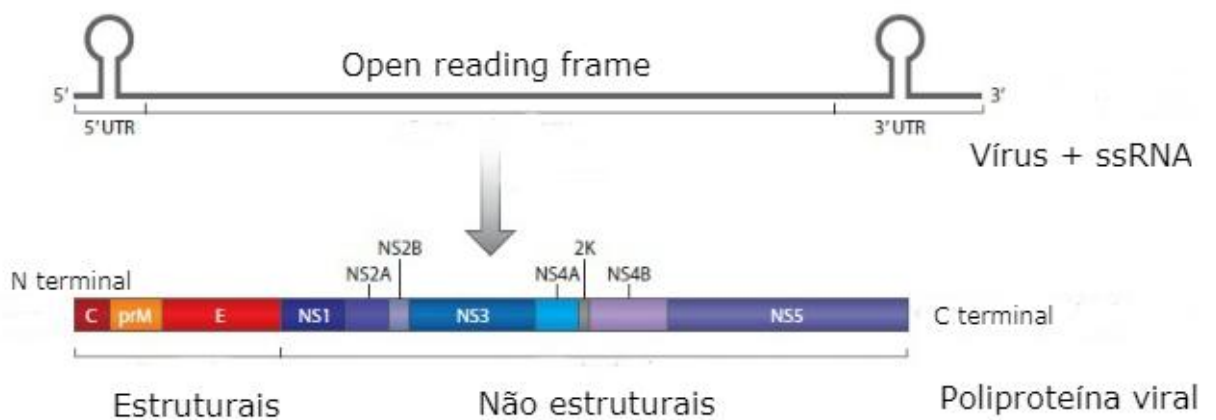
SEMELHANÇAS ENTRE ZIKV E DENV

ZIKV e DENV são espécimes pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Além deles, também pertencem ao mesmo gênero os vírus da Febre Amarela (YFV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e vírus do Oeste Nilo (WNV) (DEJNIRATTISAI et al., 2016; KEEFFE et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; LANGERAK et al., 2019). ZIKV e DENV são vírus transmitidos por picada do mosquito *Aedes aegypti*, sendo assim classificados como Arbovírus (*Arthropode-borne virus*) (LANGERAK et al., 2019). Além disso, são RNA-vírus de fita simples, sentido positivo e envelopados. O genoma possui 10,7 kb de comprimento, que codificam uma poliproteína composta por três proteínas estruturais (C-capsídeo, prM-pré-membrana e E-envelope) e sete proteínas não estruturais, conforme demonstrado na Figura 1 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KHANDIA et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; LANGERAK et al., 2019).

Os sintomas clínicos do ZIKV e DENV são muito semelhantes: febre, artralgia, mialgia e manchas vermelhas pela pele, o que dificulta o diagnóstico diferencial entre eles (DELGADO et al., 2018; KHANDIA et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018). A semelhança também é estrutural, visto que as proteínas E (envelope) e NS1 (proteína não estrutural 1) possuem entre 54,0% a 57,8% de homologia de sequência (KHANDIA et al., 2018). Alguns autores afirmam ser entre 41% a 46% de homologia na sequência de aminoácidos da proteína E, entre os dois vírus (DEJNIRATTISAI et al., 2016). Com isso, estes flavivírus estimulam o sistema imune humoral e celular do organismo humano de forma muito semelhante, causando reações cruzadas (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018a). Este fenômeno também ocorre *in vitro*, dificultando o diagnóstico laboratorial, principalmente em diagnósticos sorológicos (KHANDIA et al., 2018).

O DENV está presente pelo continente americano por mais de 20 anos, sendo a arbovirose de maior disseminação nos trópicos. Ele possui quatro sorotipos (1 a 4), que são co-circulantes nas áreas endêmicas da doença (DEJNIRATTISAI et al., 2016; RABONI et al., 2017). Isso significa que um mesmo indivíduo pode ter múltiplas infecções por DENV (DEJNIRATTISAI et al., 2016). A diferença na sequência de aminoácidos entre os sorotipos é de 68,7% a 78,1% (NGONO; SHRESTA, 2018), sendo que, especificamente entre a proteína E dos sorotipos, a diferença é de 63%. Um valor bem próximo da diferença entre a mesma proteína, no ZIKV e DENV (KHANDIA et al., 2018).

Figura 1 - Estrutura do RNA dos Flavivírus e a poliproteína codificada após a transcrição reversa.



Fonte: Adaptado de Ngono, 2018

A infecção primária pelo DENV confere ao organismo imunidade por toda a vida (DEJNIRATTISAI et al., 2016; GEORGE et al., 2017; PANTOJA et al., 2017). Porém, um segundo contato com o vírus, considerado heterólogo, ou seja, por outro sorotipo do mesmo vírus, provoca um agravamento desta segunda infecção. Assim, surgem os sintomas da Febre da Dengue Hemorrágica ou a Síndrome do Choque da Dengue (DHF/DSS) (GEORGE et al., 2017; PANTOJA et al., 2017). Isso acontece devido ao fato de que, na segunda infecção heteróloga, os anticorpos da primeira infecção reconhecem os epítomos semelhantes entre os dois sorotipos, se ligam a eles, mas não são capazes de provocar neutralização (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018a). Assim, os anticorpos previamente produzidos pelo organismo, facilitam a replicação viral, já que não possuem concentração e avidéz suficientes (PANTOJA et al., 2017).

Atualmente, o ZIKV é presente em co-circulação com o DENV (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018a; NGONO; SHRESTA, 2018). A maior preocupação em decorrência dos

surtos de ZIKV foram as complicações neurológicas Síndrome de Guillain-Barré (GBS) em adultos e a Síndrome Congênita do Zika, que causou microcefalia em fetos e neonatos (DEJNIRATTISAI et al., 2016; KAM et al., 2017; RABONI et al., 2017; LI et al., 2018; LANGERAK et al., 2019). Sem essas complicações, a infecção apresenta-se com sintomas semelhantes à DENV, com mais abrandamento, havendo casos em que não há sintoma clínico aparente (WILLIS; HENSLEY, 2017; NGONO; SHRESTA, 2018).

Diferentemente dos demais Flavivirus, o ZIKV também é transmitido via sexual e via transplacentária (NGONO; SHRESTA, 2018; PREMKUMAR et al., 2018). Ainda pouco se sabe sobre o mecanismo do ZIKV usa para atingir o tecido cerebral e desenvolver as desordens neurológicas, mas já é sabido que ele ultrapassa a barreira transplacentária e infecta o cérebro dos fetos (DEJNIRATTISAI et al., 2016; ANDRADE; HARRIS, 2018; LI et al., 2018). O ZIKV foi descoberto em 1947 em Uganda na África, porém apenas a partir de 2007 foi destaque, pelo surto na Ilha Yap (Micronésia), em 2013-2014 na Polinésia Francesa e, em 2015, no Brasil, espalhando-se por vários países em cinco continentes (DEJNIRATTISAI et al., 2016; ANDRADE; HARRIS, 2018; LI et al., 2018; LANGERAK et al., 2019).

Cao-Lormeau, et al. (2016) descrevem a GBS como uma poliradiculoneuropatia aguda, mediada pelo sistema imune, de ocorrência típica após infecções respiratórias ou gastrointestinal e usualmente causada por vírus ou bactérias. O contato com os vírus seria um gatilho para uma resposta imune exarcebada, que desencadearia a GBS (ANDRADE; HARRIS, 2018). O DENV pode causar a GBS, porém com menor frequência que o ZIKV. De fato, houve um aumento significativo dos casos da síndrome após os surtos de ZIKV na Polinésia Francesa e no Brasil, identificados em áreas de co-circulação de outros flavivírus (CAO-LORMEAU et al., 2016; DEJNIRATTISAI et al., 2016; CASTANHA et al., 2017; RABONI et al., 2017; LANGERAK et al., 2019). Isso fez com que a Organização Mundial da Saúde declarasse a infecção pelo ZIKV como uma emergência global para a saúde pública, em 2016 (ANDRADE; HARRIS, 2018).

Uma explicação para o asseveramento da infecção por ZIKV, seria a diferença entre o tropismo de tecidos do ZIKV com o DENV (LANGERAK et al., 2019). O ZIKV possui tropismo pelas células progenitoras neurais e desencadeia a apoptose destas células após a infecção (ANDRADE; HARRIS, 2018). Nas infecções pelo DENV, os diferentes sorotipos causam reação cruzada, intensificando uma subsequente infecção (GEORGE et al., 2017; PANTOJA et al., 2017; ANDRADE; HARRIS, 2018). Teoricamente, o mesmo aconteceria com a infecção pelo ZIKV, porém a infecção intensificada seria resultado de reação cruzada com anticorpos de outros flavivírus, principalmente com o DENV (CASTANHA et al., 2017; GUNAWARDANA; SHAW, 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; LANGERAK et al., 2019).

A proteína E, tanto do DENV quanto do ZIKV, é a responsável pela ligação e fusão entre a célula hospedeira e o vírus (PRIYAMVADA et al., 2016; ANDRADE; HARRIS, 2018; GUNAWARDANA; SHAW, 2018; NGONO; SHRESTA, 2018). Na infecção pelo DENV, a proteína E representa o maior complexo imunodominante que promove resposta do organismo (PRIYAMVADA et al., 2016). Ela é composta por três domínios: EDI, que desempenha o papel de rearranjo da estrutura protéica, para a fusão com a célula hospedeira, e nela está a extremidade N terminal da proteína; EDII, que contém o epítipo *fusion loop* (FLE), que facilita a fusão do vírus ao endossomo; EDIII, uma região semelhante à imunoglobulina, que promove a ligação ao receptor da célula hospedeira (ANDRADE; HARRIS, 2018; GUNAWARDANA; SHAW, 2018; NGONO; SHRESTA, 2018). A semelhança entre os domínios da proteína E, do DENV e ZIKV, é maior nos EDI (59,1%) e EDII (56,6%), inclusive no FLE, que é distintamente preservado entre os vírus (PRIYAMVADA et al., 2016; ANDRADE; HARRIS, 2018).

Alguns estudos indicam que da EDIII não promove reação cruzada entre os sorotipos de DENV e outros flavivírus, especialmente o ZIKV. Por outro lado, a combinação EDI/EDII e a proteína E completa, causariam alto índice desta reação cruzada (PRIYAMVADA et al., 2016; SLON CAMPOS et al., 2017; GUNAWARDANA; SHAW, 2018). O FLE é a região que mais foi preservada em todos os flavivírus, guardando uma homologia próxima a 100%, principalmente entre DENV e ZIKV (PRIYAMVADA et al., 2016). Assim, as semelhanças estruturais e de sequências de aminoácidos seriam responsáveis pela reação cruzada em níveis humoral e celular. Esse fato cria, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, uma exacerbada reação cruzada, tanto entre os sorotipos de DENV quanto entre o DENV e o ZIKV (PRIYAMVADA et al., 2017b; NGONO; SHRESTA, 2018). A similaridade entre ambos os vírus é tamanha, que alguns autores consideram o ZIKV como um quinto sorotipo do DENV. Um fato que deve ser levado em consideração no desenvolvimento de vacinas e produtos diagnósticos para ambos os vírus (DEJNIRATTISAI et al., 2016).

RESPOSTA CELULAR OU IMUNE AO ZIKA VIRUS E AO DENGUE VIRUS

O primeiro contato com os DENV e ZIKV é promovido pela proteína E. Sendo assim, os primeiros anticorpos formados são direcionados a esta proteína e possuem alta reação cruzada (DELGADO et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018). Apesar do EDIII ser responsável por gerar anticorpos potentes específicos para esta porção da proteína E, tanto nos sorotipos do DENV ou na infecção por ZIKV, a quantidade destes anticorpos não é capaz de neutralizar os antígenos em infecções secundárias heterólogas (NGONO; SHRESTA, 2018). Por outro lado, os anticorpos

gerados contra as porções FLE e prM do vírus, são produzidos em grande quantidade, mas possuem alta reação cruzadas entre os vários flavivírus (NGONO; SHRESTA, 2018)

A reação cruzada pela resposta imune das células T pode ou não acontecer. Isso depende de qual epítipo será apresentado ao linfócito (NGONO; SHRESTA, 2018). A resposta celular por linfócitos T CD8⁺ do DENV envolve os epítipos NS3, NS4B e NS5 (GRIFONI et al., 2017; DELGADO et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; ROTH et al., 2018). Essa mesma resposta celular ao ZIKV envolve as proteínas E, C e NS5, fazendo com que a resposta por linfócitos CD8⁺ seja diferenciada entre os dois vírus (GRIFONI et al., 2017; RICCIARDI et al., 2017). A proteína E do DENV também é um epítipo reconhecido pelas células T CD8⁺, porém com menor intensidade (ROTH et al., 2018). Os epítipos imunodominantes na ativação das células T CD4⁺, tanto para ZIKV quanto para DENV, são proporcionalmente semelhantes nas proteínas estruturais e não estruturais (ANDRADE; HARRIS, 2018).

Alguns autores concluem que o DENV possui os epítipos imunodominantes para a indução de resposta celular, predominantemente, pelas células T CD8⁺, enquanto o ZIKV possui os epítipos imunodominantes predominantemente para indução das células T CD4⁺ (DELGADO et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; ROTH et al., 2018). Isso não quer dizer que a célula T CD8⁺ não é induzida na infecção por ZIKV, ou que a CD4⁺ não é induzida na infecção por DENV. Entretanto, a presença de alelos de HLA é outro fator determinante sobre a resposta celular aos vírus, (RICCIARDI et al., 2017; DELGADO et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; ROTH et al., 2018). Tais alelos de HLA regulam a amplitude e magnitude da resposta de células T CD4⁺ e CD8⁺, protegendo contra a forma severa da DENV, por exemplo (NGONO; SHRESTA, 2018).

Assim, a reação cruzada celular entre DENV e ZIKV é um fato e é explicada pelo fenômeno da imunidade heteróloga. Quando ZIKV é o responsável por uma infecção secundária ao DENV, esta reação cruzada pode ser responsável pela evolução e piora da infecção pelo ZIKV (GRIFONI et al., 2017). Essa reação cruzada ocorreria pela semelhança entre os epítipos específicos da DENV, reconhecidos pelas células T CD8⁺, que são apresentados numa infecção subsequente do ZIKV. Esses epítipos estão presentes nas proteínas E, NS1, NS3 e NS5 (ROTH et al., 2018). A resposta celular do ZIKV após uma infecção do DENV é dominada pelas células T que produzem reação cruzada. A resposta citotóxica mediada pelo INF- γ foi mais forte e amplificada para a proteína NS5, em indivíduos previamente imunes ao DENV (DELGADO et al., 2018; ROTH et al., 2018). Por isso, a resposta celular ao ZIKV é maior quando o indivíduo já possui imunidade para DENV (DELGADO et al., 2018).

A imunidade heteróloga indicaria um papel predominantemente desempenhado pelas células T CD8⁺ na resposta imune nas infecções de DENV e ZIKV, promovendo as reações cruzadas

(ANDRADE; HARRIS, 2018; DELGADO et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; ROTH et al., 2018). O comportamento das células em infecções subsequentes, seja de sorotipos diferentes de DENV ou de ZIKV, é o mesmo (NGONO; SHRESTA, 2018; ROTH et al., 2018). Uma menor resposta das células T CD8+, resultaria numa maior replicação viral dentro do hospedeiro. Alguns experimentos com ratos infectados demonstraram que a depleção, durante a gravidez, das células T CD8+ teria facilitado a transmissão vertical do ZIKV (NGONO; SHRESTA, 2018).

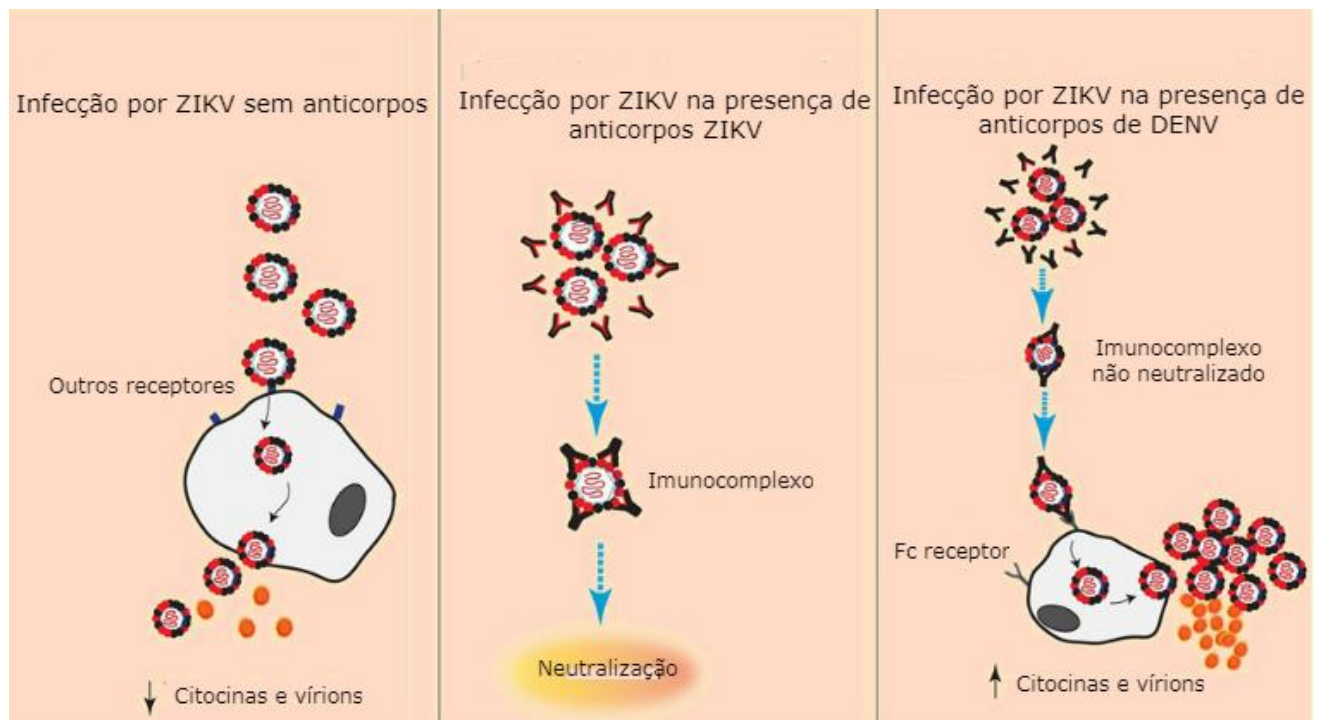
ANTIBODY-DEPENDENT ENHANCEMENT – ADE

A reação cruzada entre os quatro sorotipos do DENV ocorre logo após a primeira infecção, mas tem duração de 2 a 3 meses. Após esse período, a proteção vai se tornando mais específica ao sorotipo causador da infecção e o paciente, após 2 anos da primeira infecção, está sob o risco do asseveramento da doença, caso haja uma infecção por sorotipo diverso (PANTOJA et al., 2017; KHANDIA et al., 2018; ST. JOHN; RATHORE, 2019). A segunda infecção por um tipo heterólogo de DENV causa a doença com sintomas bem mais graves que a primeira. Uma explicação ao fato é a ADE – *antibody-dependent enhancement*. O ADE em sorotipos do DENV tem sido reconhecido desde a década de 60 (DEJNIRATTISAI et al., 2016; KHANDIA et al., 2018; LANGERAK et al., 2019). Este fenômeno ocorre quando anticorpos cruzados de diferentes sorotipos de DENV, em concentrações que causariam uma neutralização ineficiente, promovem o aumento de produção de citotoxinas e, com isso, aumentam a permeabilidade das células fagocitárias. Ao invés desse imunocomplexo inibir a replicação viral, ele torna a invasão do vírus mais eficaz (DEJNIRATTISAI et al., 2016; CASTANHA et al., 2017; PRIYAMVADA et al., 2017a, 2017b; SLON CAMPOS et al., 2017; WILLIS; HENSLEY, 2017; NGONO; SHRESTA, 2018; ST. JOHN; RATHORE, 2019). A Figura 2 ilustra o provável mecanismo do ADE de ZIKV mediada por anticorpos de DENV.

Além da infecção secundária, recém-nascidos com o IgG materna para DENV, desenvolveram Febre da Dengue Hemorrágica ou Síndrome de Choque da Dengue (DHF/DSS) (KHANDIA et al., 2018; NGONO; SHRESTA, 2018; LANGERAK et al., 2019). Ainda hoje, não há relatos de neonatos que tenham desenvolvido DHF/DSS, nascidos de mães não imunes à Dengue (NGONO; SHRESTA, 2018). Esse fato é reforçado pelos estudos de desenvolvimento da vacina tetravalente contra a Dengue. A Dengvaxia, desenvolvida pela empresa francesa Sanofi-Pasteur, é contra indicada a menores de 9 anos. Nesta faixa etária, o desenvolvimento de ADE é muito presente, visto que a grande maioria ainda é imune ao DENV. Após a vacinação, ao invés de serem protegidas contra uma infecção, as crianças desenvolveram DHF/DSS (DEJNIRATTISAI et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2017b; LANGERAK et al., 2019).

A neutralização ou a ADE se diferenciam por uma questão de proporção entre antígenos e anticorpos. Se a quantidade de anticorpos é insuficiente ou com afinidade insuficiente, a neutralização é ineficaz (NGONO; SHRESTA, 2018). A formação destes imunocomplexos facilita a entrada nos monócitos e outras células fagocitárias. Essas células possuem receptores gama de fragmentos cristalizáveis (Fc γ R), que ao se ligarem aos imunocomplexos facilitam a entrada na célula e a replicação do vírus (WILLIS; HENSLEY, 2017; MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018a; NGONO; SHRESTA, 2018; LANGERAK et al., 2019). Isso pode causar mais células com receptor Fc γ R infectadas (ADE extrínseco) ou uma resposta imune mais direcionada aos linfócitos Th2 (ADE intrínseco). As células infectadas podem se espalhar por outros tecidos e complicar ainda mais os sintomas da infecção secundária, pelo aumento da viremia (LANGERAK et al., 2019). Até mesmo células que não permitiram a entrada do imunocomplexo, passam a fazê-lo, o que estaria intrinsecamente ligado a baixa resposta imune ao vírus (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018).

Figura 2 – Provável mecanismo de ADE de ZIKV mediado por reação cruzada com anticorpos de DENV



Fonte: Adaptado de Langerak. 2019

Na infecção por diferentes sorotipos de DENV, as células que expressam os receptores Fc γ RI e Fc γ RII estão mais intrinsecamente ligados ao evento de ADE. Os receptores Fc γ RIII, ao contrário, não se ligam aos anticorpos com alta afinidade, e não participariam efetivamente (LI et al., 2018;

NGONO; SHRESTA, 2018). Como DENV e ZIKV são muito semelhantes estruturalmente, a ADE de infecção por DENV é sugerida como uma das razões pelas quais a infecção por ZIKV pode ter sido agravada, principalmente em áreas endêmicas como o Brasil (LANGERAK et al., 2019).

Para se comprovar essa teoria, duas linhas de pesquisa estão sendo feitas: 1) os estudos experimentais, que se subdividem em estudo *in vitro* e o estudo *in vivo*; e 2) os estudos epidemiológicos, que determinam as interações entre pacientes infectados por Zika com imunidade ou não para Dengue (LANGERAK et al., 2019).

Os estudos experimentais utilizam as células humanas K562, U937 e THP-1. Todas são células humanas, provenientes de leucemia e que possuem os receptores Fc γ R (PRIYAMVADA et al., 2016; CASTANHA et al., 2017; SLON CAMPOS et al., 2017; WILLIS; HENSLEY, 2017; LANGERAK et al., 2019). As células K562 expressam o Fc γ RIIA, em alta quantidade, e estes receptores são largamente indutores da ADE nas infecções secundárias por DENV. Considera-se que se o soro não induzir ADE nesta célula, não irá induzir em nenhuma outra. Esse estudo demonstrou que houve a ADE entre ZIKV e DENV, quando os anticorpos produzidos após a infecção por DENV eram predominantemente aos domínios EDI e EDII da proteína E. O domínio EDIII, por ser distinto entre os dois vírus não produzia a ADE, o que pode ser um epítopo chave para o desenvolvimento de uma vacina contra o DENV que não prejudique o organismo numa próxima infecção por outro flavivírus (SLON CAMPOS et al., 2017).

Outro estudo, realizado em 2017, verificou a ADE de ZIKV em presença de soro humano imune a DENV, em células U937. Os quatro tipos de DENV foram testados e todos apresentaram a amplificação. Esse estudo está em concordância com outros estudos que utilizaram a célula K562, inclusive quanto ao maior ADE entre os sorotipos DENV 2 e DENV 4. A novidade deste estudo foi demonstrar que houve um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, quando as células são testadas na presença de soro imune ao DENV. O aumento foi maior quando o soro testado continha anticorpos contra o DENV 3. A citocina IL-10 aumentou em quase 4 vezes e o INF-gamma em duas vezes. As outras citocinas alteradas foram IL-6, IL-12p70, TNF-alfa e a prostraglandina E2 (LONDONO-RENTERIA et al., 2017). Entretanto, os estudos com linhagem de células nem sempre demonstram o efeito do vírus no organismo. Em outros estudos com células, o soro imune ao DENV provocou ADE em contato com o vírus da Febre Amarela e da Encefalite Japonesa. Esse fenômeno não acontece *in vivo* (PANTOJA et al., 2017). IFN-lambda (tipo III) foi demonstrado ser capaz de controlar a transmissão da mãe para o feto no ZIKV, e a permissividade de outros Flavivirus neurotrópicos. O IFN-alfa (tipo I) é conhecido como preventivo da disseminação sistêmica do ZIKV (KWEK et al., 2018).

Os estudos *in vivo* falharam em comprovar suficientemente a ADE em macacos (KHANDIA et al., 2018; LANGERAK et al., 2019). A maioria dos estudos notou um aumento de viremia nos animais infectados pelo ZIKV, após uma exposição ao DENV, mas nenhum agravo no curso da infecção (PANTOJA et al., 2017). Em algumas experiências em macacos, o soro imune ao DENV ajudou o *clearance* da infecção pelo ZIKV. Esse fato também foi observado em humanos, em alguns casos da segunda infecção pelo DENV. Ao contrário do que se pensava a preexistência de imunidade ao DENV1 ou DENV2 fez com que a infecção pelo ZIKV fosse controlada mais rapidamente (PANTOJA et al., 2017)

Uma maior reação cruzada sorológica entre DENV e ZIKV foi observada em macacos previamente expostos ao DENV2. Mesmo em infecções recentes, 30 dias após a exposição ao DENV, foi comprovada a reação cruzada com o NS1 do ZIKV. Em 75% dos macacos, essa reação cruzada foi mantida após 2,5 anos do contato com o ZIKV. Uma explicação a esse fato pode ser pela duração maior da viremia quando a contaminação é pelo DENV2, em comparação ao DENV1 (PANTOJA et al., 2017). No caso contrário, infecção prévia por ZIKV e uma contaminação secundária pelo DENV2, os macacos apresentaram piora na infecção pelo DENV2, com aumento de viremia e secreção de citocinas (KHANDIA et al., 2018).

A viremia por ZIKV, em presença de anticorpos anti-DENV indica uma distância antigênica entre esses vírus, apesar da semelhança filogenética. Macacos não imunes ao DENV, quando contaminados com o ZIKV, tiveram aumento em anticorpos neutralizantes capazes de interagir com DENV4 e DENV2, mas nem um pouco relacionados ao DENV1 ou DENV3. (PANTOJA et al., 2017).

Quando os estudos foram conduzidos em camundongos e/ou ratos, a ADE esteve presente. Uma explicação a esse fato, pode ser pela menor afinidade que os camundongos/ratos tem entre as células Fc γ R e os anticorpos IgG-Fc humanos, causando, inclusive, alta mortalidade entre os indivíduos (LANGERAK et al., 2019). Ao conduzir os estudos em camundongos, durante a fase de gestação, e em cultura de tecido humano placentário, eles apresentaram uma maior suscetibilidade de quebra da barreira placentária, durante a infecção por ZIKV, quando o organismo possuía imunidade à DENV. A infecção de trofoblastos levou ao menor crescimento intrauterino, problemas no desenvolvimento neurológico e abortos espontâneos. A infecção nos trofoblastos levou a um aumento da carga viral de ZIKV (BROWN et al., 2019). Porém, os estudos em ratos precisam ser analisados com cuidado. Mesmo em estudos do DENV somente, os ratos apresentam um grande número de complicações neurológicas. Outros Flavivírus também apresentam esse comportamento em ratos (PANTOJA et al., 2017).

A discrepância entre os resultados *in vivo* pode ser justificada por algumas considerações. Enquanto o desafio com ZIKV em ratos foi realizado duas horas após a transferência de anticorpos anti-DENV, o desafio em macacos foi realizado dois anos e meio após a sensibilização pelo DENV. O maior tempo de memória imunológica dos macacos pode influenciar na natureza da resposta imune. Além de que outros fatores da resposta imune específica ao DENV dos macacos pode ter afetado o desenvolvimento da infecção pelo ZIKV. A comprovação do ADE *in vivo* requer, dentre outros fatores, uma distinção entre as infecções prévias de ZIKV e/ou DENV. Esta distinção necessita de reagentes sorológicos sensíveis e específicos (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2019).

A comprovação de ADE deve ser realizada também por estudos epidemiológicos. Os experimentos em animais ou em células de linhagem mielóide, nem sempre são capazes de refletir a realidade dos efeitos de um patógeno no organismo humano (LANGERAK et al., 2019). Os estudos epidemiológicos de populações em que DENV e ZIKV são co-circulantes é essencial para o entendimento do fenômeno da ADE (KHANDIA et al., 2018; RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019). Entretanto, o estudo longitudinal da população afetada somente é realizada pela sorologia da população. Esse estudo é limitado pelo fato de que poucos *kits* comerciais são sensíveis e específicos o suficiente, para a diferenciação entre DENV e ZIKV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019). Isso reforça a necessidade de um diagnóstico preciso do ZIKV, diferenciando-o de uma infecção por DENV. Poucos estudos epidemiológicos foram feitos sobre a ADE de ZIKV após infecção por DENV, e os números de casos estudados são sempre baixos. Um dos estudos para se comprovar o ADE de DENV heterotrófico, foi conduzido em 6.000 crianças na Nicarágua, confirmando que os anticorpos anti-DENV presentes no soro, estavam associados à piora da doença secundária por DENV (LANGERAK et al., 2019)

No caso da ADE de ZIKV por DENV, em um estudo, 65 pacientes com histórico de imunidade para DENV, foram analisado após infecção por ZIKV e não apresentaram nenhum indício de ADE ou títulos altos de anticorpos (KHANDIA et al., 2018). Um outro estudo, não focado em ADE, analisou os efeitos da imunidade da DENV recente na infecção por ZIKV em Salvador, durante o surto de 2015. Foi concluído que em infectados recentemente por DENV, a infecção por ZIKV foi mais amena ou sem sintomas. Esse estudo foi realizado pela pesquisa de anticorpos do tipo IgG3 de DENV. O IgG3 é uma subclasse do anticorpo, que tem durabilidade no organismo entre 3 a 6 meses, e que demonstra o quão recente foi a infecção (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019). Não há relatos de piora dos sintomas da DENV após os casos de ZIKV. Também não relatos ou estudos que comprovem maior letalidade dos casos de DENV após o surto de ZIKV, nas regiões de co-circulação destes vírus. Essa conclusão é baseada em dados clínicos, já que pouco de diagnóstico

laboratorial é feito, portanto, não pode ser considerada como verídica (MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018).

Algumas observações devem ser consideradas, para que a ADE de ZIKV pelo DENV seja comprovada. Possivelmente, a ocorrência deve depender do sorotipo de DENV que afetou previamente o indivíduo. Assim como na ADE de DENV, a infecção prévia por DENV1 e a secundária por DENV2 ou DENV3, causa uma infecção bem mais aguda. Em seguida, um tempo menor de infecção prévia (< 2 anos) causa uma infecção secundária mais amena. Ao passo que a infecção secundária após 2 anos (2 – 20 anos) causa a infecção de forma mais severa (ANDRADE; HARRIS, 2018; KHANDIA et al., 2018). Alguns autores consideram ainda que, a baixa vacinação contra Febre Amarela, pode ter influenciado no aumento de casos de microcefalia na região nordeste do Brasil. Essa afirmação foi feita por dados epidemiológicos e não considerou a imunidade contra DENV no estudo. Esta informação dá suporte a falta de ADE de ZIKV com outros flavivírus, porém não a descarta (DE GÓES CAVALCANTI et al., 2016; MARTÍN-ACEBES; SAIZ; JIMÉNEZ DE OYA, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ADE de ZIKV em decorrência de uma infecção prévia por DENV é um fenômeno de ocorrência factível no organismo humano. As vias de ação da ADE, seja celular ou humoral, através das citocinas envolvidas no processo, são produzidas tanto neste fenômeno *in vitro* quanto *in vivo*. A conclusão sobre o ADE de ZIKV causada por infecção prévia de DENV ainda é vaga, pois os vários estudos sobre esse assunto permanecem controversos entre si. A maioria destes estudos é feita em células de linhagem mielóide (*in vitro*) ou em organismos que não refletem corretamente a infecção no organismo humano (*in vivo*). Os estudos epidemiológicos são fundamentais para a conclusão sobre o assunto. Os dados epidemiológicos, prévios e posteriores à infecção pelo ZIKV, vão esclarecer o entendimento da interação imunológica entre ZIKV e DENV, no organismo humano. Assim sendo, o desenvolvimento de novos meios de se diferenciar as infecções, com sensibilidade e especificidade suficientes são as ferramentas adequadas para esse fim.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. V.; HARRIS, E. **Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure** *Virus Research*, 2018. .

BROWN, J. A.; SINGH, G.; ACKLIN, J. A.; LEE, S.; DUEHR, J. E.; CHOKOLA, A. N.; FRERE, J. J.; HOFFMAN, K. W.; FOSTER, G. A.; KRYSZTOF, D.; CADAGAN, R.; JACOBS, A. R.; STRAMER, S. L.; KRAMMER, F.; GARCÍA-SASTRE, A.; LIM, J. K. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 751- 762.e5, 2019.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A. L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S. K.; WILLISON, H. J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J. C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. 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, 2016.

CASTANHA, P. M. S.; NASCIMENTO, E. J. M.; BRAGA, C.; CORDEIRO, M. T.; DE CARVALHO, O. V.; DE MENDONÇA, L. R.; AZEVEDO, E. A. N.; FRANÇA, R. F. O.; DHALIA, R.; MARQUES, E. T. A. Dengue virus-specific antibodies enhance Brazilian Zika virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 781–785, 2017.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. **F1000 Research**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.

DE GÓES CAVALCANTI, L. P.; TAUIL, P. L.; ALENCAR, C. H.; OLIVEIRA, W.; TEIXEIRA, M. M.; HEUKELBACH, J. Zika virus infection, associated microcephaly, and low yellow fever vaccination coverage in Brazil: Is there any causal link. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 6, p. 563–566, 2016.

DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; ROUVINSKI, A.; BARBA-SPAETH, G.; DUANGCHINDA, T.; SAKUNTABHAI, A.; CAO-LORMEAU, V.-M.; MALASIT, P.; REY, F. A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–8, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339099>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4994874>.

DELGADO, F.; TORRES, K.; CASTELLANOS, J.; ROMERO-SÁNCHEZ, C.; SIMON-LORIÈRE, E.; SAKUNTABHAI, A.; ROTH, C. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 480, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/9/480>>.

FOCOSI, D.; MAGGI, F.; PISTELLO, M. Zika virus: Implications for public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 227–233, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299941290_Zika_Virus_Implications_for_Public_Health>.

GEORGE, J.; VALIANT, W. G.; MATTAPALLIL, M. J.; WALKER, M.; HUANG, Y. J. S.; VANLANDINGHAM, D. L.; MISAMORE, J.; GREENHOUSE, J.; WEISS, D. E.; VERTHELYI, D.; HIGGS, S.; ANDERSEN, H.; LEWIS, M. G.; MATTAPALLIL, J. J. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

GRIFONI, A.; PHAM, J.; SIDNEY, J.; ROURKE, P. H. O.; PAUL, S.; PETERS, B.; MARTINI, S. R.; SILVA, A. D. De; RICCIARDI, M. J.; DAMASCO, P. V.; PHILLIPS, E.; MALLAL, S.; CERPAS, C.; BALMASEDA, A.; KUAN, G.; COLOMA, J.; HARRIS, E.; CROWE, J. E.; STONE, M.; NORRIS, P. J.; BUSCH, M.; VIVANCO-CID, H.; COX, J.; GRAHAM, B. S. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. v. 91, n. 24, p. 1–19, 2017.

GUNAWARDANA, S. A.; SHAW, R. H. Cross-reactive dengue virus-derived monoclonal antibodies to Zika virus envelope protein: Panacea or Pandora's box? **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2018.

KAM, Y.-W.; LEE, C. Y.-P.; TEO, T.-H.; HOWLAND, S. W.; AMRUN, S. N.; LUM, F.-M.; SEE, P.; KNG, N. Q.-R.; HUBER, R. G.; XU, M.-H.; TAN, H.-L.; CHOO, A.; MAURER-STROH, S.; GINHOUX, F.; FINK, K.; WANG, C.-I.; NG, L. F. P.; RÉNIA, L. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. **JCI Insight**, v. 2, n. 8, p. 1–10, 2017.

KEEFFE, J. R.; VAN ROMPAY, K. K. A.; OLSEN, P. C.; WANG, Q.; GAZUMYAN, A.; AZZOPARDI, S. A.; SCHAEFER-BABAJEW, D.; LEE, Y. E.; STUART, J. B.; SINGAPURI, A.;

WATANABE, J.; USACHENKO, J.; ARDESHIR, A.; SAEED, M.; AGUDELO, M.; EISENREICH, T.; BOURNAZOS, S.; OLIVEIRA, T. Y.; RICE, C. M.; COFFEY, L. L.; MACDONALD, M. R.; BJORKMAN, P. J.; NUSSENZWEIG, M. C.; ROBBIANI, D. F. A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates. **Cell Reports**, v. 25, n. 6, p. 1385- 1394.e7, 2018.

KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; MALIK, Y. S.; SINGH, R. K.; CHAICUMPA, W. Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, 2018.

KWEK, S. Sen; WATANABE, S.; CHAN, K. R.; ONG, E. Z.; TAN, H. C.; NG, W. C.; NGUYEN, M. T. X.; GAN, E. S.; ZHANG, S. L.; CHAN, K. W. K.; TAN, J. H.; SESSIONS, O. M.; MANUEL, M.; POMPON, J.; CHUA, C.; HAZIRAH, S.; TRYGGVASON, K.; VASUDEVAN, S. G.; OOI, E. E. A systematic approach to the development of a safe live attenuated Zika vaccine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03337-2>>.

LANGERAK, T.; MUMTAZ, N.; TOLK, V. I.; VAN GORP, E. C. M.; MARTINA, B. E.; ROCKX, B.; KOOPMANS, M. P. G. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007640, 2019.

LI, M.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; WANG, X.; HONG, W.; SUN, J.; LIU, R.; YU, L.; WANG, J.; ZHANG, F.; JIN, X. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–23, 2018.

LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; CARDENAS, J. C.; HALL, A.; PEREZ, O. G.; CARDENAS, L.; HARTSTONE-ROSE, A.; HALSTEAD, S. B.; COLPITTS, T. M. A relevant in vitro human model for the study of Zika virus antibody-dependent enhancement. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1702–1712, 2017.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C.; JIMÉNEZ DE OYA, N. Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018a.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C.; JIMÉNEZ DE OYA, N. Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018b.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, 2018.

PANTOJA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, E. X.; RODRÍGUEZ, I. V.; WHITE, L. J.; GONZÁLEZ, O.; SERRANO, C.; GIAVEDONI, L.; HODARA, V.; CRUZ, L.; ARANA, T.; MARTÍNEZ, M. I.; HASSERT, M. A.; BRIEN, J. D.; PINTO, A. K.; DE SILVA, A.; SARIOL, C. A. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

PREMKUMAR, L.; COLLINS, M.; GRAHAM, S.; LIOU, G. A.; LOPEZ, C. A.; JADI, R.; BALMASEDA, A.; BRACKBILL, J. A.; DIETZE, R.; CAMACHO, E.; SILVA, A. D. De; GIUBERTI, C.; LUCIA, H.; SINGH, T.; HEIMSATH, H.; WEISKOPF, D.; SETTE, A.; OSORIO, J. E.; PERMAR, S. R.; MILEY, M. J.; LAZEAR, H. M.; HARRIS, E.; SILVA, M. De. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. v. 56, n. 3, p. 1–13, 2018.

PRIYAMVADA, L.; HUDSON, W.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. **Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Implications for protection and pathology** *Emerging Microbes and Infections*, 2017a. .

PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K. M.; HUDSON, W. H.; ONLAMOON, N.; SEWATANON, J.; EDUPUGANTI, S.; PATTANAPANYASAT, K.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MULLIGAN, M. J.; WILSON, P. C.; AHMED, R.; SUTHAR, M. S.; WRAMMERT, J. 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, 2016.

PRIYAMVADA, L.; SUTHAR, M. S.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. Humoral Immune Responses Against Zika Virus Infection and the Importance of Preexisting Flavivirus Immunity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S906–S911, 2017b.

RABONI, S. M.; BONFIM, C.; ALMEIDA, B. M.; ZANLUCA, C.; KOISHI, A. C.; RODRIGUES, P. R. V. P.; KAY, C. K.; RIBEIRO, L. L.; SCOLA, R. H.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: A case report. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 1–5, 2017.

RICCIARDI, M. J.; MAGNANI, D. M.; GRIFONI, A.; KWON, Y. C.; GUTMAN, M. J.; GRUBAUGH, N. D.; GANGAVARAPU, K.; SHARKEY, M.; SILVEIRA, C. G. T.; BAILEY, V. K.; PEDREÑO-LOPEZ, N.; GONZALEZ-NIETO, L.; MAXWELL, H. S.; DOMINGUES, A.; MARTINS, M. A.; PHAM, J.; WEISKOPF, D.; ALTMAN, J.; KALLAS, E. G.; ANDERSEN, K. G.; STEVENSON, M.; LICHTENBERGER, P.; CHOE, H.; WHITEHEAD, S. S.; SETTE, A.; WATKINS, D. I. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–23, 2017.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; COSTA, F.; NASCIMENTO, E. J. M.; JÚNIOR, N. N.; CASTANHA, P. M. S.; SACRAMENTO, G. A.; CRUZ, J.; CARVALHO, M.; DE OLIVERA, D.; HAGAN, J. E.; ADHIKARLA, H.; WUNDER, E. A.; COÊLHO, D. F.; AZAR, S. R.; ROSSI, S. L.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C.; RIBEIRO, G. S.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.; NOGUEIRA, M. L.; REIS, M. G.; MARQUES, E. T. A.; CUMMINGS, D. A. T.; KO, A. I. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607–610, 2019.

ROGERS, T. F.; GOODWIN, E. C.; BRINEY, B.; SOK, D.; BEUTLER, N.; NEDELLEC, R.; LE, K.; BROWN, M. E.; BURTON, D. R.; WALKER, L. M. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. v. 6809, 2017.

ROTH, C.; DELGADO, F. G.; SIMON-LORIÈRE, E.; SAKUNTABHAI, A. Immune responses to dengue and Zika viruses—Guidance for T cell vaccine development. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/385>>.

SLON CAMPOS, J. L.; POGGIANELLA, M.; MARCHESE, S.; MOSSENTA, M.; RANA, J.; ARNOLDI, F.; BESTAGNO, M.; BURRONE, O. R. DNA-immunisation with dengue virus E

protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–19, 2017.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 4, p. 218–230, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0123-x>>.

WILLIS, E.; HENSLEY, S. E. Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. v. 508, p. 1–6, 2017.

CAPÍTULO 3

O USO DE PCR TEMPO REAL EM DIAGNÓSTICOS DAS ARBOVIROSES

**ARTIGO DE REVISÃO INTEGRATIVA SUBMETIDO AO JORNAL BRASILEIRO
DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL
QUALIS CAPES B1 - INTERDISCIPLINAR**

The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review

O uso de PCR em tempo real em diagnósticos de arboviroses: revisão integrativa

Christiane O. L. Licínio; Flávio M. Ayres

Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil.

ABSTRACT

Arboviruses are viral diseases transmitted by arthropods (arthropod-borne virus). Standing out dengue, zika virus, and chikungunya among the emergent and re-emergent arboviruses in recent years around the world. The similarity between the symptoms makes the clinical diagnosis ineffective, making difficult the prophylactic and preventive measures of new outbreaks. Molecular diagnosis using the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique is one of the ways to diagnose such diseases. In this study, the literature on the diagnosis of arboviruses was compiled and evaluated. The objective was to answer the guiding question: Is the real-time PCR methodology effective in the diagnosis of arboviruses? Scientific articles of free access were searched in the databases Pubmed (50 articles) and Scielo (107 articles), between 2014 and 2019. The selection was done through the inclusion and exclusion criteria, only 20 articles remained. Among them, 85% cross-sectional studies, 10% systematic reviews, and 5% case studies. The period of publications was 50% in 2017, 35% in 2016, and 5% in 2014, 2015 e 2019, each. Regarding the viruses treated in the articles, 25% researched dengue and the same percentage for chikungunya, 20% researched about zika virus. The efficacy of the molecular diagnosis was published in 21% of the articles (sensitivity and specificity), 53% highlighted the limit of detection, 70% highlighted the absence of cross-reactions, and 80% highlighted the differentiation between viruses.

Key words: molecular probes techniques; dengue virus; zika virus; chikungunya virus.

RESUMO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes (arthropod-borne virus). Destacam-se dengue, vírus da zica e chikungunya entre as arboviroses emergentes e reemergentes nos últimos anos em todo o mundo. A semelhança dos sintomas dessas infecções faz com que o diagnóstico clínico seja ineficaz, dificultando medidas profiláticas e preventivas para novos surtos. O diagnóstico molecular por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é uma das formas de diagnosticar tais doenças. Neste estudo, foi compilada e avaliada a literatura sobre o diagnóstico das arboviroses. Nosso objetivo foi responder a uma pergunta norteadora: a metodologia PCR em tempo real é eficaz no diagnóstico das arboviroses? Foram pesquisados artigos científicos de livre acesso nos bancos de dados Pubmed (50 artigos) e Scielo (107 artigos), entre 2014 e 2019. A seleção foi realizada por meio dos critérios de inclusão e exclusão, restando apenas 20 artigos. Entre estes, 85% eram estudos transversais, 10%, revisões sistemáticas e 5%, estudos de caso. O período das publicações foi de 50% em 2017; 35% em 2016; e 5% em 2014, 2015 e 2019, cada. A respeito dos vírus tratados nos artigos, 25% dos estudos pesquisaram sobre dengue; 25%, sobre chikungunya e 20%, sobre o vírus da zica. A eficácia do diagnóstico molecular foi publicada em 21% dos artigos (sensibilidade e especificidade); 53% destacaram o limite de detecção; 70%, a ausência de reações cruzadas; e 80%, a diferenciação entre os vírus.

Unitermos: técnicas de diagnóstico molecular; vírus da dengue; vírus da zica; vírus da chikungunya.

RESUMEN

Las arbovirosis son enfermedades virales transmitidas por artrópodos (arthropod-borne virus). Dengue, zica y chikungunya se destacan entre los arbovirus emergentes y reemergentes en los últimos años en todo el mundo. La similitud de los síntomas de estas infecciones hace que el diagnóstico clínico sea ineficaz, dificultando las medidas profilácticas y preventivas para nuevos brotes. El diagnóstico molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es una de las formas de diagnosticar esas enfermedades. En este estudio se recopiló y evaluó la literatura sobre el diagnóstico de arbovirosis. Nuestro objetivo era responder a una pregunta orientadora: ¿la metodología de PCR en tiempo real es eficaz para diagnosticar arbovirosis? Se buscaron artículos científicos de acceso abierto en las bases de datos Pubmed (50 artículos) y Scielo (107 artículos), entre 2014 y 2019. La selección se realizó utilizando los criterios de inclusión y exclusión, quedando solo 20 artículos. Entre estos, el 85% fueron estudios transversales, el 10% fueron revisiones sistemáticas y el 5% fueron estudios de casos. El período de publicaciones fue del 50% en 2017; 35% en 2016; y 5% en 2014, 2015 y 2019, cada. En cuanto a los virus tratados en los artículos, el 25% de los estudios investigaron sobre el dengue; el 25% el chikungunya y el 20% el virus del Zika. La efectividad del diagnóstico molecular se publicó en el 21% de los artículos (sensibilidad y especificidad); el 53% destacó el límite de detección; 70%, ausencia de reacciones cruzadas; y el 80%, la diferenciación entre virus.

Palabras clave: técnicas de diagnóstico molecular; virus del dengue; virus del zika; virus del chikungunya.

INTRODUCTION

Arbovirus is a nomenclature used to indicate a grouping of arthropod-borne viruses. Mosquitoes and ticks are examples of arthropods capable of transmitting, through the bite, viruses belonging primarily to three families: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, and *Bunyaviridae*. The most important genus among these three families is *Flavivirus*, which has four members with great epidemiological importance: dengue (DENV), zika virus (ZIKV), yellow fever (YFV), and West Nile virus (WNV). From the *Togaviridae* family, the *Alphavirus* genus stands out, whose member of greatest epidemiological importance is *chikungunya* (CHIKV). All of these genera are enveloped, positive-sense, single-stranded ribonucleic acid (RNA) viruses⁽¹⁾.

These pathogens are responsible for major disease outbreaks around the world, especially in the last 20 years. The fact that they are transmitted by insects, which are capable of spreading over a large geographic extension, contributed to the occurrence of epidemics⁽²⁾. There is no presence of arboviruses only on the Antarctic continent^(3, 4). Vectors, vertebrate hosts, and climatic conditions are the main factors for arboviruses to spread so quickly⁽¹⁾. In addition, the high capacity for mutation and adaptation also influence the occurrence of large outbreaks⁽⁵⁾.

Recent climate change, large agglomerations due to uncontrolled urbanization, precarious sanitary conditions, and the great human movement between continents contribute to the proliferation of arboviruses^(1-3, 6). Therefore, these viruses are

the protagonists of emerging and re-emerging diseases, which caused a significant number of deaths and economically impacted several countries over the years⁽³⁾. Viruses are co-circulating in several countries and, in some cases, have the same vector⁽⁷⁾.

Initially, arboviruses present as an acute febrile illness, followed by symptoms of arthralgia, myalgia, and thrombocytopenia^(5, 8). This makes the clinical differential diagnosis precarious, that is, the onset of these symptoms only is inefficient to identify the pathogen causing the disease. Consequently, laboratory diagnosis, with high sensitivity and specificity, is essential for this approach⁽⁸⁾. Although initial symptoms are common, some cases progress to complications after infection. As an example, hemorrhagic fever in cases of DENV, microcephaly, and Guillain-Barré syndrome in cases of ZIKV⁽⁵⁾. Thus, the differentiation between arboviruses is important for patient management in order to avoid complications, as well as to assist in taking preventive measures to control the spread of the disease⁽⁹⁾.

The laboratory diagnosis for arboviruses can be performed in two ways: indirectly, through the investigation of antibodies in the infected patient's blood, or directly, through the investigation of the pathogen in the blood and other body fluids⁽¹⁾. The most common diagnosis for Flaviviruses is made by the enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa), which screens for class M immunoglobulin (IgM) antibodies for the early stages of the disease. However, the use of this methodology leads to numerous cross-reactions between the various arboviruses⁽¹⁰⁾; therefore, the main method for diagnosing arboviruses in the early stage of

the disease is the reverse transcription reaction followed by the polymerase chain reaction (RT-PCR)⁽⁹⁾.

Molecular diagnoses, such as RT-PCR and real-time PCR, are very sensitive and specific, as they reduce the occurrence of cross-reactivity and identify pathogens in the early stages of the disease⁽¹⁰⁾. Several biological matrices can be used, such as urine, semen, amniotic fluid, and saliva, besides whole blood, serum, and plasma⁽¹¹⁾. The advantage of real-time PCR compared to traditional PCR is the quantification of the amplified material simultaneously with the amplification of the tested genetic material. This process reduces the time spent on the reaction and the possibility of cross contamination. In RNA amplifications, which have low stability in the molecule, speed reduces the incidence of false negative results⁽¹¹⁾.

Considering the emergence and re-emergence of the DENV, CHIKV, ZIKV, and YF arboviruses in recent years and the need to identify and differentiate these viruses, the objective of this review was to compile and analyze the scientific literature regarding the diagnosis of arboviruses. The focus of the research was limited to the effectiveness of the molecular diagnosis used to identify and differentiate viruses, in particular on sensitivity, specificity, occurrence of cross-reactivity, and limit of detection.

METHODOLOGY

This article is an integrative review that was carried out following the steps below: 1. selection and identification of the theme – formulation of the guiding question; 2. establishment of inclusion and exclusion criteria; 3. definition of information (articles) through research in databases; 4. evaluation and categorization of information; 5. interpretation of the results obtained; and 6. presentation of results.

The guiding question was: Is the real-time PCR methodology effective in the diagnosis of arboviruses? The PubMed and Scielo databases were used to search for open access scientific articles, in English and Portuguese. The period of publication was delimited from January 2014 to July 2019 in order to select the most current and relevant articles on the topic, since this subject has been more disseminated from 2014 on. MESH and its equivalent in Portuguese, DECS, were used to find the descriptors “real-time PCR”, “arbovirus”, and “molecular diagnosis”. The Boolean operator “AND” was used in the PubMed database search, and “OR” in the Scielo database. There was no restriction on the design of the article.

Publications were selected by title and abstract. Repeated articles and texts that did not contain information about the

diagnosis of the disease or that were not about arboviruses were excluded. The exclusion criteria also applied to articles with approaches outside the aforementioned arboviruses.

The selection of articles was carried out in February 2020. Fifty articles in the PubMed database and 107 articles in the Scielo database were found (we did not find duplicate articles). After applying the inclusion and exclusion criteria, we selected 32 articles, however, nine were not open access and three did not meet the objectives. Therefore, the research was completed with 20 articles. **Figure** shows the flow of steps carried out in the research.

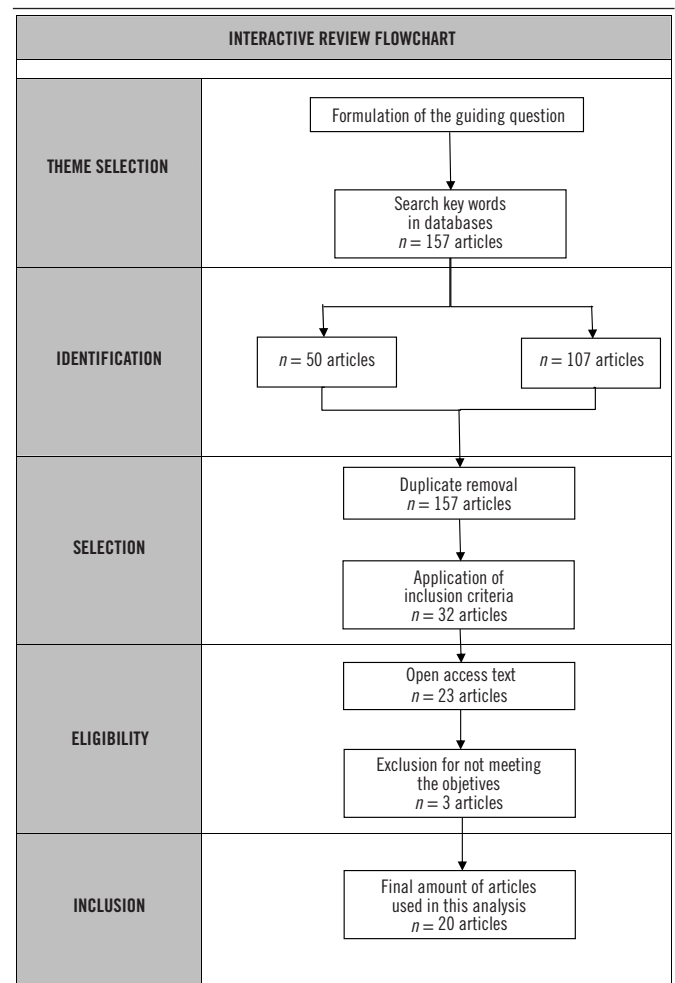


FIGURE – Flowchart of search and selection steps of the analyzed articles

RESULTS

Of the 20 articles selected, 85% were cross-sectional studies, 10% systematic reviews, and 5% were case studies. Most articles

were written in 2017 (50%) and 2016 (35%). 2019, 2015, and 2014 had the same number of publications (5%), as described in **Table 1**.

Regarding the viruses of the study, **Table 2** shows that 25% of the articles reported exclusively on DENV, the same percentage on CHIKV, and 20% on ZIKV. The percentage of articles that searched for all three viruses at the same time was also 20%. The search on DENV and CHIKV, and DENV and ZIKV in the same article was 5% each disease group. No article mentioned the YF.

Table 3 summarizes the results of the studies regarding the parameters investigated for the effectiveness of the test in question. 21% of the articles reported numerical data for sensitivity and specificity. The limit of detection was published in 53% of the articles. Differentiation between viruses was mentioned in 80% of the selected texts, and the absence of cross-reactivity in 70%.

DISCUSSION

Arboviruses have become a public health problem in almost every country in the world. Rapid spread, availability of vectors, lack of effective treatment, and prevention make epidemics frequent and increasingly virulent. The adaptive capacity of viruses as a result of genetic variations greatly contributes to their emergence in new geographic regions and to the frequency of outbreaks in regions where they are already established⁽¹²⁾.

Arboviruses were much debated in Brazil due to the occurrence of ZIKV and CHIKV outbreaks in 2015 and the recurrence of DENV for several years. There were few publications on the diagnosis of arboviruses between 2014 and 2015, before the outbreak, and between 2018 and 2019, after the outbreak. Most publications were between 2016 and 2017. It was also possible to verify that articles from cross-sectional studies are the majority, which characterizes the predominance of observational articles.

TABLE 1 – Articles selected during the stages of integrative review search

Article	Authors	Article title	Research design	Year of publication
1	Alva-Urcia <i>et al.</i> ⁽¹⁾	Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru	Cross-sectional study	2017
2	Kurosaki <i>et al.</i> ⁽²⁾	Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification	Cross-sectional study	2017
3	Giry <i>et al.</i> ⁽³⁾	Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay	Cross-sectional study	2017
4	Edwards <i>et al.</i> ⁽⁴⁾	Analytical and clinical performance of a chikungunya qRT-PCR for Central and South America	Cross-sectional study	2017
5	Giry <i>et al.</i> ⁽⁵⁾	Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic <i>Leptospira</i> genomes using a multiplex TaqMan® assay	Cross-sectional study	2017
6	Luo <i>et al.</i> ⁽⁶⁾	Laboratory and molecular characterization of dengue viruses in a 2014 outbreak in Guangfo region, Southern China	Cross-sectional study	2017
7	Fortuna <i>et al.</i> ⁽⁷⁾	Imported arboviral infections in Italy, July 2014–October 2015: a National Reference Laboratory report	Cross-sectional study	2017
8	Eppes <i>et al.</i> ⁽⁸⁾	Testing for zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic	Systematic review	2017
9	Gorman <i>et al.</i> ⁽⁹⁾	Assay optimization for molecular detection of zika virus	Cross-sectional study	2016
10	Johnson <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁾	Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays	Cross-sectional study	2016
11	Patel <i>et al.</i> ⁽¹¹⁾	A field-deployable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the chikungunya virus	Cross-sectional study	2016
12	Pessôa <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	Investigation into an outbreak of dengue-like illness in Pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of zika, chikungunya, and dengue virus type 1	Cross-sectional study	2016
13	Chen <i>et al.</i> ⁽¹³⁾	Development and evaluation of a sybr green-based real-time multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses	Cross-sectional study	2016
14	Abd El Wahed <i>et al.</i> ⁽¹⁴⁾	Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection	Cross-sectional study	2015
15	Xavier <i>et al.</i> ⁽¹⁵⁾	Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update	Systematic review	2017
16	Souza <i>et al.</i> ⁽¹⁶⁾	Clinical and laboratory diagnosis of congenital zika virus syndrome and diaphragmatic unilateral palsy: case report	Case study	2016
17	Acosta <i>et al.</i> ⁽¹⁷⁾	False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 Ag kits	Cross-sectional study	2014
18	Romeiro <i>et al.</i> ⁽¹⁸⁾	Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil	Cross-sectional study	2016
19	Galo <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾	Development of in-house serological methods for diagnosis and surveillance of chikungunya	Cross-sectional study	2017
20	Slavov <i>et al.</i> ⁽²⁰⁾	Simultaneous zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit	Cross-sectional study	2019

TABLE 2 – Objectives of selected articles, samples used in the studies and brief summary of the main results

Article	Objective	Samples	Target virus of the research	Main results
1	Evaluate the prevalence of DENV, OROV, CHIKV, MAYV and ZIKV in patients with acute fever disease in the city of Puerto Maldonado (Peru)	139 human serum samples	DENV CHIKV ZIKV	41 (29.5%) positive for arboviruses; 13 (9.35%) positive for CHIKV; nine (6.48%) positive for DENV; seven (5.03%) positive for ZIKV. The differentiation between arboviruses is precarious by clinic only
2	Develop and evaluate a rapid molecular diagnostic test for ZIKV with the RT-LAMP methodology	120 suspect samples, 90 serum/plasma and 99 urine	ZIKV	100% agreement between RT-LAMP and qRT-PCR, the limit of detection of qRT-PCR being the most sensitive
3	Implement a new molecular method for detecting Alphavirus	Virus strains obtained from various laboratories	CHIKV	Positivity in CHIKV samples. LoD greater than the reference test in the same methodology. Twelve virus species were tested and there was no cross-reactivity
4	Develop and validate a qRT-PCR assay capable of detecting all CHIKV lineages	RNA from virus culture and serum samples from Guatemala and Ecuador in July 2015	CHIKV	Effective assay, mainly the strain circulating in South America. Compared to CDC USA PCR, 98% sensitivity and 100% specificity
5	Implement a syndromic approach based on the use of a multiplex qPCR assay to facilitate rapid diagnosis of dengue-like syndromes in Reunion Island	Virus strains from various laboratories and positive human plasma	CHIKV DENV	Evaluation and accuracy of the assay were satisfactory for CHIKV and DENV, offering reliable answers. It has been shown to be a cheaper option than simple tests for the same pathogens
6	Investigate the usefulness of simple laboratory tests as predictive markers of confirmed DENV diagnoses, as well as to analyze the genotype and phylogenetics of the circulating strain in the dengue epidemic in Guang-Dong in 2014	1044 patients: 875 confirmed DENV cases (862 positive by NS1 and 13 by PCR) and 169 negative	DENV	Simple laboratory tests (leukopenia, thrombocytopenia, aminotransferases and activated thromboplastin time) are useful markers in the diagnosis of DENV
7	Describe the results of analyzes of infections by arboviruses imported from Italy carried out by the National Reference Laboratory for Arboviruses (NRLA) at the Italian National Institute of Health from July 2014 to October 2015	Inpatient serum samples ($n = 180$)	DENV CHIKV ZIKV	Greater number of cases of DENV. There was an increase in CHIKV cases, and the first case of ZIKV was detected. In the latter, the PRNT technique was decisive for identification; the virus was negative in serology and PCR techniques (which proved to be sensitive and specific). However, only for a short period of time, limited to viremia in the body
8	Review laboratory testing methodology to explore virus presence and immune response	Blood, serum, urine, amniotic fluid, CSF, saliva, semen, breast milk and vaginal mucosa	ZIKV	Viremia level is low in the serum, from two to 10 days, which makes molecular diagnosis difficult and increases the number of false negatives. The case study demonstrated permanence of the virus in red blood cells for 81 days, suggesting that the use of whole blood may increase sensitivity
9	Examine the diagnostic performance of real-time PCR for detection of ZIKV	Serum and urine from individuals who travelled to Brazil, Dominican Republic and Suriname between 2015 and 2016	ZIKV	Low level viremia has been shown to cause false negatives. This study found no difference between blood and urine viremias, but suggests the use of the two samples combined. Assays with NS1 are more specific and sensitive, while assays with NS3 and NS5 have low sensitivity and difficulty in specific probes, respectively
10	Describe the results found by CDC USA on the efficiency of diagnostic kits for CHIKV	Serum and plasma	CHIKV	For PCR, the NS2 target is more sensitive, but there is no publication on its validation. Other methodologies were effective and had no cross-reactions
11	Develop and evaluate a real-time PCR assay to potentially be a point of care diagnostic tool for detecting CHIKV	Human serum and plasma	CHIKV	The assay was shown to have a clinical sensitivity and specificity of 100%, a low limit of detection and only a cross-reaction with a little-known virus (O'nyong'nyong). With the use of a differentiated primer, the cross-reaction was extinguished
12	Investigate and identify viral etiology and advise health authorities on implementing control measures to contain an outbreak	77 human plasma samples, collected at Hospital Severino de Souto Siqueira, in Recife, PE, between 25 and 31 May 2015	DENV CHIKV ZIKV	31 (40.2%) patients with ZIKV infection; nine (11.7%) patients infected with DENV; one (1.3%) patient positive for CHIKV IgM, but negative in the PCR test. Coinfection by ZIKV/DENV was proven in 2.6% of patients. The study highlights the need for differentiation between viruses to improve health control measures

Cont. →

→ Cont.

13	Develop a specific, sensitive and robust assay in the RT-LAMP methodology for diagnosis and differentiation between DENV serotypes 1-4	190 serum samples	DENV serotypes 1-4	RT-LAMP results were satisfactory; this methodology was more effective than traditional PCR and real-time PCR. Results (RT-LAMP, RT-PCR, qRT-PCR): sensitivity 98.9%, 84.2% and 90.5%, respectively; specificity 100%, 93% and 100%, respectively
14	Develop two RT-RPA assays to detect DENV 1-4	Human samples from outbreaks in Senegal and Thailand	DENV serotypes 1-4	Results (RT-RPA and qRT-PCR): sensitivity 98% RNA Thailand and 72% RNA Senegal; 98% RNA Thailand and 94.4% RNA Senegal. Specificity 100% and 100%, respectively
15	Update the clinical and laboratory diagnosis of fever by VZIK	blood, saliva and urine. Amniotic fluid, CSF, placenta and umbilical cord in cases of neonatal infection	VZIK	qPCR detects acute infection within seven days of symptom onset. Blood is less sensitive than urine (15 days) and saliva. Third day of manifestation the best time for testing. In neonates with clinical symptoms and negative PCR, perform serology
16	Report a case of unilateral diaphragmatic paralysis in a neonate with a confirmed diagnosis of congenital zika by amniotic fluid examination using RT-PCR and by CSF serology	Amniotic fluid and CSF	DENV CHIKV ZIKV	Positive RT-PCR in amniotic fluid at week 29 of gestation. Negative in maternal and newborn serum after delivery (acute infection during pregnancy). IgM in newborn serum confirms intrauterine infection (IgM does not cross placental barrier)
17	Suggest that NS1 Elisa tests have low sensitivity and produce false negative results and cross reactions with other arboviruses	150 human serum samples which tested DENV negative by Elisa	DENV	33 Elisa negative samples were positive for qRT-PCR, ie 22% false negatives were truly positive; 75% were from DENV-4. Correlation with other studies in which secondary DENV infection produces false negatives in NS1 kits
18	Evaluate and optimize a diagnostic test using the qRT-PCR methodology for the Flavivirus genus	410 serum samples with acute fever, DENV negative by RT-PCR	DENV	qRT-PCR is more sensitive and specific than traditional PCR, in addition to allowing virus quantification. There was no amplification of other Flavivirus, indicating that there is no cross-reaction
19	Develop and evaluate serological methods for diagnosis and research of CHIKV in Nicaragua	260 acute and convalescent serum samples	CHIKV	qRT-PCR was used as the gold standard. Seven PCR positive samples were serologically negative; four PCR negative and serology positive samples may indicate serology cross-reactivity. Low sensitivity of serology in the acute phase, being high for PCR in the same phase
20	Report the detection of DENV and ZIKV by qRT-PCR in a pre-symptomatic blood donor, in Ribeirão Preto, São Paulo	A blood sample (plasma) from the donor	DENV ZIKV	Detection of ZIKV infection concurrently with DENV infection. 13 million copies/ml of ZIKV and 5 million copies/ml of DENV-4 were found in the same blood donor plasma

DENV: dengue; OROV: oropouche virus; CHIKV: chikungunya; MAYV: mayaro virus; ZIKV: zika virus; RT-LAMP: reverse transcription loop-mediated isothermal amplification; qRT-PCR: reverse transcriptase reaction followed by polymerase chain reaction; CDC: Centers for Disease Control and Prevention; IgM: immunoglobulin class M; RT-RPA: reverse transcriptase polymerase reaction; RNA: ribonucleic acid; CSF: cerebrospinal fluid.

TABLE 3 – Effectiveness of real-time PCR assays performed on articles selected in the integrative review

Article	Sensitivity	Limit of detection	Specificity	Cut-off value	Differentiation between viruses	Cross-reaction
1	HSe	NI	HSp	NI	Yes	No
2	NI	10 cp/assay	NI	< 35	Yes	No
3	AS	40 cp/assay	HSp	< 20.96	Yes	No
4	98.4%	19.6 cp/assay	100%	< 37	Yes	No
5	HSe	NI	HSp	< 36	Yes	No
6	NI	NI	NI	< 38	NI	NI
7	HSe	NI	HSp	NI	Yes	No
8	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	HSe	10 cp/assay	HSp	NI	Yes	No
10	HSe	5.3 cp/assay	HSp	NI	NI	NI
11	100%	80 cp/assay	100%	< 36	Yes	No
12	HSe	100 cp/ml	HSp	< 40	Yes	No
13	90.5%	100 cp/ml	100%	NI	Yes	No
14	94.4%-98%	10 cp/µl	100%	< 38	Yes	No
15	HSe	NI	HSp	NI	NI	NI

Cont. →

→ *Cont.*

16	NI	NI	NI	NI	Yes	NI
17	NI	NI	NI	< 39	Yes	NI
18	HSe	100 cp/ml	HSp	NI	Yes	No
19	NI	NI	NI	NI	Yes	No
20	NI	NI	NI	NI	Yes	No

PCR: polymerase chain reaction; HSe: high sensitivity (numeric value not informed); NI: not informed; HSp: high specificity (numeric value not informed); cp: virus copies.

Among arboviruses, the Flaviviruses (DENV, ZIKV, and YF) and Alphaviruses (CHIKV) stand out as the pathogens that cause acute febrile illness, with evolution to neurological febrile or hemorrhagic complications⁽¹²⁾. As they are cocirculating in the same geographic area, the differential diagnosis is even more difficult⁽¹³⁾. The consequences of this cocirculation are not yet fully known and can be a worsening factor in the evolution of infections⁽¹²⁾. There are reports of co-infection in the same patient with DENV-ZIKV, DENV-CHIKV or ZIKV-CHIKV⁽¹⁴⁾.

In addition to cases of coinfection, there is a concern with reinfection, especially in cases of DENV. Among arboviruses, it is the disease with the highest number of cases and the highest morbidity and mortality. The virus has four serotypes, each of which can cause a distinct infection⁽¹⁾. At each reinfection by a different serotype, the antibodies are not able to neutralize the virus and cause disease amplification mediated by antibodies [antibody-dependent enhancement (ADE)]^(12, 15). Therefore, a second DENV infection is even more serious than the first, with high-level viremia and several inflammatory markers released into the bloodstream⁽¹²⁾.

Many researches are focused on identifying whether, as in the case of a DENV reinfection, cocirculation and co-infection with ZIKV can cause ADE in secondary infections by this pathogen⁽¹⁶⁾. There are many similarities between DENV and ZIKV, which causes a large number of cross-reactions in antibodies. Some researchers have raised the possibility that ZIKV is a fifth serotype of DENV⁽¹⁷⁾, as their E protein genetic sequence is shared in a proportion between 54% and 59%⁽¹⁵⁾. Stettler *et al.* (2016)⁽¹⁸⁾ showed that there was cross-reactivity of the immune system between a previous DENV infection and a secondary ZIKV infection in the antibodies against the viral envelope domains I and II (EDI/II), causing a low neutralization of the ZIKV.

Two publications refer to co-infections. One of them reports the case of a 28-year-old female patient who was diagnosed with co-infection with DENV and CHIKV, in Fortaleza, Ceará, Brazil. A severe hematologic complication was proven in the patient due to the coinfection; initially, she presented only the nonspecific symptoms of arboviruses (fever, myalgia, and arthralgia). The patient developed acquired thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), antibody-mediated thrombocytopenia, a serious

complication of CHIKV infection⁽¹⁹⁾. The other publication, from 2019, reports the case of a pre-symptomatic blood donor. Three days after the blood donation, she showed characteristic symptoms and returned to the donation site. In the investigation, RNA of ZIKV and DENV were detected simultaneously in blood plasma collected during donation⁽²⁰⁾.

The articles selected in this integrative review had objectives such as product development, comparative analysis between methodologies and, less frequently, the review of studies on the diagnosis of arboviruses. In 20% of them, the three most epidemiologically important viruses of arboviruses were investigated, as seen in Table 2. Article 12 identified 2.6% of cases of ZIKV-DENV coinfection in a hospital in Recife, Brazil, during the 2015 outbreak, highlighting the need to distinguish the viruses to improve sanitary controls.

The importance of diagnosing arboviruses is not restricted to differentiating which agent is the cause of the infection, it is also crucial in studies investigating severe cases of diseases, such as in the associations between ZIKV and neurological disorders. In addition, diagnosis is essential in seroprevalence studies and surveillance of new epidemics⁽¹⁷⁾, as well as in alternative transmission routes⁽²¹⁾.

Molecular diagnosis of arboviruses is a widely used tool in the acute stage of infection, in which viremia is at its apex. There are several methodologies for direct pathogen research, and the real-time PCR technique demonstrates many advantages compared to others available on the market. This is due to the ease of execution of the methodology, the lower value of reagents and equipment, and the lower risk of contamination, both for the operator and the sample⁽⁹⁾.

The real-time PCR technique is a variation of traditional PCR; uses fluorescent probes that monitor the amplification of genetic material throughout the reaction. This process is called real time, as amplification and quantification occur simultaneously⁽²²⁾. It is a fast, specific, and sensitive technique that can detect more than one pathogen in the same reaction (multiplex qPCR), as long as there are different fluorescent dyes between the reagents⁽²³⁾.

The primers used for amplification are designed according to the pathogen being investigated. The development of these primers

with the help of bioinformatics has increased the sensitivity and specificity of the reagents. This is due to greater identification of genomic regions of pathogens, differentiating them from other individuals of their family or genus⁽²³⁾.

The parameters used to determine the effectiveness of an assay are sensitivity and specificity. Sensitivity refers to the test being truly positive, that is, when the individual actually has the investigated disease and the test is positive. Specificity is related to the fact that the test is truly negative when there is no disease and the result is negative. The low sensitivity of an assay produces false-negative results, and the low specificity produces false-positive results⁽²⁴⁾.

The limit of detection and occurrence of cross-reactivity are derived from these parameters. The first parameter refers to the minimum amount of an analyte, in this case, the viral RNA – capable of detecting a particular sample. The articles analyzed showed that the real-time PCR technique is very sensitive. For each gene [deoxyribonucleic acid (DNA)] or gene expression (RNA) detection, there is a limit of detection that varies from less than 100 to 5.3 copies/sample run; this last amount is considered very low and borderline in the detection of viral RNA⁽²⁵⁾.

Real-time PCR primers are designed according to the genome of the virus under investigation. In differentiating

between viruses, there is the use of distinct fluorescent reagents in different primers, highlighting each virus. In cross-reactions, the primers bind in different regions of the virus, allowing the distinction between phylogenetically similar viruses, such as ZIKV and DENV.

CONCLUSION

Real-time PCR methodology is effective in diagnosing arboviruses. It is able to differentiate DENV, ZIKV, and CHIKV viruses, with low occurrence of cross-reactivity and low nonspecific reaction. Additionally, the technique is able to identify the pathogen even at low-level viremia, which is important for early diagnosis of the disease. Diagnosis is fast, sensitive, and specific, which makes it a highly reliable diagnostic tool.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out with the support of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (Goias Research Foundation) – process number 201810267000572.

REFERENCES

1. Vasudevan RS. Dengue and zika: control and antiviral treatment strategies [Internet]. Vol. 1062. 2018. Available at: <http://www.springer.com/series/5584>.
2. Lorenz C, Aguiar BS, Azevedo TS, Chiaravalloti Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 1-19.
3. Li X, Gao X, Fu S, et al. Arboviruses and their related infections in China: a comprehensive field and laboratory investigation over the last 3 decades. *Rev Med Virol*. 2017; 1-21.
4. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2014; 5(3): 55-64. Available at: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
5. Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, et al. Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru. *PLoS One*. 2017; 12(11): 1-13.
6. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X. Emerging arboviruses: why today? 2017; 4(June): 1-13.
7. Edwards T, del Carmen Castillo Signor L, Williams C, et al. Analytical and clinical performance of a Chikungunya qRT-PCR for Central and South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017; 89(1): 35-9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.001>.
8. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan[®] assay. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 1-10.
9. Romeiro MF, de Souza WM, Tolardo AL, et al. Evaluation and optimization of SYBR green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the flavivirus genus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(3): 279-85.
10. Hu SF, Li M, Zhong LL, et al. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015; 15(1): 1-15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0595-1>.
11. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5(2): 209-19.

12. Donalisio MR, Freitas ARR, Freitas R, Von Zuben APB. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Rev Saúde Pública*. 2017; 51: 30.
13. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan[®] assay. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 1-9.
14. Chaves BA, Orfano AS, Nogueira PM, et al. Coinfection with Zika virus (ZIKV) and dengue virus results in preferential ZIKV transmission by vector bite to vertebrate host. 2018; 218: 563-71.
15. Roth C, Delgado FG, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A. Immune responses to dengue and Zika viroses — guidance for T cell vaccine development. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2018; 15(2): 1-12. Available at: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/385>.
16. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol* [Internet]. 2017; 89(8): 1477-9. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmv.24789>.
17. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017; 201704984. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1704984114>.
18. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301): 823-6.
19. Bastos MLA, Araújo RMO, Oliveira DS, Cavalcante ANM, Júnior GBS. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with dengue and chikungunya virus coinfection: case report during an epidemic period. [Internet]. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018; 1-4. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2018.05.003>.
20. Slavov S, Ferreira F, Rodrigues E, Gomes R, Covas D, Kashima S. Simultaneous Zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit. *J Vector Borne Dis*. 2019; 56(2): 166-9.
21. Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ*. 2016; 94(12): 880-92.
22. Kim T, Vo D, Bigot P, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101(5): 422-8.
23. Nunes ARD, Alves BEB, Pereira HWB, et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(5): 1-9.
24. Kawamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. *Eficiência de um teste*. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 79(2): 437-41.
25. Esposito DLA, Fonseca BAL. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(4): 465-9.

CORRESPONDING AUTHOR

Christiane Oliveira Lima Licínio  0000-0003-3114-4595
e-mail: chrislima28@hotmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

CAPÍTULO 4

ESTRUTURAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG DE ZIKA VÍRUS

RESUMO

A diferenciação entre ZIKV e DENV, feita somente por diagnóstico clínico não é confiável. O diagnóstico laboratorial é essencial para essa diferenciação, principalmente nos casos de estágio de convalescência da doença. Neste artigo, apresentamos os resultados da validação de um kit para diagnóstico de anticorpos IgG de Zika vírus. A metodologia do kit é ELISA, que é rápida, barata e se mostrou com boa acurácia. O cut-off foi determinado a partir das replicatas do controle negativo. Foram realizadas replicatas e diluições com uma amostra positiva, a fim de verificar a linearidade e exatidão do ensaio. A repetitividade do ensaio foi testada, atingindo um coeficiente de variação de 9,13%. Foram testadas 30 amostras clínicas, em triplicata, com intuito de se testar a sensibilidade e especificidade do produto. Foram obtidos 100% de especificidade e 97,9% de sensibilidade, após aplicação dos testes estatísticos. A Acurácia foi de 96,66% e o teste foi considerado eficaz para a detecção dos anticorpos IgG do Zika vírus.

PALAVRAS-CHAVE: ZIKV, ELISA, Estudos de Validação, Sensibilidade, Especificidade

ABSTRACT

The differentiation between ZIKV and DENV, made only by clinical diagnosis is not reliable. Laboratory diagnosis is essential for this differentiation, especially in cases of convalescent stage of the disease. In this paper, we present the results of the validation of a Zika virus IgG antibody diagnostic kit. The methodology of the kit is ELISA, which is fast, cheap and proved to be accurate. The cut-off was determined from the negative control replicates. Replicates and dilutions were performed with a positive sample to verify the linearity and accuracy of the assay. The repeatability of the assay was tested, reaching a coefficient of variation of 9.13%. Thirty clinical samples in triplicate were tested to test the sensitivity and specificity of the product. 100% specificity and 97.9% sensitivity were obtained after applying the statistical tests. Accuracy was 96.66% and the test was considered effective for detection of Zika virus IgG antibodies.

KEY-WORDS: ZIKV, ELISA, Validation Studies, Sensibility, Specificity

INTRODUÇÃO

O Zika vírus é um vírus RNA de sentido positivo, fita simples e que está presente no Brasil desde 2015(CALVET; DOS SANTOS; SEQUEIRA, 2016; FOCOSI; MAGGI; PISTELLO, 2016). Apresenta sintomas muito semelhantes à infecção por Dengue vírus e se concentra em áreas endêmicas desta doença. A principal preocupação nestas áreas é a diferenciação entre as duas doenças, visto que clinicamente elas se apresentam de forma muito semelhante (LI et al., 2018).

A diferenciação entre as duas doenças passa pelo diagnóstico laboratorial. Usualmente, o diagnóstico por PCR em tempo real, é considerado como *gold standard* para o ZIKV (NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017). Porém, esbarra no pequeno período de viremia no sangue periférico, que é de 3 a 5 dias após o início dos sintomas. Para identificar infecções que já não estão no período agudo, esta metodologia não é indicada. Além disso, é uma metodologia mais cara, que requer equipamentos e treinamentos de pessoal específicos, e não disponível em várias regiões do país (CHAVES et al., 2018; NUNES et al., 2018).

Uma alternativa ao diagnóstico por PCR em tempo real são os testes diagnósticos pela metodologia ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). São fáceis de execução, baratos e de procedimento simplificado. A grande maioria dos laboratórios está preparada para a execução deste tipo de ensaio (L'HUILIER et al., 2017). O ensaio de ELISA pode identificar a infecção no seu período agudo (detecção de IgM) ou no seu período de convalescência (detecção de IgG). Esse segundo caso é bastante aplicado para estudos epidemiológicos, com intuito de se averiguar a incidência das doenças (CALVET; DOS SANTOS; SEQUEIRA, 2016; VAN MEER et al., 2017).

O ensaio imunoenzimático, como também é chamado os ensaios ELISA, medem a atividade enzimática sobre um substrato, já que se utiliza de antígenos ou anticorpos marcados com enzimas, permitindo a detecção, titulação e quantificação do analito pesquisado na amostra biológica (VAZ, 2007). O ELISA, cujo termo foi utilizado pela primeira vez por Engvall e Perlmann em 1971, identifica ensaios enzimáticos heterogêneos pela técnica da imunoperoxidase. Baseia-se na imobilização de um dos reagentes em fase sólida e a ligação do outro reagente com uma enzima, preservando-se tanto a ação enzimática como a atividade imunológica do anticorpo (FERREIRA, 1996).

A validação final de um *kit* de ELISA é regularizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da Resolução de Diretoria Colegiada RDC 36 de 26 de agosto de 2015, que dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de cadastro e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro* (ANVISA, 2015). O intuito é comprovar, através de testes e ensaios, a eficácia e a conformidade aos requisitos dos usuários, em três lotes piloto do produto que se pretende comercializar. O artigo 29 da RDC 36 contém todos os itens necessários à validação do produto, para comprovar a eficácia e qualidade de desempenho.

Para efeito de se registrar um produto, todos os ensaios devem ser executados, porém para o efeito do estudo da eficácia do produto, os estudos analíticos de sensibilidade, especificidade, repetitividade e reprodutibilidade, são suficientes e comprovam que o produto está apto a desempenhar a função inicialmente proposta.

Neste artigo vamos demonstrar os resultados dos testes de validação realizados no kit para detecção de anticorpos IgG para Zika vírus, após a montagem deste produto. O objetivo é comprovar que o kit é viável, apresenta boa sensibilidade, especificidade e precisão, sendo um recurso barato, fácil de manipular e confiável para o diagnóstico da fase de convalescência da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios foram executados seguindo a padronização de uso do *kit*, realizando uma pré-diluição da amostra com 10 µL do soro em 1000 µL de diluente de amostras. Para as amostras de sangue seco, o procedimento de pré-diluição foi de um recorte do papel filtro (6 mm de diâmetro) em 1000 µL de diluente de amostras, deixando o tubo de ensaio em agitação por 1 hora. Uma rápida centrifugação foi realizada, para sedimentação das hemácias, sendo usado no teste o sobrenadante.

Ao final da pré-diluição, 100 uL das amostras diluídas em cada poço da microplaca. Ela foi incubada a +37°C por 60 minutos. Após a lavagem, foi pipetado 100 µL de Conjugado Enzimático em todos os poços, com exceção do branco. A microplaca foi incubada a +37°C por 60 minutos e ao final, nova lavagem foi realizada. Foi pipetado 100 µL de Cromógeno Substrato em todos os poços, incluindo o micropoço destinado ao branco. Essa etapa foi realizada de forma a não ter incidência de luz direta sobre a reação. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente (18° a 25°C) por 30 minutos. A reação enzimática foi bloqueada pipetando 100 µL de Solução de Parada em todos os poços. Em seguida, a intensidade da cor foi medida com um leitor de microplacas a 450nm (leitura), utilizando o poço A1 (Branco) para zerar o equipamento.

Para a determinação do cut-off do ensaio, foram feitas 20 repetições do controle negativo e lidas as respectivas absorbâncias. Foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação desses resultados. O cut-off é calculado a partir da média das absorbâncias acrescidas de três vezes o desvio padrão.

Uma amostra positiva, cuja relação S/Co era presumida, foi utilizada para realização do ensaio de Linearidade e Exatidão. O ensaio foi realizado com a amostra pura e depois uma diluição seriada, a fim de se obter o menor sinal de positividade possível. A sequência de diluições foi realizada em soro sabidamente negativo, para Zika vírus IgG. Foi realizada uma regressão linear, para se comprovar a eficácia do ensaio em detectar a menor quantidade de anticorpos presente na amostra.

Uma amostra positiva foi ensaiada em trinta replicatas, para se comprovar a repetibilidade do teste. Este ensaio auxilia na determinação da precisão do *kit* diagnóstico, evidenciando o grau de

concordância entre as várias medições sucessivas. Foram calculados a média, desvio padrão e coeficiente de variação deste ensaio.

Todas as amostras foram processadas em triplicata e, para se determinar a absorbância final, foi realizada a média entre os resultados. Após essa determinação, a relação entre a absorbância da amostra(S) pelo valor de cut-off (Co) foi determinada, para verificar se a amostra era positiva ou negativa, conforme demonstrado na Tabela 1. Os resultados foram comparados com o resultado já realizado por PCR em tempo real, quando aplicável, ou com o diagnóstico clínico citado pelo participante, em entrevista. Resultados que estejam dentro da faixa considerada “Zona Cinza” ou “Indeterminado”, são considerados como positivo ou negativo de acordo com os sintomas clínicos manifestados.

Tabela 1 - Relação entre Absorbância da Amostra (S) e o cut-off do teste (Co)

S/Co	Interpretação
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Indeterminado
> 1.1	Positivo

Fonte: Autoria própria

Apenas as amostras positivas foram testadas em papel filtro, neste primeiro momento, para testar a sensibilidade do teste. As amostras negativas serão testadas posteriormente, pois é necessário excluir fatores de interferência do sangue. As amostras positivas no papel filtro foram testadas a fim de se reproduzir a mesma absorbância do teste em soro, descartando o efeito pró-zona no teste em desenvolvimento. Este efeito pró-zona comprova que um excesso de anticorpos na amostra não produz resultados falsamente negativos.

As análises estatísticas descritivas e os cálculos de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência foram realizadas por Excel. As análises estatísticas inferenciais foram realizadas pelos programas IBM SPSS Statistics versão 25 e Minitab Statistic Software versão 19.

RESULTADOS

Este estudo foi realizado com 30 amostras de soro e sangue seco. Quinze destas amostras foram gentilmente cedidas pelo IMTUSP, sendo todas positivas para ZIKV. Tais amostras foram obtidas durante o surto de 2016 em Araraquara-SP. Na ocasião da coleta, todas as amostras de soro foram testadas por PCR em tempo real, além do plasma e urina dos participantes. Com exceção da

amostra 15, todas as amostras de soro foram positivas pela metodologia de PCR em tempo real. A amostra 15 foi positiva apenas em urina. As demais amostras foram obtidas por participação de pessoas (n=8) que manifestaram os sintomas clínicos de ZIKV ou DENV, e pela aquisição de um painel sorológico da empresa Controllab (n=7), com amostras positivas e negativas.

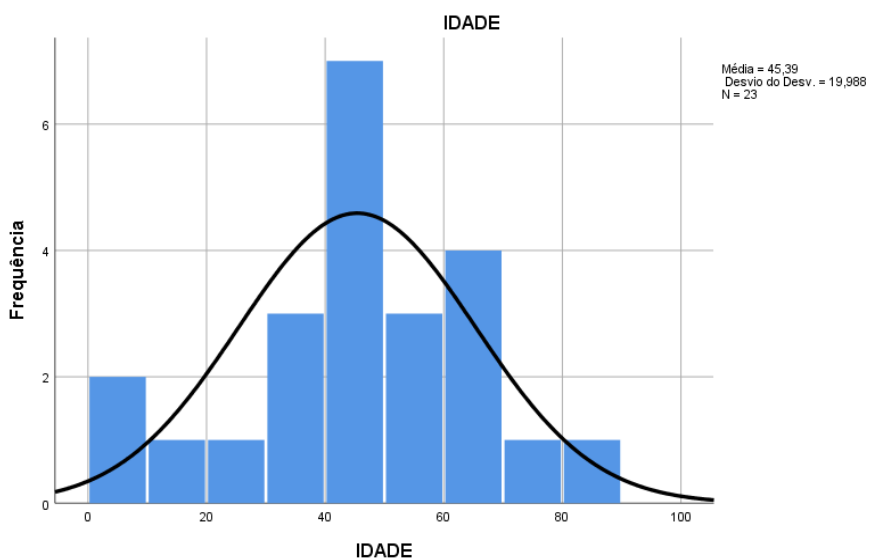
As amostras foram, em sua maioria, conforme mostra a Tabela 2, coletadas em pacientes do sexo feminino (60%). O sexo masculino representou 16,7% do estudo e o restante, 23,3%, foram as amostras de painel sorológico, em que não há definição do sexo. Quanto à idade dos participantes (n=23), a média foi de 45 anos, sendo o mais jovem com 7 anos e o mais idoso com 80 anos, conforme demonstrado na Tabela 3. O Histograma com a demonstração da distribuição das idades dos participantes foi demonstrado na Figura 1.

Tabela 2 - Distribuição do sexo das amostras coletadas

		Sexo			
		Frequência	Porcentagem	Porcentagem válida	Porcentagem acumulativa
Válido	Feminino	18	60,0	60,0	60,0
	Masculino	5	16,7	16,7	76,7
	NA	7	23,3	23,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Figura 1 - Histograma da distribuição da idade dos participantes



Fonte: IBM SPSS 25, 2019

O primeiro ensaio realizado foi a determinação do cut-off. Ele é de fundamental importância, pois a relação entre a absorvância do teste e o cut-off determina a interpretação da positividade ou negatividade da amostra, conforme demonstrado pela Tabela 1. O cut-off foi realizado com a repetição do controle negativo, por 20 vezes.

Tabela 3 - Distribuição de idade dos participantes do estudo

		Estatística Descritiva				
	N	Intervalo	Mínimo	Máximo	Média	Erro desvio
IDADE	23	73,0	7,0	80,0	45,3913	19,98804
N válido (de lista)	23					

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

A média da absorvância do controle negativo reflete o comportamento das absorvâncias que as amostras consideradas negativas apresentam. Para se determinar um ponto de corte (cut-off) confiável, que considere a variabilidade de amostras possíveis em um ensaio, a média da absorvância é somada a três vezes o desvio padrão. A Tabela 4 mostra os cálculos descritivos das replicatas, demonstrando a média (0,126), desvio padrão (0,024) e o Intervalo de Confiança (IC95%,: 0,114 – 0,136). A Tabela 5 traz o cálculo do cut-off, que é 0,198. O teste de Kolmogorov-Smirnov aplicado e as amostras foram consideradas normais.

Tabela 4 - Estatísticas Descritivas das replicatas do Controle Negativo

		Estatística	Erro	
CONTROLE NEGATIVO	Média	0,12560	0,005282	
	95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	0,11455	
		Limite superior	0,13665	
	5% da média aparada	0,12500		
	Mediana	0,12500		
	Variância	0,001		
	Erro Desvio	0,023621		
	Mínimo	0,085		
	Máximo	0,177		
Amplitude interquartil	0,035			

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

A hipótese nula (Ho) confirmada, ou seja, não há diferença entre as amostras, conforme Tabela 6. Foi gerado um gráfico com a distribuição das absorvâncias das replicatas das amostras negativas, como demonstra a Figura 2. A distribuição das replicatas se concentra em torno do primeiro percentil, ou seja, estão distribuídas em torno de um mesmo eixo.

Tabela 5 - Cálculo de cut-off a partir das absorvâncias do Controle Negativo

Cut off = Média abs + 3*DP
Co = 0,126 + 3*0,024
Co = 0,198

Fonte: Excel, 2019

A seguir foi realizado o ensaio com uma amostra positiva, cuja relação S/Co era presumida. Tal amostra foi ensaiada em uma diluição seriada, a partir da amostra pura, por sete vezes. A Tabela 7 traz as informações da amostra. Esse ensaio com a amostra positiva, após ser diluída em série, é capaz de demonstrar a capacidade do teste em recuperar o analito, mesmo com a diluição da quantidade de anticorpos, mantendo uma linearidade e comprovando a exatidão de resultados. A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Pode ser comprovada pelo coeficiente de correlação do gráfico analítico $R^2 \geq 0,95$, assim como a Exatidão de Medição. Esse coeficiente é calculado por técnicas estatísticas e uma medição é dita mais exata quando é caracterizada por um erro de medição menor.

Tabela 6 - Teste de Kolmogorov-Smirnov para replicatas do Controle Negativo

Resumo de Teste de Hipótese				
	Hipótese nula	Teste	Sig.	Decisão
1	A distribuição de CONTROLE NEGATIVO é normal com média 0,126 e desvio padrão 0,024	Teste de Kolmogorov-Smirnov de uma amostra	0,200 ^{1,2}	Reter a hipótese nula

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é 0,05

¹ Lilliefors Corrigido

² Este é um limite inferior da significância verdadeira

Teste de Kolmogorov-Smirnov de uma amostra

		CONTROLE NEGATIVO
N		20
Parâmetros normais ^{a,b}	Média	0,12560
	Desvio Padrão	0,023621
Diferenças Mais Extremas	Absoluto	0,129
	Positivo	0,101
	Negativo	- 0,129
Estatística do teste		0,129
Significância Sig. (bilateral)		0,200 ^{c,d}

a. A distribuição do teste é Normal.

b. Calculado dos dados.

c. Correção de Significância de Lilliefors.

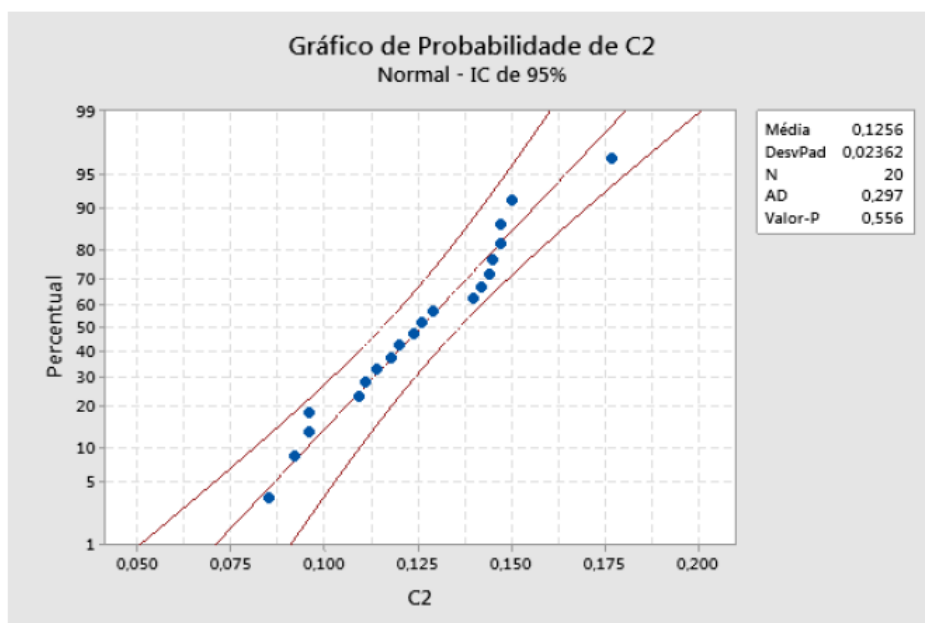
d. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Figura 2 - Gráfico de probabilidade do ensaio de controle negativo

CONTROLE NEGATIVO

Gráfico de Probabilidade de C2



Fonte: Minitab 19, 2019

Tabela 7 - Diluição seriada da amostra positiva

AMOSTRA	S/Co	Valores Esperados	RESULTADO
Amotra pura	7,768	9,000	POSITIVO
Diluição 1	4,379	4,500	POSITIVO
Diluição 2	2,742	2,250	POSITIVO
Diluição 3	1,444	1,125	POSITIVO
Diluição 4	0,884	0,563	NEGATIVO
Diluição 5	0,515	0,281	NEGATIVO
Diluição 6	0,227	0,141	NEGATIVO
Diluição 7	0,005	0,070	NEGATIVO

Fonte: Excel, 2019

Para se demonstrar que há correlação entre a amostra positiva ensaiada e os valores esperados, foram realizadas as Correlações de Pearson (Tabela 8) e o teste de Qui-Quadrado (R^2 - Tabela 9). Ambos demonstram que a hipótese nula é verdadeira, assumindo que não diferença entre as duas variáveis, sendo o $R^2 = 0,98$, acima do valor de referência. A Correlação de Pearson (0,994) demonstra um alto grau de associação entre as duas variáveis. A Figura 3 ilustra a distribuição dos resultados, demonstrando que as variáveis se comportam de modo semelhante.

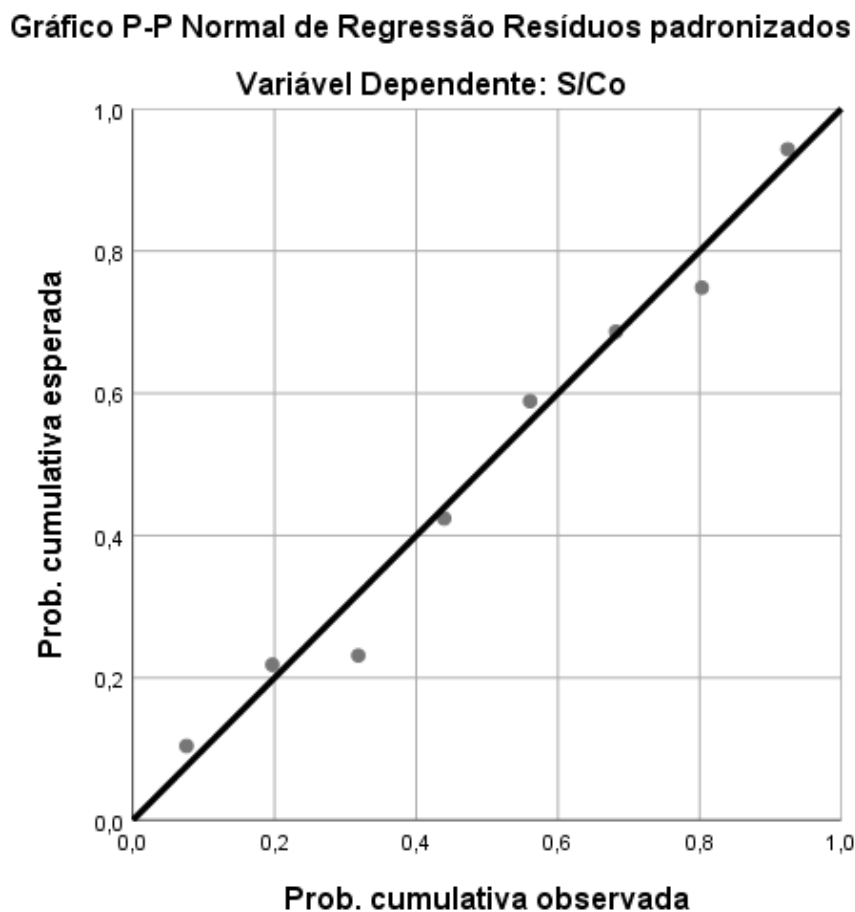
Tabela 8 - Correlações entre a amostra positiva diluída e os valores esperados desta diluição

		Correlações	
		S/Co	Valores Esperados
S/Co	Correlação de Pearson	1	0,994**
	Sig. (2 extremidades)		0,000
	N	8	8
Valores Esperados	Correlação de Pearson	0,994**	1
	Sig. (2 extremidades)	0,000	
	N	8	8

** . A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Figura 3 - Gráfico do teste de Qui-Quadrado das amostras positivas



Fonte: IBM SPSS 25, 2019

O último teste realizado, antes de testar as amostras clínicas, foi o teste de Repetitividade. Consiste na precisão do procedimento quando repetido pelo mesmo analista, sob as mesmas condições (mesmos reagentes, equipamentos, aparelhos e laboratórios) e dentro de um curto espaço de tempo, de uma mesma amostra. Neste estudo, foi usada apenas uma amostra positiva, ensaiada em 30 replicatas. O Coeficiente de Variação não deve exceder 20% para a amostra testada. A Tabela 10 demonstra os resultados estatísticos do ensaio de Repetitividade. O Coeficiente de Variação foi calculado em Excel e seu resultado foi 9,13%.

A Figura 4 ilustra a distribuição das absorvâncias da Repetitividade. O limite inferior aceitável é de 0,679, e foi calculado pela variação de 20% a menos da média de todas as absorvâncias. O limite superior foi calculado pelo Programa Estatístico Minitab, sendo o limite inferior mais quatro vezes o desvio padrão, e não supera a maior leitura de absorvância do teste, que foi de 1,016. Assim como nas replicatas de controle negativo, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi

aplicado, e a distribuição das amostras foi considerado normal. A hipótese nula (H_0) confirmada, ou seja, não há diferença entre as amostras, conforme Tabela 11.

Tabela 9 - Teste do Qui-Quadrado (R^2) para a amostra positiva diluída e os valores esperados desta diluição

Modelo	R	R ²	R ² ajustado	Erro padrão da estimativa	Estatísticas de mudança				
					Mudança de R ²	Mudança F	df1	df2	Sig. Mudança F
1	0,994 ^a	0,988	0,987	0,309514	0,988	514,623	1	6	0,000

a. Preditores: (Constante), Valores Esperados

b. Variável Dependente: S/Co

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Tabela 10 - Estatísticas Descritivas da Repetitividade de amostra positiva

REPETITIVIDADE – AMOSTRA POSITIVA

		Estatística	Erro	
REPETITIVIDADE	Média	0,84817	0,015701	
	95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	0,81606	
		Limite superior	0,88028	
	5% da média aparada	0,84789		
	Mediana	0,84700		
	Variância	0,007		
	Erro Desvio	0,085996		
	Mínimo	0,697		
	Máximo	1,016		
	Intervalo	0,319		
	Amplitude interquartil	0,115		
	Assimetria	0,064	0,427	
	Curtose	- 0,783	0,833	

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Figura 4 - Repetitividade das replicatas de amostra positiva



Fonte: Minitab 19, 2019

O processamento das amostras clínicas, coletadas em participantes voluntários do projeto, as amostras cedidas pelo IMTUSP e o painel de sorologia adquirido da empresa Controllab, foram realizados em triplicata. Uma média das absorvâncias de cada amostra foi calculada e usada como valor único para realização dos estudos estatísticos. Esse ensaio tinha como objetivo avaliar a utilidade de um teste diagnóstico para o rastreamento das populações sadias, diagnosticando uma determinada doença em pessoas com sintomas clínicos sugestivos.

As amostras cedidas pelo IMTUSP e o painel de sorologia foram testados previamente pela metodologia de PCR em tempo real. As demais amostras (n=8) foram consideradas positivas ou negativas, por diagnóstico clínico à época da manifestação clínica da doença. Dentre as amostras negativas desta categoria, todos foram diagnosticados com DENV.

Foi realizado o testes de Mc Nemar, para a comparação dos resultados obtidos pela *kit* de ELISA ZIKV IgG e o resultado obtido previamente, por PCR em tempo real ou diagnóstico clínico. A Tabela 12 mostra os resultados deste teste, aplicado por serem duas variáveis qualitativas categóricas. A hipótese nula (H_0) foi confirmada, ou seja, não há discordância entre os pares de dados.

Tabela 11 - Teste de Kolmogorov-Smirnov para ensaio de Repetitividade de amostra positiva

Resumo de Teste de Hipótese

	Hipótese nula	Teste	Sig.	Decisão
1	A distribuição de REPETITIVIDADE é normal com média 0,848 e desvio padrão 0,086	Teste de Kolmogorov-Smirnov de uma amostra	0,200 ^{1,2}	Reter a hipótese nula

São exibidas significâncias assintóticas. O nível de significância é 0,05

¹ Lilliefors Corrigido

² Este é um limite inferior da significância verdadeira

Teste de Kolmogorov-Smirnov de uma amostra

		REPETITIVIDADE
	N	30
Parâmetros normais ^{a,b}	Média	0,84817
	Desvio Padrão	0,085996
Diferenças Mais Extremas	Absoluto	0,087
	Positivo	0,087
	Negativo	- 0,066
Estatística do teste		0,087
Significância Sig. (bilateral)		0,200 ^{c,d}

a. A distribuição do teste é Normal.

b. Calculado dos dados.

c. Correção de Significância de Lilliefors.

d. Este é um limite inferior da significância verdadeira.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Os cálculos feitos a partir das fórmulas manuais demonstram resultados de 95,45% de sensibilidade e de 100% de especificidade. Eles estão descritos na Tabela 13. Esse resultado foi obtido pela discrepância entre o resultado do *kit* e o diagnóstico prévio, no paciente de número 15. Porém, mesmo no diagnóstico prévio, esse paciente havia apresentado resultado negativo para ZIKV na sua amostra de soro. A infecção foi confirmada com a positividade da amostra de urina.

Tabela 12 - Teste de McNemar para resultados das amostras clínicas

Tabulação cruzada RESULTADO SORO * RESULTADO REAL

		RESULTADO REAL		Total
		Negativo	Positivo	
RESULTADO SORO	Negativo	6	1	7
	Positivo	0	23	23
Total		6	24	30

Testes qui-quadrado

	Valor	Sig exata (2 lados)
Teste de McNemar		1,000 ^a
N de Casos Válidos	30	

a. Distribuição binomial usada.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Tabela 13 - Cálculo de Sensibilidade e Especificidade das amostras clínicas, comparando os resultados obtidos com os resultados prévios

Tabulação cruzada RESULTADO SORO * RESULTADO REAL

		RESULTADO REAL		Total
		Negativo	Positivo	
RESULTADO SORO	Negativo	6	1	7
	Positivo	0	23	23
Total		6	24	30

Sensibilidade = $23/24 = 95,83\%$

VPP = $23/24 = 95,83\%$

Especificidade = $6/6 = 100\%$

VPN = $6/6 = 100$

Acurácia = $29/30 = 96,66\%$

Fonte: Autoria própria

Os valores preditivos positivo e negativo foram 95,83% e 100%, respectivamente. A Acurácia, ou eficiência do teste, foi de 96,66%. O índice Kappa, que analisa a concordância entre

dois ensaios, foi de 0,902, o que demonstra uma excelente comparação entre os resultados, conforme demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Cálculo do Índice Kappa em comparação aos resultados do ensaio de amostras clínicas e os resultados prévios

		ÍNDICE KAPPA			
		Valor	Erro Padrão Assintótico ^a	T Aproximado ^b	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	0,902	0,096	4,964	0,000
N de Casos Válidos		30			

a. Não considerando a hipótese nula.

b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Também foi realizado o teste de Curva ROC, para a comparação entre os resultados obtidos pelo ensaio e os resultados prévios. A área sob a curva foi de 0,979, indicando um excelente desempenho do teste, conforme demonstra a Tabela 15. Houve a sobreposição da curva ao eixo Y, demonstrando uma sensibilidade bastante próxima de 100%, conforme demonstra a Figura 5.

Tabela 15 - Área sob a curva ROC da comparação entre os resultados obtidos e resultados prévios das amostras clínicas

Resumo de processamento do caso

RESULTADO RT	N válido (de lista)
Positivo ^a	24
Negativo	6

Os valores maiores da(s) variável(eis) de resultado de teste indicam uma evidência mais forte de um estado real positivo.

^a O estado real positivo é Positivo

Área sob a curva

Variável(eis) de resultado de teste: RESULTADO SORO

Área	Erro ^a	Sig. Assintótico ^b	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
			Limite Inferior	Limite superior
0,979 ^a	0,025	0,000	0,930	1,000

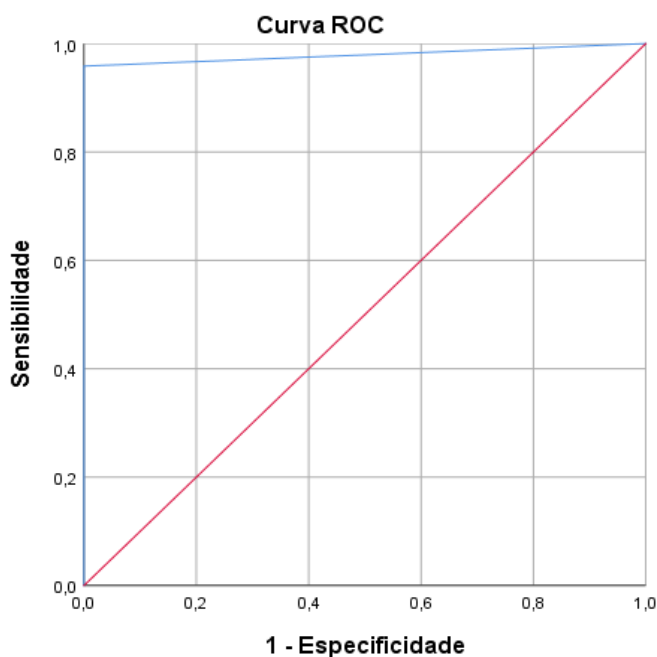
^a Sob a suposição não paramétrica

^b Hipótese nula: área verdadeira = 0,5

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

O último ensaio realizado com as amostras clínicas foi com as amostras positivas coletadas em papel filtro. O processamento destas amostras confirma a exclusão do efeito pró-zona no ensaio, uma vez que a concentração de analitos (anticorpos) presentes nessa amostra é superior, comparada à amostra diluída de soro utilizada para realização do ensaio clínico. Foram comparadas as absorbâncias das amostras em soro com as amostras em papel filtro. A hipótese nula foi definida como não havendo diferença entre as absorbâncias, visto que o ensaio não produz resultados falsos negativos pelo excesso de anticorpos na amostra.

Figura 5 - Curva ROC de comparação entre os resultados obtidos pelo teste e resultados prévios da amostras clínicas



Os segmentos diagonais são produzidos por empates.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

O teste de Friedman e de Wilcoxon foram realizados, pois são amostras pareadas avaliadas em formas distintas. Em ambos testes a hipótese nula foi confirmada, demonstrando não haver diferença entre os ensaios de soro e de papel filtro, conforme demonstram as Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Teste de Wilcoxon para a comparação dos resultados de absorbância em soro e papel filtro

Postos

		N	Posto Médio	Soma das classificações
PAPEL ABS – SORO ABS	Classificações Negativas	16 ^a	14,50	232,00
	Classificações Positivas	14 ^b	16,64	232,00
	Empates	0 ^c		
	Total	30		

^a PAPEL ABS < SORO ABS

^b PAPEL ABS > SORO ABS

^c PAPEL ABS = SORO ABS

Estatísticas de teste^a

	PAPEL ABS – SORO ABS
Z	0,010 ^b
Significância Sig. (bilateral)	0,992

a. Teste de Classificações Assinadas por Wilcoxon.

b. Com base em postos negativos.

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

Tabela 17- Teste de Friedman para a comparação dos resultados de absorvância em soro e papel

Postos		Estatísticas de teste ^a	
	Posto Médio	N	30
SORO ABS	1,53	Qui-quadrado	0,133
PAPEL ABS	1,47	gl	1
		Significância Sig.	0,715

^a Teste de Friedman

Fonte: IBM SPSS 25, 2019

DISCUSSÃO

Não há uma literatura específica de como os testes de validação de um *kit* para diagnóstico *in vitro* devem ser feitos. A legislação da Anvisa, RDC 36 de 2015, determina quais os estudos devem ser realizados, mas não diz como fazê-los. Cabe a cada time de desenvolvimento, a tarefa de dizer como fazer e quais os parâmetros de aprovação.

Várias etapas são requeridas para uma completa validação de um *kit* de diagnóstico *in vitro*, e todo esse processo pode levar meses a anos para ser realizado. São necessários os estudos analíticos, de estabilidade e os ensaios clínicos. Aqui nesta pesquisa, foi proposta a realização de apenas uma etapa desta validação, os estudos analíticos. Para tal fim, foram propostas as análises da exatidão e linearidade, sensibilidade analítica, especificidade analítica e repetitividade.

O valor de *cut-off* é definido como o ponto de decisão clínica (ANVISA, 2015). A Linearidade é a capacidade do método analítico de obter respostas proporcionais à concentração do analito na amostra. A Exatidão é a capacidade do teste em reproduzir respostas o mais próximo possível do real valor (INMETRO, 2018). Sensibilidade e Especificidade Analíticas referem-se à capacidade do método obter resultados positivos em amostras consideradas positivas pelo método de referência, e a capacidade de se obter resultados negativos quando há outros interferentes, que podem positivar a amostra, respectivamente (ANVISA, 2015). A Repetitividade é a obtenção de um mesmo resultado em circunstâncias iguais e deve ser medida a dispersão desses resultados (INMETRO, 2018).

A partir dessas determinações foi possível a determinação de outros indicadores de qualidade do produto. A Acurácia determina a proporção de diagnósticos corretos. O Índice Kappa é uma maneira muito utilizada para expressar a confiabilidade de um teste, por ser um indicador de

concordância ajustada, levando em consideração a concordância devido ao acaso. O Valor Preditivo Positivo (VPP) é definido como, é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste. Quanto maior a especificidade do teste, maior será o VPP e maior a segurança de que o paciente com resultado positivo esteja realmente doente. O Valor Preditivo Negativo (VPN) é a proporção de não doentes entre os negativos pelo teste. Quanto maior a sensibilidade do teste, maior será o VPN e maior a segurança de que o paciente com resultado negativo esteja realmente não doente (sadio) (VAZ, 2007).

O VPP é mais influenciado pela prevalência do que o VPN, por isso em imunoenaios, resultados negativos são bem aceitos, enquanto os resultados positivos, freqüentemente precisam ser confirmados. Enquanto a sensibilidade e especificidade de um teste são prioridades inerentes ao teste e não variam, a não ser por erro técnico, os VPs dependem da prevalência da doença na população de estudo. Quanto maior a prevalência da doença, maior será o VPP e menor será o VPN, isto é, quanto mais frequente é uma doença mais provável é encontrar verdadeiros positivos, mas também é mais provável encontrar falsos negativos. Quanto maior a especificidade do teste, maior será o VPP e maior a segurança de que o paciente com resultado positivo esteja realmente doente (VAZ, 2007).

Quando a intenção é a certeza diagnóstica de uma doença, como nos casos de exames de rastreamento, o melhor teste é aquele com alta especificidade, pois terá mais impacto no valor preditivo positivo (VPP). Ou seja, se o teste der positivo, é muito pouco provável que a pessoa não esteja de fato doente. Como nos laboratórios clínicos, que se minimiza a chance de resultados falso-positivos, o que agrega ao resultado do teste alto valor clínico, havendo, entretanto, resultados falso-negativos (VAZ, 2007).

Quando a intenção for afastar o diagnóstico de uma doença ou condição, como por exemplo, em paciente suspeito de recidiva ou progressão, considera-se que o melhor teste deve ter alta sensibilidade, pois terá mais impacto no valor preditivo negativo (VPN). Ou seja, se o teste der resultado negativo é muito pouco provável que a pessoa esteja de fato doente. Como nos bancos de sangue, que se faz necessário um teste com máxima sensibilidade, uma vez que qualquer risco de doença infecciosa transmissível pelo sangue deve ser evitado, minimizando ao máximo a presença de resultados falso-negativos, ocorrendo um significativo número de casos falso-positivos, que deverão ser confirmados (VAZ, 2007).

A curva ROC é utilizada para minimizar ao máximo os eventuais falsos resultados, definida com a descrição gráfica do desempenho de um teste, representado pela relação entre a taxa de verdadeiro-positivos (sensibilidade) e a taxa de falso-positivos ($1 - \text{especificidade}$). Se um teste diagnóstico tiver a acurácia perfeita, com 100% de verdadeiro-positivos, a curva ROC irá se sobrepor ao eixo y. Como na prática dificilmente encontramos tal situação, a maior acurácia de um teste será

caracterizada por uma alta proporção de resultados verdadeiro-positivos e uma baixa proporção de resultados falso-positivos, correspondendo ao ponto de corte (*cut off*) ideal na curva ROC como o ponto situado mais acima e mais à esquerda (MARTINEZ, 2003)

A acurácia global de um teste pode ser descrita como a área sob a curva ROC. Quando um modelo se torna mais perfeito (sensibilidade e especificidade próximas a 100%), a área sob a curva aproxima-se de 1,0; quando o desempenho do modelo torna-se mais randômico, a área sob a curva aproxima-se de 0,5, representado graficamente como uma linha de 45°; nesse caso a capacidade de previsão do teste não é superior ao puro acaso, não possuindo capacidade discriminatória (MARTINEZ, 2003).

O primeiro passo para a avaliação da desempenho do *kit* para detecção de anticorpos IgG de ZIKV, pela metodologia ELISA, foi a determinação do *cut-off*. Sem essa determinação, não seria possível a identificação de quais amostras seriam consideradas positivas e quais seriam consideradas negativas. Para se ter confiabilidade de que o valor de *cut-off* (0,198) não foi obtido ao acaso, foi aplicado o teste estatístico de Kolmogorov-Smirnov para atestar que a distribuição das replicatas era normal. Como o resultado foi 0,200 ($p > 0,05$), a hipótese nula, em que as amostras seguem uma distribuição normal, foi aceita. A Repetitividade também foi confirmada com o sendo confiável através do teste de estatístico de Kolmogorov-Smirnov, obtendo mesmos resultados do ensaio de *cut-off*.

A Linearidade e a Exatidão foram confirmadas com os testes estatísticos de Correlação de Pearson e teste do Qui-Quadrado. Ambos os testes obtiveram resultados satisfatórios, 0,994 e 0,988 respectivamente, sinalizando que o ensaio possui excelente linearidade, ou seja, é capaz de detectar os anticorpos anti-ZIKV até mesmo em baixas diluições, e bem próximo do real valor em que deve ser encontrado. Demonstraram que a hipótese nula é verdadeira, assumindo que não diferença entre as duas variáveis, sendo o $R^2 = 0,98$, acima do valor de referência. Com isso, o teste da amostra positiva comprova que o kit de ELISA para IgG do Zika vírus tem excelente linearidade e exatidão.

A Sensibilidade do kit, calculada manualmente a partir da tabulação dos resultados nas amostras clínicas, foi satisfatória (95,85%), porém aquém da sensibilidade esperada, que era de 98%. O cálculo de VPP foi coincidente com o valor de sensibilidade. A Acurácia, que é considerada como o cálculo da sensibilidade ajustada, foi de 96,66% neste cálculo manual. Ao fazermos o cálculo pelo teste estatístico da Curva ROC, a Sensibilidade ajustada é de 97,9%, visto que é a área sob a curva, bem próximo aos esperados 98% de Sensibilidade. Deve ser levado em consideração de que a amostra falso-negativa apresentada pelo ensaio, também foi falso-negativa ao ser testada no soro pela metodologia de PCR tempo real. A infecção por ZIKV neste paciente, só foi detectada pela amostra

de urina. Pela literatura, foi possível identificar que a urina é a matriz biológica que apresenta maior período de viremia, durante a infecção pelo ZIKV.

Outra amostra que deve ser destacada, é a amostra do paciente 17, que foi diagnosticado como portador da Síndrome de Guillain-Barré. A relação S/Co da amostra foi de 1,046. Este valor é considerado como Indeterminado ou dentro da “Zona Cinza”. Para caracterizá-lo como positivo, foi levado em consideração os sintomas clínicos apresentados pelo paciente à época da infecção e o diagnóstico clínico efetuado pelo médico assistente.

A Especificidade do ensaio foi considerada excelente, apesar de poucas amostras negativas do ensaio. Por outro lado, todas as amostras negativas para ZIKV eram positivas para DENV. Conforme visto na literatura, os anticorpos para DENV são considerados os maiores causadores de reação cruzada com nos ensaios para ZIKV. A Especificidade do ensaio foi de 100%. . O cálculo de VPN foi coincidente com o valor de especificidade. O Índice Kappa entre os resultados prévios e os resultados do ensaio em análise, foi de 0,902. Este índice é considerado como excelente e leva em consideração a Sensibilidade e a Especificidade do *kit*.

A maioria dos estudos em *kits* diagnósticos para ZIKV apresentam ou baixa sensibilidade ou baixa especificidade. Kikuti et al. realizaram um estudo em 2018 com pacientes de áreas endêmicas de ZIKV e DENV, encontraram 40 amostras, que eram positivas para DENV, que foram positivas para ZIKV, em um *kit* comercial de ELISA IgG para ZIKV. A sensibilidade foi de 100% mas a especificidade foi de 41,7%. Ou seja, alto índice de reação cruzada com anticorpos de DENV (KIKUTI et al., 2018). O *kit* em validação neste estudo não apresentou reação cruzada, nos casos negativos de ZIKV e positivos para DENV.

A concordância dos resultados positivos em papel filtro com os resultados em soro, foi testadas com os testes estatísticos de Wilcoxon e Friedman. Estes testes foram usados, pelas amostras serem ordinais e pareadas. A intenção era demonstrar, que mesmo com excesso de anticorpos, os resultados são semelhantes, demonstrando assim a reprodutibilidade em matriz diversa e que o produto não sofre o efeito Pró-zona. Os resultados foram de 0,992 para o teste de Wilcoxon e 0,715 para o teste de Friedman.

CONCLUSÃO

Foi estruturado um *kit* para detecção de anticorpos IgG do ZIKV. A microplaca sensibilizada com a proteína NS1 do vírus e o conjugado enzimático foram adquiridos prontos, importados da empresa Dia.pro, localizada em Milão, Itália. Os demais componentes foram produzidos pela pesquisa. A validação foi realizada com 30 amostras, 15 delas provindas do IMTUSP positivas para

ZIKV. As demais amostras, 7 foram coletadas a partir de busca ativa na população e 8 controles comerciais.

A linearidade e a exatidão do kit foram comprovadas, através da diluição de uma amostra positiva e a obtenção da correlação $R^2 = 0,994$. O *cut-off* (Co) foi determinado, como 0,198. A sensibilidade analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 97,8% ajustado. A especificidade analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 100%. Não houve reação cruzada com os anticorpos anti-DENV em nenhuma das amostras analisadas. A repetitividade do ensaio foi comprovada, demonstrando a precisão intra-ensaio do *kit*. O coeficiente de variação entre as amostras foi de 9,13%. Foi comprovada a conformidade do produto, com as especificações do usuário, através dos testes estatísticos que comprovam a Acurácia e Eficácia do produto. O ensaio foi validado, não produzindo o efeito prózona, fato comprovado pela comparação dos resultados em soro com amostras coletadas em papel filtro. O teste de Wilcoxon para o ensaio de efeito prózona foi de 0,992. O índice Kappa, que comparou os resultados do *kit* com os resultados pela metodologia *gold standard* PCR em tempo real, foi de 0,902. Este resultado demonstra uma excelente comparação entre os resultados das duas metodologias. Portanto, o kit de metodologia ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG para o ZIKV, comprovou ser uma ótima ferramenta para o diagnóstico diferencial da infecção por ZIKV.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Dentro dos aspectos éticos o estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Goiás, e foi aprovado sob o protocolo nº 11018119.2.0000.8113. Foi respeitado os preceitos da experimentação com seres humanos, de acordo com a Portaria 466/12, do CNS- Conselho Nacional de Saúde. A todos os participantes serão explícitas as condições de participação do estudo e as normas éticas, incluindo a assinatura o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, em casos de crianças e adolescentes, na ocasião da abordagem para participação do estudo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – processo número 201810267000572.

REFERÊNCIAS

CALVET, G. A.; DOS SANTOS, F. B.; SEQUEIRA, P. C. Zika virus infection: Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459–466, 2016. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=27496713>>.

CHAVES, B. A.; ORFANO, A. S.; NOGUEIRA, P. M.; RODRIGUES, N. B.; CAMPOLINA, T. B.; NACIF-PIMENTA, R.; CLARA, A.; MACHADO, A.; BENTES, A.; JÚNIOR, V.; PAZ, C.; BEATRIZ, E.; VALE, G.; GUERRA, B.; SILVA, B. M.; MELO, F. F. De; NORRIS, D. E.; VINÍCIUS, M.; LACERDA, G. De; FILEMON, P.; PIMENTA, P.; FRANCINETE, N.; SECUNDINO, C. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. v. 218, p. 563–571, 2018.

FOCOSI, D.; MAGGI, F.; PISTELLO, M. Zika virus: Implications for public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 227–233, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299941290_Zika_Virus_Implications_for_Public_Health>.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. p. 31, 2018. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>.

KIKUTI, M.; TAURO, L. B.; MOREIRA, P. S. S.; CAMPOS, G. S.; PAPLOSKI, I. A. D.; WEAVER, S. C.; REIS, M. G.; KITRON, U.; RIBEIRO, G. S. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.

L'HUILIER, A. G.; HAMID-ALLIE, A.; KRISTJANSON, E.; PAPAGEORGIOU, L.; HUNG, S.; WONG, C. F.; STEIN, D. R.; OLSHA, R.; GONEAU, L. W.; DIMITROVA, K.; DREBOT, M.; SAFRONETZ, D.; GUBBAY, J. B. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, 2017.

LI, M.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; WANG, X.; HONG, W.; SUN, J.; LIU, R.; YU, L.; WANG, J.; ZHANG, F.; JIN, X. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–23, 2018.

MARTINEZ,

E.

Z.

2003_a_curva_ROC_para_testes_diagnosticos_cadernos_saude_coletiva_vol11_JanJun.pdf, 2003. .

NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13036-016-0046-z>>.

NUNES, A. R. D.; ALVES, B. E. B.; PEREIRA, H. W. B.; NASCIMENTO, Y. M.; MORAIS, I. C.; FERNANDES, J. V.; ARAÚJO, J. M. G.; LANZA, D. C. F. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. v. 113, n. 5, p. 1–9, 2018.

VAN MEER, M. P. A.; MÖGLING, R.; KLAASSE, J.; CHANDLER, F. D.; PAS, S. D.; VAN DER EIJK, A. A.; KOOPMANS, M. P. G.; REUSKEN, C. B. E. M.; GEURTSVANKESSEL, C. H. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. **Journal of Clinical Virology**, v. 92, n. April, p. 25–31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.001>>.

CAPÍTULO 5

RELATO DE CASO DE SÍNDROME DE GUILLAIN BARRÉ

**ARTIGO DE RELATO DE CASO A SER PUBLICADO NA REVISTA DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL
QUALIS CAPES B1 - INTERDISCIPLINAR**

RESUMO

A Síndrome de Guillain-Barrè é uma complicação neurológica inflamatória, que pode acontecer pós-infecção por Zika vírus. Geralmente é diagnosticada pelos sintomas apresentados pelo paciente como fraqueza nos músculos, perda de sensibilidade nas extremidades e diminuição dos reflexos. Neste artigo, apresentaremos um relato de caso de um paciente acometido pela GBS, possivelmente após uma infecção por Zika vírus. Não foi feito um diagnóstico sorológico do paciente, para DENV e ZIKV, à época da infecção. Somente a infecção por CHIKV foi descartada por ELISA IgM e IgG. Um teste para diagnóstico de anticorpos IgG para Zika vírus foi realizado durante a validação de um produto em estudo. Foi coletado sangue total em tubo com gel separador. O resultado foi indeterminado no teste, mas considerado positivo pelos sintomas clínicos e consequências da infecção.

PALAVRAS-CHAVE: Síndrome de Guillain-Barrè, Zika vírus, ELISA

ABSTRACT

Guillain-Barrè Syndrome is an inflammatory neurological complication that can occur post Zika virus infection. It is usually diagnosed by the symptoms presented by the patient as muscle weakness, loss of sensation in the extremities and decreased reflexes. In this article, we present a case report of a GBS patient, possibly after a Zika virus infection. No patient serological diagnosis was made for DENV and ZIKV at the time of infection. Only CHIKV infection was ruled out by IgM and IgG ELISA. A diagnostic test for Zika virus IgG antibodies was performed during the validation of a study product. Whole blood was collected in a separator gel tube. The result was indeterminate in the test, but considered positive by the clinical symptoms and consequences of the infection.

KEY-WORDS: Guillain-Barrè Syndrome, Zika virus, ELISA

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Guillain-Barrè (GBS) é uma complicação neurológica inflamatória autoimune, que pode acontecer pós-infecção por Zika vírus. A incidência mundial da síndrome é de 1 a 2 casos a cada 100.000 pessoas no mundo (LEONHARD et al., 2019). A maioria dos acometidos é do sexo masculino, sendo que a incidência aumenta de acordo com a idade, apesar de que todas as idades podem ser acometidas (CARDONA-OSPINA et al., 2019; LEONHARD et al., 2019). Os sintomas mais relatados pelos pacientes acometidos pela síndrome são fraqueza nos membros, perda de sensibilidade nas extremidades e diminuição dos reflexos são (LEONHARD et al., 2019; LIMA;

BACHUR; ARAGÃO, 2019; RODRÍGUEZ-MORALES; FAILOC-ROJAS; DÍAZ-VÉLEZ, 2019; WALTEROS et al., 2019).

Relatos de complicações neurológica em decorrência da infecção por ZIKV cresceram significativamente após o surto de 2015 (CARDONA-OSPINA et al., 2019). Um estudo no estado de Pernambuco, durante o surto de 2015, comprovou o aumento de casos de SGB três vezes mais, em comparação aos casos em 2014. Esse aumento é concomitante aos casos de ZIKV na mesma região. O estudo descartou a complicação neurológica por DENV ou CHIKV (NÓBREGA et al., 2018).

Neste artigo, apresentaremos um relato de caso de um paciente acometido pela GBS, possivelmente após uma infecção por Zika vírus.

METODOLOGIA

Os dados obtidos pela pesquisa foram obtidos por entrevista ao paciente, com concomitante preenchimento de um formulário de anamnese. Além disso, foram utilizados dados de exames realizados pelo paciente à época do diagnóstico de Guillain-Barré e exames de acompanhamento da evolução da doença. O diagnóstico confirmatório de antígeno ou anticorpos contra o patógeno não foi realizado à época do aparecimento dos sintomas. Das arboviroses capazes de desencadear a GBS, apenas a febre por Chikungunya vírus foi descartada por ensaio imunoenzimático, neste mesmo período.

O teste para diagnóstico de anticorpos IgG para Zika vírus foi realizado durante a validação do produto em estudo. Foi coletado sangue total em tubo com gel separador, com intuito de obtenção do soro do paciente, por centrifugação. Foram utilizados 10 µL do soro para o ensaio de ELISA, e a amostra foi testada em triplicata.

DESCRIÇÃO DO CASO

O paciente, atualmente com 42 anos, trabalhava como motorista de caminhão em fevereiro de 2016 e durante uma viagem começou a sentir-se indisposto. Os primeiros sintomas foram dor abdominal no baixo ventre e astenia. Solicitou à empresa que trabalhava à época que o substituíssem, pois não conseguiria finalizar a viagem e pediu que o reconduzíssem a Goiânia-GO, onde ainda reside.

No segundo dia de sintomas, iniciou uma febre baixa, edema articular e orquite, notando que os testículos estavam com volume maior do que o usual. Ao chegar na cidade de domicílio, foi encaminhado a um hospital geral particular. O médico plantonista iniciou o protocolo de tratamento dos sintomas de cólica renal, visto que o paciente indicou piora na dor abdominal no baixo ventre.

O período de internação foi de sete dias. Como o primeiro protocolo de tratamento não resultou em melhora, e a queixa de dor do paciente evoluiu para o maior nível, foi aplicado morfina no paciente para eliminar a dor. Os sintomas evoluíram para forte artralgia, forte cefaléia, espasmos dos membros superiores e inferiores, enrijecimento dos membros inferiores e perda de movimentos. No quinto dia de sintomas, apresentou exantema em algumas partes do corpo. A equipe médica, então, começou a suspeitar de arboviroses.

Foram realizadas avaliações laboratoriais de rotina, como EAS e hemograma. O primeiro não apresentou nenhuma alteração. O segundo foi realizado por duas vezes, no mesmo dia, com mínimas alterações nos resultados, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados do Hemograma realizado durante a internação hospitalar

HEMOGRAMA	1ª REALIZAÇÃO	2ª REALIZAÇÃO	VALOR REFERÊNCIA
Hematócrito%	40,6	38,9	40 a 50
Plaquetas/mm ³	205.000	185.000	150.000 a 400.000
Contagem de Leucócitos/mm ³	8.610	11.100	4.000 a 10.000
Hemoglobina g/dL	14,8	13,6	13 a 17

Fonte: (PNCQ, 2019)

Foi feita uma pesquisa de anticorpos IgM e IgG para Chikungunya vírus, pelo laboratório do Hospital de Doenças Tropicais de Goiânia (HDT) e a pesquisa de fosfatase alcalina, para avaliar a função hepática. Os anticorpos foram negativos e a função hepática estava normal.

O caso do paciente foi encaminhado a um neurologista, que procedeu a avaliação de um eletroneuromiografia. Este exame confirmou a Síndrome de Guillain-Barrè, confirmando o quadro de tetraparesia flácida em decorrência de poliradiculoneurite, causada por infecção pelo ZIKV. O diagnóstico de Guillain Barrè, em decorrência da infecção por ZIKV, foi feito pelo médico através dos sintomas apresentados. O paciente manifestou os sintomas iniciais por 40 dias. O restabelecimento foi atingido em 60 dias. Não foi realizado exame sorológico ou de pesquisa de antígeno para Zika vírus ou Dengue vírus.

Atualmente, o paciente está aposentado por invalidez, visto que não pode mais exercer a função habitual. Reclama sentir forte cefaléia ao menos duas vezes ao mês, astenia contínua, falta de tônus muscular. Ao realizar qualquer tipo de esforço físico, apresenta náusea e vômito. Periodicamente, realiza exames de avaliação, e o prognóstico não é bom, já que a tetraparesia flácida não regride e a resistência física não evolui.

Em relação às informações complementares, paciente informou que não havia sofrido infecção por DENV previamente. Porém, sofreu em março de 2019 uma infecção, que foi diagnosticada por sintomatologia como sendo Dengue, no posto de saúde próximo a sua residência. Não houve complicações nesta infecção, apenas sintomas leves, e o restabelecimento foi após 10 dias. Paciente diz não lembrar se vacinou contra febre amarela, mas acredita que sim, visto que pela profissão, foi vacinado algumas vezes em postos da Polícia Rodoviária Federal, durante viagens.

O último exame realizado pelo paciente foi em 18/06/2019. A eletroneuromiografia dos 4 membros concluiu que o paciente é portador de polineuropatia periférica axonal sensitivo-motora crônica distal discreta (GRAU 1) nos membros superiores e moderada (GRAU 2) nos membros inferiores. O laudo enfatiza que o quadro clínico é de longa evolução e que as conduções sensitivas e motoras estão com velocidades diminuídas nos 4 membros. Os músculos mais distais dos membros inferiores estão com sinais de desnervação parcial crônica, indicando que o processo neuropático é mais acentuado na região distal que proximal dos membros.

O soro do paciente foi testado no *kit* para diagnóstico de anticorpos IgG de Zika vírus, por metodologia ELISA, em validação. O ensaio foi realizado em triplicata e a média aritmética das absorbâncias calculada. O cut-off do ensaio foi feito pela média de vinte leituras de absorbâncias do controle negativo, acrescida de três vezes o desvio padrão deste ensaio. Esse cálculo é padrão para ensaios analíticos. O paciente é considerado como positivo, quando a relação entre a absorbância da amostra (S) e o cut-off (Co) é superior a 1,1. Resultados abaixo de 0,9 são considerados negativos e entre 0,9 e 1,1, são considerados como indeterminados.

O resultado da média da triplicata de testes do paciente foi $0,205 \pm 0,003$, com um coeficiente de variação (CV) entre elas de 1,38%. A relação S/Co do paciente foi 1,04, considerada como Indeterminada. O Ministério da Saúde indica que, pacientes cujos resultados estão nesta faixa, considerados como “Zona Cinza”, devem ter as amostras testadas em metodologia diversa, para se ratificar o diagnóstico, ou descartá-lo por completo ou por avaliação clínica. Pelos sintomas apresentados e pelo diagnóstico clínico efetuado à época da infecção, o paciente foi considerado como positivo para ZIKV IgG

DISCUSSÃO

A associação entre infecção de Zika vírus e Síndrome de Guillain-Barré foi relatada, pela primeira vez após o surto na Polinésia Francesa, em 2013 (DO ROSÁRIO et al., 2016; RABONI et al., 2017). Após o surto de 2015, a Organização Mundial da Saúde baseando-se em revisão de literatura, declarou haver uma relação entre a infecção e a síndrome, além de outras complicações severas, como a microcefalia em neonatos (RABONI et al., 2017). Essa declaração fez com que os

países em que a infecção pelo Zika vírus estava em curso, ficassem em alerta para a ocorrência da síndrome (BAUTISTA, 2019).

A síndrome de Guillain-Barré é descrita como neuropatia periférica (poliradiculoneurite) aguda, mediada por anticorpos pós-infecção por vírus e bactérias. Apresenta uma grande variabilidade de quadros clínicos e evolução da doença (RABONI et al., 2017; MORRIS et al., 2018). Os anticorpos inespecíficos pós-infecção promovem a desmielinização, através da ativação do complemento e macrófagos (LIMA; BACHUR; ARAGÃO, 2019).

O ZIKV possui tropismo por vários tecidos, divergindo dos demais arbovírus, como por exemplo o DENV. Cérebro, olhos, útero e vagina, placenta, testículos, além de serem presentes em quantidade considerável, nos fluidos corporais (MINER; DIAMOND, 2017). A persistência por 180 dias no esperma e sêmen do ZIKV é outro indicativo do tropismo do vírus pelos testículos (MINER; DIAMOND, 2017). O paciente em estudo apresentou como sintoma primário ao desenvolvimento da SGB a infecção testicular. Em conjunto com os demais sintomas, confirma o diagnóstico clínico do paciente e atesta o diagnóstico laboratorial.

Um estudo com camundongos, para o desenvolvimento de uma vacina atenuada para o ZIKV, notou um infecção testicular persistente em um pequeno grupo. Essa infecção pode ter sido mediada pela baixa resposta do INF tipo I, já conhecido como eficaz em não permitir a disseminação sistêmica do vírus (KWEK et al., 2018). Uma baixa resposta do INF tipo I causa uma maior viremia e esta maior viremia pode ser a causa de complicações na infecção por ZIKV (PANTOJA et al., 2017).

Teoricamente, as sucessivas infecções por DENV, por seus quatro sorotipos, em conjunto com a entrada da infecção por ZIKV, poderia ter sido um dos motivos do aumento de casos de GBS no Brasil (DONALISIO et al., 2017). De fato, vários estudos indicam que os casos de GBS em outros países que sofreram com surto de ZIKV, aumentaram consideravelmente. Foram 150% de aumento na República Dominicana, 211% na Colômbia e 172% somente no estado da Bahia, Brasil (MORRIS et al., 2018).

Lynch et al., conduziram um estudo em Barranquilla, Colombia. Foram comparados os anticorpos neutralizantes para DENV2 e ZIKV em pacientes com a infecção por ZIKV, com a infecção por ZIKV e desenvolvimento de SGB e pacientes sem infecção nenhuma. Os pacientes com SGB pós-infecção por ZIKV possuíam os maiores títulos de anticorpos neutralizantes para a DENV2 e ZIKV. Os autores concluíram que a ocorrência da SGB é causada por esse aumento de título nos anticorpos neutralizantes, e que os anticorpos aumentados podem causar um aumento de viremia ou uma reação cruzada com as células nervosas dos pacientes acometido pela SGB (LYNCH et al., 2019).

Na ocasião do surto da Polinésia Francesa, o primeiro caso de SGB foi relatado cinco dias após as primeiras manifestações da infecção. Cao-Lormeau et al. conduziram um estudo na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014, relatando os casos de GBS durante o surto de ZIKV. Estimou-se que 0,24 a cada 1000 pessoas desenvolveram a síndrome. A maioria homens, com idade média de 42 anos e os sintomas principais foram exantemas, febre e artralgia. Posteriormente, houve a progressão para a astenia e paralisia facial. Neste mesmo estudo, 24% dos portadores de GBS tiveram seus testes de ELISA IgG considerados como Indeterminados (CAO-LORMEAU et al., 2016)

Raboni et al., relataram o caso de uma paciente com 9 anos de idade que apresentou a GBS 92 dias após transplante de medula óssea. A paciente foi testada para DENV e ZIKV, por várias metodologias, apresentando anti-DENV e anti-ZIKV IgM, e IgG. O doador também foi testado, e apresentou altos títulos de anti-DENV IgG. A paciente tinha sido vacinada contra Febre Amarela recentemente. A suspeita é de que a paciente desenvolveu a síndrome por ter recebido a medula com altos títulos de anticorpos para DENV e ter sido contaminada por ZIKV, após o retorno ao estado de origem (Maranhão, Brasil), local com alto índice de infecção por ZIKV, à época (RABONI et al., 2017)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O paciente desenvolveu a GBS em decorrência da infecção por ZIKV. A literatura mostra que nem todas as pessoas que são infectadas pelo ZIKV desenvolvem altos títulos de anticorpos no sangue e em alguns casos, ele pode até ser negativo. Os sintomas clínicos apresentados pelo paciente, à época da infecção, foram determinantes para o diagnóstico diferencial. O resultado indeterminado no teste de ELISA para IgG de ZIKV, indica baixa produção de anticorpos específicos durante a infecção. Uma reação de neutralização ineficiente pode ter ocorrido e causado uma alta viremia, que pode ter conduzido a um asseveramento da infecção.

ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Dentro dos aspectos éticos o estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Goiás, e foi aprovado sob o protocolo nº 11018119.2.0000.8113. Foi respeitado os preceitos da experimentação com seres humanos, de acordo com a Portaria 466/12, do CNS- Conselho Nacional de Saúde. A todos os participantes serão explícitas as condições de participação do estudo e as normas éticas, incluindo a assinatura o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, em casos de crianças e adolescentes, na ocasião da abordagem para participação do estudo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – processo número 201810267000572.

REFERÊNCIAS

BAUTISTA, L. E. Zika virus infection and risk of Guillain-Barré syndrome: A meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 403, n. May, p. 99–105, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.06.019>>.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A. L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S. K.; WILLISON, H. J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J. C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. 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, 2016.

CARDONA-OSPINA, J. A.; HENAO-SANMARTIN, V.; ACEVEDO-MENDOZA, W. F.; NASNER-POSSO, K. M.; MARTÍNEZ-PULGARÍN, D. F.; RESTREPO-LÓPEZ, A.; GALLEGO-VALENCIA, V.; COLLINS, M. H.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.033>>.

DO ROSÁRIO, M. S.; DE JESUS, P. A. P.; VASILAKIS, N.; FARIAS, D. S.; NOVAES, M. A. C.; RODRIGUES, S. G.; MARTINS, L. C.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F.; KO, A. I.; ALCÂNTARA, L. C. J.; DE SIQUEIRA, I. C. Case report: Guillain-barré syndrome after zika virus infection in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1157–1160, 2016.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; FREITAS, R.; VON ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista Saúde Pública**, p. 51:30, 2017.

KWEK, S. Sen; WATANABE, S.; CHAN, K. R.; ONG, E. Z.; TAN, H. C.; NG, W. C.; NGUYEN, M. T. X.; GAN, E. S.; ZHANG, S. L.; CHAN, K. W. K.; TAN, J. H.; SESSIONS, O. M.; MANUEL, M.; POMPON, J.; CHUA, C.; HAZIRAH, S.; TRYGGVASON, K.; VASUDEVAN, S. G.; OOI, E. E. A systematic approach to the development of a safe live attenuated Zika vaccine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03337-2>>.

LEONHARD, S. E.; MANDARAKAS, M. R.; GONDIM, F. A. A.; BATEMAN, K.; FERREIRA, M. L. B.; CORNBLATH, D. R.; VAN DOORN, P. A.; DOURADO, M. E.; HUGHES, R. A. C.; ISLAM, B.; KUSUNOKI, S.; PARDO, C. A.; REISIN, R.; SEJVAR, J. J.; SHAHRIZAILA, N.; SOARES, C.; UMAPATHI, T.; WANG, Y.; YIU, E. M.; WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C. Diagnosis and management of Guillain-Barré syndrome in ten steps. **Nature reviews. Neurology**, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31541214>>.

LIMA, M. E. de S.; BACHUR, T. P. R.; ARAGÃO, G. F. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, Zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. **Acta Tropica**, v. 197, n. March, p. 105064, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105064>>.

LYNCH, R. M.; MANTUS, G.; ENCINALES, L.; PACHECO, N.; LI, G.; PORRAS, A.; MENDOZA, A. R.; PENG, J.; RENGIFO-PARDO, M.; CRUZ, M. M.; HARRIS, E.; BETHONY, J. M.; SIMON, G. L.; CHANG, A. Y. Augmented zika and dengue neutralizing antibodies are associated with guillain-Barré syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 1, p. 26–30, 2019.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>>.

MORRIS, G.; BARICHELLO, T.; STUBBS, B.; KÖHLER, C. A.; CARVALHO, A. F.; MAES, M. Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4160–4184, 2018.

NÓBREGA, M. E. B. da; ARAÚJO, E. L. de L.; WADA, M. Y.; LEITE, P. L. E.; DIMECH, G. S.;

PÉRCIO, J. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 2, p. e2017039, 2018.

PANTOJA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, E. X.; RODRÍGUEZ, I. V.; WHITE, L. J.; GONZÁLEZ, O.; SERRANO, C.; GIAVEDONI, L.; HODARA, V.; CRUZ, L.; ARANA, T.; MARTÍNEZ, M. I.; HASSERT, M. A.; BRIEN, J. D.; PINTO, A. K.; DE SILVA, A.; SARIOL, C. A. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

PNCQ. **Valores De Referência Hematológicos Para Adultos E Crianças**. Disponível em: <<https://www.pncq.org.br/uploads/2019/VNH2019.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

RABONI, S. M.; BONFIM, C.; ALMEIDA, B. M.; ZANLUCA, C.; KOISHI, A. C.; RODRIGUES, P. R. V. P.; KAY, C. K.; RIBEIRO, L. L.; SCOLA, R. H.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: A case report. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 1–5, 2017.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; FAILOC-ROJAS, V. E.; DÍAZ-VÉLEZ, C. Gastrointestinal, respiratory and/or arboviral infections? What is the cause of the Guillain-Barré syndrome epidemics in Perú? Current status – 2019. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 30, n. June, p. 114–116, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.06.015>>.

WALTEROS, D. M.; SOARES, J.; STYCZYNSKI, A. R.; ABRAMS, J. Y.; GALINDO-BUITRAGO, J. I.; ACOSTA-REYES, J.; BRAVO-RIBERO, E.; ARTETA, Z. E.; SOLANO-SANCHEZ, A.; PRIETO, F. E.; GONZALEZ-DUARTE, M.; NAVARRO-LECHUGA, E.; SALINAS, J. L.; BELAY, E. D.; SCHONBERGER, L. B.; DAMON, I. K.; OSPINA, M. L.; SEJVAR, J. J. Long-term outcomes of Guillain-Barré syndrome possibly associated with Zika virus infection. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220049, 2019.

5. CONCLUSÃO

Há vários impactos sociais e econômicos em decorrência do surto de ZIKV de 2015 no Brasil. O primeiro deles é a grande quantidade de crianças com microcefalia ou outros problemas de nascimento, devido à Síndrome Congênita da Zika, trazendo impactos ao desenvolvimento da criança, envolvendo a sua família e toda a comunidade ao seu redor, uma vez que as limitações são diversas. O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é demasiadamente importante, mesmo em momentos em que há controle de surtos e menos casos de infecção detectados.

Uma dos fatores que pode conduzir ao asseveramento da infecção pelo ZIKV é o fenômeno ADE em decorrência de uma infecção prévia por DENV. O ADE é um fenômeno de ocorrência factível no organismo humano. As vias de ação da ADE, seja celular ou humoral, através das citocinas envolvidas no processo, são produzidas tanto neste fenômeno *in vitro* quanto *in vivo*. A conclusão sobre o ADE de ZIKV causada por infecção prévia de DENV ainda é vaga, pois os vários estudos sobre esse assunto permanecem controversos entre si. Os estudos epidemiológicos são fundamentais para a conclusão sobre o assunto. Os dados epidemiológicos, prévios e posteriores à infecção pelo ZIKV, vão esclarecer o entendimento da interação imunológica entre ZIKV e DENV, no organismo humano. Assim sendo, o desenvolvimento de novos meios de se diferenciar as infecções, com sensibilidade e especificidade suficiente são as ferramentas adequadas para esse fim.

A metodologia de PCR em tempo real é o método *gold standard* e é eficaz no diagnóstico das arboviroses. Ela é capaz de diferenciar os vírus DENV, ZIKV e CHIKV, com baixa ocorrência de reações cruzadas e baixa reação inespecífica. Além disso, a técnica é capaz de identificar o patógeno mesmo em baixa viremia, o que é importante para o diagnóstico precoce da doença. O diagnóstico é rápido, sensível e específico, tornando-a uma ferramenta diagnóstica de alta confiabilidade. Porém, seu uso é restrito ao período de viremia da infecção, o que restringe o diagnóstico das arboviroses entre 3 a 5 dias pós início dos sintomas. As reações cruzadas entre as arboviroses ainda é um empecilho ao diagnóstico preciso. Mesmo os testes de PCR-RT ou qPCR podem causar resultados falsos, devido à semelhança genética entre os vírus. Os ensaios sorológicos, que custam menos, possuem técnica mais simplificada e usam equipamentos mais baratos, sendo os testes mais acessíveis.

Nesta pesquisa foi estruturado um *kit* para detecção de anticorpos IgG do ZIKV. A validação foi realizada com 30 amostras, 15 delas provindas do IMTUSP positivas para ZIKV. As demais amostras, 7 foram coletadas a partir de busca ativa na população e 8 controles comerciais. A linearidade e a exatidão do kit foram comprovadas, através da diluição de uma amostra positiva e a obtenção da correlação $R^2 = 0,994$. O *cut-off* (Co) foi determinado, como 0,198. A sensibilidade

analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 97,8% ajustado. A especificidade analítica do *kit* foi comprovada, como sendo de 100%. Não houve reação cruzada com os anticorpos anti-DENV em nenhuma das amostras analisadas. A repetitividade do ensaio foi comprovada, demonstrando a precisão intra-ensaio do *kit*. O coeficiente de variação entre as amostras foi de 9,13%. Foi comprovada a conformidade do produto, com as especificações do usuário, através dos testes estatísticos que comprovam a Acurácia e Eficácia do produto. O ensaio foi validado, não produzindo o efeito prózona, fato comprovado pela comparação dos resultados em soro com amostras coletadas em papel filtro. O teste de Wilcoxon para o ensaio de efeito prózona foi de 0,992. O índice Kappa, que comparou os resultados do *kit* com os resultados pela metodologia *gold standard* PCR em tempo real, foi de 0,902. Este resultado demonstra uma excelente comparação entre os resultados das duas metodologias. Portanto, o kit de metodologia ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG para o ZIKV, comprovou ser uma ótima ferramenta para o diagnóstico diferencial da infecção por ZIKV.

Foi realizado um relato de caso de um paciente que desenvolveu a GBS em decorrência da infecção por ZIKV. A literatura mostra que nem todas as pessoas que são infectadas pelo ZIKV desenvolvem altos títulos de anticorpos no sangue e em alguns casos, ele pode até ser negativo. Os sintomas clínicos apresentados pelo paciente, à época da infecção, foram determinantes para o diagnóstico diferencial. O resultado indeterminado no teste de ELISA para IgG de ZIKV, indica baixa produção de anticorpos específicos durante a infecção. Uma reação de neutralização ineficiente pode ter ocorrido e causado uma alta viremia, que pode ter conduzido a um asseveramento da infecção.

6. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Dentro dos aspectos éticos o estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Goiás, e foi aprovado sob o protocolo nº 11018119.2.0000.8113. Foi respeitado os preceitos da experimentação com seres humanos, de acordo com a Portaria 466/12, do CNS- Conselho Nacional de Saúde. A todos os participantes serão explícitas as condições de participação do estudo e as normas éticas, incluindo a assinatura o TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, em casos de crianças e adolescentes, na ocasião da abordagem para participação do estudo.

7. REFERÊNCIAS

ABD EL WAHED, A.; PATEL, P.; FAYE, O.; THALOENGSOEK, S.; HEIDENREICH, D.; MATANGKASOMBUT, P.; MANOPWISEDJAROEN, K.; SAKUNTABHAI, A.; SALL, A. A.; HUFERT, F. T.; WEIDMANN, M. Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 2015.

ACOSTA, P. O. A.; GRANJA, F.; MENESES, C. A.; NASCIMENTO, I. A. S.; SOUSA, D. D. False-negative Dengue Cases in Roraima, Brazil: An Approach Regarding the High Number of Negative Results by NS1 Ag Kits. v. 56, n. 5, p. 447–450, 2014.

ALVA-URCIA, C.; AGUILAR-LUIS, M. A.; PALOMARES-REYES, C.; SILVA-CASO, W.; SUAREZ-OGNIO, L.; WEILG, P.; MANRIQUE, C.; VASQUEZ-ACHAYA, F.; DEL VALLE, L. J.; DEL VALLE-MENDOZA, J. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–13, 2017.

ANDRADE, D. V.; HARRIS, E. **Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure** *Virus Research*, 2018. .

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

BALMASEDA, A.; STETTLER, K.; MEDIALDEA-CARRERA, R.; COLLADO, D.; JIN, X.; ZAMBRANA, J. V.; JACONI, S.; CAMERONI, E.; SABORIO, S.; ROVIDA, F.; PERCIVALLE, E.; IJAZ, S.; DICKS, S.; USHIRO-LUMB, I.; BARZON, L.; SIQUEIRA, P.; BROWN, D. W. G.; BALDANTI, F.; TEDDER, R.; ZAMBON, M.; DE FILIPPIS, A. M. B.; HARRIS, E.; CORTI, D. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201704984, 2017. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1704984114>>.

BAUTISTA, L. E. Zika virus infection and risk of Guillain-Barré syndrome: A meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 403, n. May, p. 99–105, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.06.019>>.

BROWN, J. A.; SINGH, G.; ACKLIN, J. A.; LEE, S.; DUEHR, J. E.; CHOKOLA, A. N.; FRERE, J. J.; HOFFMAN, K. W.; FOSTER, G. A.; KRYSZTOF, D.; CADAGAN, R.; JACOBS, A. R.; STRAMER, S. L.; KRAMMER, F.; GARCÍA-SASTRE, A.; LIM, J. K. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 751- 762.e5, 2019.

CALVET, G. A.; DOS SANTOS, F. B.; SEQUEIRA, P. C. Zika virus infection: Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459–466, 2016. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=27496713>>.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A. L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S. K.; WILLISON, H. J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J. C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H. P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. 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, 2016.

CARDONA-OSPINA, J. A.; HENAO-SANMARTIN, V.; ACEVEDO-MENDOZA, W. F.; NASNER-POSSO, K. M.; MARTÍNEZ-PULGARÍN, D. F.; RESTREPO-LÓPEZ, A.; GALLEGO-VALENCIA, V.; COLLINS, M. H.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.033>>.

CASTANHA, P. M. S.; NASCIMENTO, E. J. M.; BRAGA, C.; CORDEIRO, M. T.; DE CARVALHO, O. V.; DE MENDONÇA, L. R.; AZEVEDO, E. A. N.; FRANÇA, R. F. O.; DHALIA, R.; MARQUES, E. T. A. Dengue virus-specific antibodies enhance Brazilian Zika virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 5, p. 781–785, 2017.

CHAVES, B. A.; ORFANO, A. S.; NOGUEIRA, P. M.; RODRIGUES, N. B.; CAMPOLINA, T. B.; NACIF-PIMENTA, R.; CLARA, A.; MACHADO, A.; BENTES, A.; JÚNIOR, V.; PAZ, C.; BEATRIZ, E.; VALE, G.; GUERRA, B.; SILVA, B. M.; MELO, F. F. De; NORRIS, D. E.; VINÍCIUS, M.; LACERDA, G. De; FILEMON, P.; PIMENTA, P.; FRANCINETE, N.; SECUNDINO, C. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. v. 218, p. 563–571, 2018.

CHEN, H.; PARIMELALAGAN, M.; LAI, L.; LEE, S.; KOAY, E. S.; HAPUARACHCHI, H. C.; NG, C.; HO, S.; JANG, J.; CHU, H. Development and Evaluation of a SYBR Green e Based Real-Time Multiplex RT-PCR Assay for Simultaneous Detection and Serotyping of Dengue and Chikungunya Viruses. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 6, p. 722–728, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.06.008>>.

CRMAN, V. M.; RASCHE, A.; BARONTI, C.; ALDABBAGH, S.; CADAR, D.; REUSKEN, C. B. E. M.; 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.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. **F1000 Research**, v. 9, n. 1, p. 1–497, 2019.

DE GÓES CAVALCANTI, L. P.; TAUIL, P. L.; ALENCAR, C. H.; OLIVEIRA, W.; TEIXEIRA, M. M.; HEUKELBACH, J. Zika virus infection, associated microcephaly, and low yellow fever vaccination coverage in Brazil: Is there any causal link. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 6, p. 563–566, 2016.

DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; ROUVINSKI, A.; BARBA-SPAETH, G.; DUANGCHINDA, T.; SAKUNTABHAI, A.; CAO-LORMEAU, V.-M.; MALASIT, P.; REY, F. A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–8, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339099>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4994874>>.

DELGADO, F.; TORRES, K.; CASTELLANOS, J.; ROMERO-SÁNCHEZ, C.; SIMON-LORIÈRE, E.; SAKUNTABHAI, A.; ROTH, C. Improved Immune Responses Against Zika Virus After Sequential Dengue and Zika Virus Infection in Humans. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 480, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/9/480>>.

DO ROSÁRIO, M. S.; DE JESUS, P. A. P.; VASILAKIS, N.; FARIAS, D. S.; NOVAES, M. A. C.; RODRIGUES, S. G.; MARTINS, L. C.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F.; KO, A. I.; ALCÂNTARA, L. C. J.; DE SIQUEIRA, I. C. Case report: Guillain-barré syndrome after zika virus infection in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1157–1160, 2016.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; FREITAS, R.; VON ZUBEN, A. P. B. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista Saúde Pública**, p. 51:30, 2017.

EDWARDS, T.; DEL CARMEN CASTILLO SIGNOR, L.; WILLIAMS, C.; LARCHER, C.; ESPINEL, M.; THEAKER, J.; DONIS, E.; CUEVAS, L. E.; ADAMS, E. R. Analytical and clinical performance of a Chikungunya qRT-PCR for Central and South America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 89, n. 1, p. 35–39, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.001>>.

EPPE, C.; RAC, M.; DUNN, J.; VERSALOVIC, J.; MURRAY, K. O.; SUTER, M. A.; SANZ CORTES, M.; ESPINOZA, J.; SEFEROVIC, M. D.; LEE, W.; HOTEZ, P.; MASTROBATTISTA, J.; CLARK, S. L.; BELFORT, M. A.; AAGAARD, K. M. **Testing for Zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* Elsevier Inc., , 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2017.01.020>>.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 4, p. 465–469, 2017.

FELIX, A. C.; SOUZA, N. C. S.; FIGUEIREDO, W. M.; COSTA, A. A.; INENAMI, M.; DA SILVA, R. M. G.; LEVI, J. E.; PANNUTI, C. S.; ROMANO, C. M. 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, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmv.24789>>.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. do L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. [s.l: s.n.]v. 67

FOCOSI, D.; MAGGI, F.; PISTELLO, M. Zika virus: Implications for public health. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 2, p. 227–233, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/299941290_Zika_Virus_Implications_for_Public_Health>.

FORTUNA, C.; REMOLI, M. E.; RIZZO, C.; BENEDETTI, E.; FIORENTINI, C.; BELLA, A.; ARGENTINI, C.; FARCHI, F.; CASTILLETI, C.; CAPOBIANCHI, M. R.; ZAMMARCHI, L.; BARTOLONI, A.; ZANCHETTA, N.; GISMONDO, M. R.; NELLI, L. C.; VITALE, G.; BALDELLI, F.; D'AGARO, P.; SODANO, G.; REZZA, G.; VENTURI, G. Imported arboviral infections in Italy, July 2014–October 2015: A National Reference Laboratory report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2017.

GEORGE, J.; VALIANT, W. G.; MATTAPALLIL, M. J.; WALKER, M.; HUANG, Y. J. S.; VANLANDINGHAM, D. L.; MISAMORE, J.; GREENHOUSE, J.; WEISS, D. E.; VERTHELYI, D.; HIGGS, S.; ANDERSEN, H.; LEWIS, M. G.; MATTAPALLIL, J. J. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

GIRY, C.; ROQUEBERT, B.; LI-PAT-YUEN, G.; GASQUE, P.; JAFFAR-BANDJEE, M. C. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017a.

GIRY, C.; ROQUEBERT, B.; LI-PAT-YUEN, G.; GASQUE, P.; JAFFAR-BANDJEE, M. C. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017b.

GOULD, E.; PETTERSSON, J.; HIGGS, S.; CHARREL, R.; LAMBALLERIE, X. De. Emerging arboviruses : Why today ? v. 4, n. June, p. 1–13, 2017.

GRIFONI, A.; PHAM, J.; SIDNEY, J.; ROURKE, P. H. O.; PAUL, S.; PETERS, B.; MARTINI, S. R.; SILVA, A. D. De; RICCIARDI, M. J.; DAMASCO, P. V.; PHILLIPS, E.; MALLAL, S.; CERPAS, C.; BALMASEDA, A.; KUAN, G.; COLOMA, J.; HARRIS, E.; CROWE, J. E.; STONE, M.; NORRIS, P. J.; BUSCH, M.; VIVANCO-CID, H.; COX, J.; GRAHAM, B. S. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. v. 91, n. 24, p. 1–19, 2017.

GUNAWARDANA, S. A.; SHAW, R. H. Cross-reactive dengue virus-derived monoclonal antibodies to Zika virus envelope protein: Panacea or Pandora's box? **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–5, 2018.

HU, S. F.; LI, M.; ZHONG, L. L.; LU, S. M.; LIU, Z. X.; PU, J. Y.; WEN, J. S.; XI, H. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0595-1>>.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. p. 31, 2018. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_05.pdf>.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostics Assays. v. 214, n. July 2015, 2017.

KAM, Y.-W.; LEE, C. Y.-P.; TEO, T.-H.; HOWLAND, S. W.; AMRUN, S. N.; LUM, F.-M.; SEE, P.; KNG, N. Q.-R.; HUBER, R. G.; XU, M.-H.; TAN, H.-L.; CHOO, A.; MAURER-STROH, S.; GINHOUX, F.; FINK, K.; WANG, C.-I.; NG, L. F. P.; RÉNIA, L. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. **JCI Insight**, v. 2, n. 8, p. 1–10, 2017.

KAWAMURA, T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v. 79, n. 2, p. 437–441, 2002.

KEEFFE, J. R.; VAN ROMPAY, K. K. A.; OLSEN, P. C.; WANG, Q.; GAZUMYAN, A.; AZZOPARDI, S. A.; SCHAEFER-BABAJEW, D.; LEE, Y. E.; STUART, J. B.; SINGAPURI, A.; WATANABE, J.; USACHENKO, J.; ARDESHIR, A.; SAEED, M.; AGUDELO, M.; EISENREICH, T.; BOURNAZOS, S.; OLIVEIRA, T. Y.; RICE, C. M.; COFFEY, L. L.; MACDONALD, M. R.; BJORKMAN, P. J.; NUSSENZWEIG, M. C.; ROBBIANI, D. F. A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates. **Cell Reports**, v. 25, n. 6, p. 1385- 1394.e7, 2018.

KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; MALIK, Y. S.; SINGH,

R. K.; CHAICUMPA, W. Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. APR, 2018.

KIKUTI, M.; TAURO, L. B.; MOREIRA, P. S. S.; CAMPOS, G. S.; PAPLOSKI, I. A. D.; WEAVER, S. C.; REIS, M. G.; KITRON, U.; RIBEIRO, G. S. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.

KIM, T.; VO, D.; BIGOT, P.; GAZIN, P.; SINOUE, V.; JACQUES, J.; PINA, D.; CHIEN, D.; FUMOUEX, F.; PARZY, D. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. p. 422–428, 2007.

KUROSUKI, Y.; MARTINS, D. B. G.; KIMURA, M.; CATENA, A. D. S.; BORBA, M. A. C. S. M.; MATTOS, S. D. S.; ABE, H.; YOSHIKAWA, R.; DE LIMA FILHO, J. L.; YASUDA, J. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

KWEK, S. Sen; WATANABE, S.; CHAN, K. R.; ONG, E. Z.; TAN, H. C.; NG, W. C.; NGUYEN, M. T. X.; GAN, E. S.; ZHANG, S. L.; CHAN, K. W. K.; TAN, J. H.; SESSIONS, O. M.; MANUEL, M.; POMPON, J.; CHUA, C.; HAZIRAH, S.; TRYGGVASON, K.; VASUDEEVAN, S. G.; OOI, E. E. A systematic approach to the development of a safe live attenuated Zika vaccine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03337-2>>.

L'HUILIER, A. G.; HAMID-ALLIE, A.; KRISTJANSON, E.; PAPAGEORGIOU, L.; HUNG, S.; WONG, C. F.; STEIN, D. R.; OLSHA, R.; GONEAU, L. W.; DIMITROVA, K.; DREBOT, M.; SAFRONETZ, D.; GUBBAY, J. B. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, 2017.

LANGERAK, T.; MUMTAZ, N.; TOLK, V. I.; VAN GORP, E. C. M.; MARTINA, B. E.; ROCKX, B.; KOOPMANS, M. P. G. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 4, p. e1007640, 2019.

LEONHARD, S. E.; MANDARAKAS, M. R.; GONDIM, F. A. A.; BATEMAN, K.; FERREIRA, M. L. B.; CORNBLATH, D. R.; VAN DOORN, P. A.; DOURADO, M. E.; HUGHES, R. A. C.; ISLAM, B.; KUSUNOKI, S.; PARDO, C. A.; REISIN, R.; SEJVAR, J. J.; SHAHRIZAILA, N.; SOARES, C.; UMAPATHI, T.; WANG, Y.; YIU, E. M.; WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C. Diagnosis and management of Guillain-Barré syndrome in ten steps. **Nature reviews. Neurology**, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31541214>>.

LI, M.; ZHAO, L.; ZHANG, C.; WANG, X.; HONG, W.; SUN, J.; LIU, R.; YU, L.; WANG, J.; ZHANG, F.; JIN, X. Dengue immune sera enhance Zika virus infection in human peripheral blood monocytes through Fc gamma receptors. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–23, 2018.

LI, X.; GAO, X.; FU, S.; WANG, H.; LIANG, G.; LI, M.; LU, Z.; ZHU, W.; LU, X.; WANG, L.; CAO, Y. Arboviruses and their related infections in China : A comprehensive field and laboratory investigation over the last 3 decades. n. May, p. 1–21, 2017.

LIMA, M. E. de S.; BACHUR, T. P. R.; ARAGÃO, G. F. Guillain-Barre syndrome and its correlation with dengue, Zika and chikungunya viruses infection based on a literature review of reported cases in Brazil. **Acta Tropica**, v. 197, n. March, p. 105064, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105064>>.

LONDONO-RENTERIA, B.; TROUPIN, A.; CARDENAS, J. C.; HALL, A.; PEREZ, O. G.; CARDENAS, L.; HARTSTONE-ROSE, A.; HALSTEAD, S. B.; COLPITTS, T. M. A relevant in vitro human model for the study of Zika virus antibody-dependent enhancement. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1702–1712, 2017.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

LORENZ, C.; AGUIAR, B. S.; AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; SUESDEK, L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. p. 1–19, 2017.

LOWE, R.; BARCELLOS, C.; BRASIL, P.; CRUZ, O. G.; HONÓRIO, N. A.; KUPER, H.;

CARVALHO, M. S. The zika virus epidemic in brazil: From discovery to future implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/1/96>>.

LUO, Z. F.; HU, B.; ZHANG, F. Y.; LIN, X. H.; XIE, X. Y.; PAN, K. Y.; LI, H. Y.; REN, R. W.; ZHAO, W. Z. Laboratory and molecular characterization of dengue viruses in a 2014 outbreak in guangfo region, Southern China. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 70, n. 5, p. 528–535, 2017.

LYNCH, R. M.; MANTUS, G.; ENCINALES, L.; PACHECO, N.; LI, G.; PORRAS, A.; MENDOZA, A. R.; PENG, J.; RENGIFO-PARDO, M.; CRUZ, M. M.; HARRIS, E.; BETHONY, J. M.; SIMON, G. L.; CHANG, A. Y. Augmented zika and dengue neutralizing antibodies are associated with guillain-Barré syndrome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 219, n. 1, p. 26–30, 2019.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C.; JIMÉNEZ DE OYA, N. Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018a.

MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C.; JIMÉNEZ DE OYA, N. Antibody-Dependent Enhancement and Zika: Real Threat or Phantom Menace? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2018b.

MARTINEZ, E. Z. **2003_a_curva_ROC_para_testes_diagnosticos_cadernos_saude_coletiva_vol11_JanJun.pdf**, 2003. .

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>>.

MORRIS, G.; BARICHELLO, T.; STUBBS, B.; KÖHLER, C. A.; CARVALHO, A. F.; MAES, M. Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4160–4184, 2018.

MUNOZ-JORDAN, J. L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S951–S956, 2017.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, 2018.

NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13036-016-0046-z>>.

NÓBREGA, M. E. B. da; ARAÚJO, E. L. de L.; WADA, M. Y.; LEITE, P. L. E.; DIMECH, G. S.; PÉRCIO, J. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 2, p. e2017039, 2018.

NUNES, A. R. D.; ALVES, B. E. B.; PEREIRA, H. W. B.; NASCIMENTO, Y. M.; MORAIS, I. C.; FERNANDES, J. V.; ARAÚJO, J. M. G.; LANZA, D. C. F. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. v. 113, n. 5, p. 1–9, 2018.

PANTOJA, P.; PÉREZ-GUZMÁN, E. X.; RODRÍGUEZ, I. V.; WHITE, L. J.; GONZÁLEZ, O.; SERRANO, C.; GIAVEDONI, L.; HODARA, V.; CRUZ, L.; ARANA, T.; MARTÍNEZ, M. I.; HASSERT, M. A.; BRIEN, J. D.; PINTO, A. K.; DE SILVA, A.; SARIOL, C. A. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. **Nature Communications**, v. 8, 2017.

PATEL, P.; ABD EL WAHED, A.; FAYE, O.; PRÜGER, P.; KAISER, M.; THALOENGSOOK, S.; UBOL, S.; SAKUNTABHAI, A.; LEPARC-GOFFART, I.; HUFERT, F. T.; SALL, A. A.; WEIDMANN, M.; NIEDRIG, M. A Field-Deployable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of the Chikungunya Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2016.

PESSÔA, R.; PATRIOTA, J. V.; LOURDES DE SOUZA, M. de; FELIX, A. C.; MAMEDE, N.; SANABANI, S. S. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil,

Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3201, mar. 2016. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201603220-00059>>.

PNCQ. **Valores De Referência Hematológicos Para Adultos E Crianças**. Disponível em: <<https://www.pncq.org.br/uploads/2019/VNH2019.pdf>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

PREMKUMAR, L.; COLLINS, M.; GRAHAM, S.; LIOU, G. A.; LOPEZ, C. A.; JADI, R.; BALMASEDA, A.; BRACKBILL, J. A.; DIETZE, R.; CAMACHO, E.; SILVA, A. D. De; GIUBERTI, C.; LUCIA, H.; SINGH, T.; HEIMSATH, H.; WEISKOPF, D.; SETTE, A.; OSORIO, J. E.; PERMAR, S. R.; MILEY, M. J.; LAZEAR, H. M.; HARRIS, E.; SILVA, M. De. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. v. 56, n. 3, p. 1–13, 2018.

PRIYAMVADA, L.; HUDSON, W.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. **Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: Implications for protection and pathology** *Emerging Microbes and Infections*, 2017a. .

PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K. M.; HUDSON, W. H.; ONLAMOON, N.; SEWATANON, J.; EDUPUGANTI, S.; PATTANAPANYASAT, K.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MULLIGAN, M. J.; WILSON, P. C.; AHMED, R.; SUTHAR, M. S.; WRAMMERT, J. 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, 2016.

PRIYAMVADA, L.; SUTHAR, M. S.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. Humoral Immune Responses Against Zika Virus Infection and the Importance of Preexisting Flavivirus Immunity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S906–S911, 2017b.

RABONI, S. M.; BONFIM, C.; ALMEIDA, B. M.; ZANLUCA, C.; KOISHI, A. C.; RODRIGUES, P. R. V. P.; KAY, C. K.; RIBEIRO, L. L.; SCOLA, R. H.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Flavivirus cross-reactivity in serological tests and Guillain-Barré syndrome in a hematopoietic stem cell transplant patient: A case report. **Transplant Infectious Disease**, v. 19, n. 4, p. 1–5, 2017.

RICCIARDI, M. J.; MAGNANI, D. M.; GRIFONI, A.; KWON, Y. C.; GUTMAN, M. J.; GRUBAUGH, N. D.; GANGAVARAPU, K.; SHARKEY, M.; SILVEIRA, C. G. T.; BAILEY, V. K.; PEDREÑO-LOPEZ, N.; GONZALEZ-NIETO, L.; MAXWELL, H. S.; DOMINGUES, A.; MARTINS, M. A.; PHAM, J.; WEISKOPF, D.; ALTMAN, J.; KALLAS, E. G.; ANDERSEN, K. G.; STEVENSON, M.; LICHTENBERGER, P.; CHOE, H.; WHITEHEAD, S. S.; SETTE, A.; WATKINS, D. I. Ontogeny of the B- and T-cell response in a primary Zika virus infection of a dengue-naïve individual during the 2016 outbreak in Miami, FL. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–23, 2017.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; COSTA, F.; NASCIMENTO, E. J. M.; JÚNIOR, N. N.; CASTANHA, P. M. S.; SACRAMENTO, G. A.; CRUZ, J.; CARVALHO, M.; DE OLIVERA, D.; HAGAN, J. E.; ADHIKARLA, H.; WUNDER, E. A.; COÊLHO, D. F.; AZAR, S. R.; ROSSI, S. L.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C.; RIBEIRO, G. S.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E.; NOGUEIRA, M. L.; REIS, M. G.; MARQUES, E. T. A.; CUMMINGS, D. A. T.; KO, A. I. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607–610, 2019.

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; FAILOC-ROJAS, V. E.; DÍAZ-VÉLEZ, C. Gastrointestinal, respiratory and/or arboviral infections? What is the cause of the Guillain-Barré syndrome epidemics in Perú? Current status – 2019. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 30, n. June, p. 114–116, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.06.015>>.

ROGERS, T. F.; GOODWIN, E. C.; BRINEY, B.; SOK, D.; BEUTLER, N.; NEDELLEC, R.; LE, K.; BROWN, M. E.; BURTON, D. R.; WALKER, L. M. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. v. 6809, 2017.

ROMEIRO, M. F.; DE SOUZA, W. M.; TOLARDO, A. L.; VIEIRA, L. C.; COLOMBO, T. E.; AQUINO, V. H.; NOGUEIRA, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Evaluation and optimization of SYBR green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the flavivirus genus in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 279–285, 2016.

ROTH, C.; DELGADO, F. G.; SIMON-LORIÈRE, E.; SAKUNTABHAI, A. Immune responses to dengue and Zika viruses—Guidance for T cell vaccine development. **International Journal of**

Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 2, p. 1–12, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/385>>.

SABORÍO GALO, S.; GONZÁLEZ, K.; TÉLLEZ, Y.; GARCÍA, N.; PÉREZ, L.; GRESH, L.; HARRIS, E.; BALMASEDA, Á. Development of in-house serological methods for diagnosis and surveillance of chikungunya. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, v. 41, p. e56, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28902269>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28902269>>.

SLAVOV, S.; FERREIRA, F.; RODRIGUES, E.; GOMES, R.; COVAS, D.; KASHIMA, S. Simultaneous zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 56, n. 2, p. 166–169, 2019.

SLON CAMPOS, J. L.; POGGIANELLA, M.; MARCHESE, S.; MOSSENTA, M.; RANA, J.; ARNOLDI, F.; BESTAGNO, M.; BURRONE, O. R. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–19, 2017.

SOUZA, A. S. R.; TENORIO CORDEIRO, M.; DO AMARAL MENESES, J.; HONORATO, E.; ARAUJO JÚNIOR, E.; MAYRELLE DA SILVA CASTANHA, P.; VARGINHA RAMOS CAIADO, B.; DE LOURDES LORETO FAQUINI, S.; GOMES SANTOS NETO, O.; ARAÚJO DE CARVALHO SCHETTINI, J.; MEDEIROS DE MELLO, L.; CATARINA ISHIGAMI, A.; DHALIA, R. Diagnostico clínico e laboratorial do Zika vírus congênito e paralisia diafragmática unilateral: o relato de um caso. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife**, v. 16, n. 4, p. 475–81, 2016.

ST. JOHN, A. L.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 4, p. 218–230, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0123-x>>.

STETTLER, K.; BELTRAMELLO, M.; ESPINOSA, D. A.; GRAHAM, V.; CASSOTTA, A.; BIANCHI, S.; VANZETTA, F.; MINOLA, A.; JACONI, S.; MELE, F.; FOGLIERINI, M.; PEDOTTI, M.; SIMONELLI, L.; DOWALL, S.; ATKINSON, B.; PERCIVALLE, E.; SIMMONS,

C. P.; VARANI, L.; BLUM, J.; BALDANTI, F.; CAMERONI, E.; HEWSON, R.; HARRIS, E.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; CORTI, D. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, 2016.

VAN MEER, M. P. A.; MÖGLING, R.; KLAASSE, J.; CHANDLER, F. D.; PAS, S. D.; VAN DER EIJK, A. A.; KOOPMANS, M. P. G.; REUSKEN, C. B. E. M.; GEURTSVANKESSEL, C. H. Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. **Journal of Clinical Virology**, v. 92, n. April, p. 25–31, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.05.001>>.

VASUDEVAN, R. S. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**. [s.l: s.n.]v. 1062

WALTEROS, D. M.; SOARES, J.; STYCZYNSKI, A. R.; ABRAMS, J. Y.; GALINDO-BUITRAGO, J. I.; ACOSTA-REYES, J.; BRAVO-RIBERO, E.; ARTETA, Z. E.; SOLANO-SANCHEZ, A.; PRIETO, F. E.; GONZALEZ-DUARTE, M.; NAVARRO-LECHUGA, E.; SALINAS, J. L.; BELAY, E. D.; SCHONBERGER, L. B.; DAMON, I. K.; OSPINA, M. L.; SEJVAR, J. J. Long-term outcomes of Guillain-Barré syndrome possibly associated with Zika virus infection. **Plos One**, v. 14, n. 8, p. e0220049, 2019.

WILD, D. **The Immunoassay Handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques (Google eBook)**. [s.l: s.n.]

WILLIS, E.; HENSLEY, S. E. Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. v. 508, p. 1–6, 2017.

XAVIER, A. R.; KANAAN, S.; BOZZI, R. P.; AMARAL, L. V. Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 4, p. 252–257, 2017. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20170039>>.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UEG - UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE GOIÁS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Montagem e Validação de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de Anticorpos IgG de Zika Vírus.

Pesquisador: Christiane Oliveira Lima Licínio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11018119.2.0000.8113

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.340.164

Apresentação do Projeto:

O objetivo do estudo é a montagem de um produto nacional de metodologia ELISA para a detecção de anticorpos IgG para Zika Vírus, comprovando a sua eficácia, conformidade com a legislação vigente e aplicabilidade em diversas matrizes sorológicas. O estudo será do tipo transversal prospectivo, através da análise de 15 amostras de pacientes, coletados em Goiânia, em indivíduos que apresentem sintomas semelhantes aos casos de Zika Vírus e foram confirmados como portadores da infecção. A quantidade de amostras foi definida pelo uso de amostragem estatística (LEE) utilizando a prevalência estadual (Goiás) de Dengue, no ano de 2016. O produto será montado seguindo as normas sanitárias vigentes, assegurando o Controle e Garantia da Qualidade do produto. As amostras de sangue serão coletadas em tubos secos e através de papel filtro específico para coleta de amostras, obtendo-se o sangue seco. Serão analisadas ambas matrizes biológicas, a fim de se comprovar que o produto não sofre interferência do método de coleta. O estudo será realizado em 24 meses e espera-se que o produto apresente sensibilidade e especificidade acima de 98%, oferecendo um recurso diagnóstico barato, rápido, de fácil execução e de resultados confiáveis para a infecção pelo vírus Zika. Será coletado 10 mL de sangue venoso de cada participante da pesquisa. Serão analisados o soro (centrifugação do sangue coletado) e o sangue total coletado em papel filtro. Coleta única para ambas análises. Os participantes da pesquisa serão selecionados a partir da afirmação de que já tiveram a manifestação de sintomas clínicos parecidos com os sintomas de uma arbovirose: dores de cabeça, artralgia, mialgia e

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo

Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO **CEP:** 75.132-903

UF: GO **Município:** ANAPOLIS

Telefone: (62)3328-1434

E-mail: cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.340.164

erupção cutânea. Serão convidados a participar da pesquisa através de um questionário de informações e da coleta de 10 mL de sangue venoso, aproximadamente, e gotas de sangue para a coleta em papel filtro (3 áreas do papel filtro). O sangue será coletado através de punção venosa, em ambiente ambulatorial por pessoal treinado e identificado com um código para cada participante, sendo o mesmo código usado no questionário, evitando-se assim trocas de materiais biológicos. Será mantido sob refrigeração até o laboratório de controle de qualidade, onde sofrerá processamento: centrifugação e separação do soro e eluição do sangue seco. As amostras então serão congeladas a -20°C, para conservação durante os ensaios. Serão realizados os testes *in vitro*, com o soro e sangue seco coletados dos sujeitos da pesquisa, com os kits para detecção de anticorpos IgG do Zika Vírus, metodologia Elisa. Serão realizadas duas baterias de testes com a mesma amostra: um ensaio com o soro coletado e um ensaio com sangue seco eluído, sendo três replicatas de cada matriz biológica. Assim, cada amostra será testada 6 vezes para o mesmo parâmetro.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Montar e validar um produto nacional para diagnóstico imunoenzimático, metodologia ELISA, para detecção de anticorpos da classe IgG do Zika Vírus.

Objetivo Secundário:

- Validar o produto comprovando sua sensibilidade analítica;
- Validar o produto comprovando sua especificidade analítica;
- Validar o produto comprovando sua reprodutibilidade;
- Validar o produto em conformidade com as especificações do usuário;
- Validar o produto segundo as normas regulatórias vigente, das autoridades sanitárias nacionais (ANVISA);
- Validar o produto para uso com soro do paciente;
- Validar o produto para uso com amostra do paciente coletada em papel filtro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos físicos ou psicológicos são mínimos, não maiores do que os riscos vivenciados cotidianamente por pessoas que realizam coleta de material biológico em laboratórios de análises

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 ç Bloco III ç Térreo
Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO **CEP:** 75.132-903
UF: GO **Município:** ANAPOLIS
Telefone: (62)3328-1434 **E-mail:** cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.340.164

clínicas.

Benefícios:

Geração de conhecimento. Validação de uma ferramenta diagnóstica pouco invasiva e muito eficaz, na diferenciação de doenças graves. Diferenciação entre doenças, visto que alguns casos de Zika são tratados como Dengue. Assim, há uma possibilidade de melhoria em dados epidemiológicos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma proposta de grande relevância acadêmica e científica, além de grande importância social, considerando o flagelo que esta doença proporciona particularmente entre crianças em período gestacional. Certamente, o aprimoramento do diagnóstico deste agente infeccioso poderá prover importantes avanços no combate preventivo da doença e em termos de conhecimento epidemiológico desta importante arbovirose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constam todos os Termos de apresentação obrigatória.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Apesar de na descrição das informações básicas ainda constar uma percepção muito incipiente sobre os riscos, este aspecto foi descrito adequadamente no TCLE e no TALE. Os Termos estão descritos apropriadamente.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UEG considera o presente protocolo APROVADO e que o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar o Relatório Final de acordo com o disposto nas Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. O modelo encontra-se disponível na página do CEP-UEG. O prazo para a entrega do relatório, via notificação na Plataforma Brasil, é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, previsto para dezembro de 2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1313668.pdf	08/05/2019 15:07:50		Aceito

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 º Bloco III º Térreo
Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO **CEP:** 75.132-903
UF: GO **Município:** ANAPOLIS
Telefone: (62)3328-1434 **E-mail:** cep@ueg.br

Continuação do Parecer: 3.340.164

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_Christiane_v02.pdf	08/05/2019 15:07:24	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_ao_parecer.pdf	08/05/2019 15:07:03	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_v02.pdf	08/05/2019 15:06:30	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v02.pdf	08/05/2019 15:06:20	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso.pdf	03/04/2019 12:28:19	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	01/04/2019 19:27:55	Christiane Oliveira Lima Licínio	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANAPOLIS, 22 de Maio de 2019

Assinado por:
Luciana de Souza Ondei
(Coordenador(a))

Endereço: BR 153 Quadra Área, Km 99 º Bloco III º Térreo
Bairro: FAZENDA BARREIRO DO MEIO **CEP:** 75.132-903
UF: GO **Município:** ANAPOLIS
Telefone: (62)3328-1434 **E-mail:** cep@ueg.br

ANEXO II – Normas de publicação do periódico Enciclopédia Biosfera

1. EDITAL PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS

Este edital apresenta as normas para submissão de trabalhos a serem publicados na **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**

A Formatação incorreta, a grafia incorreta de referências e demais solicitações de normas que não forem atendidas implica em RECUSA SUMÁRIA do artigo. Por gentileza leia atentamente as regras, siga modelo de artigo já publicado no endereço: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2018B/AGRAR/a%20bovinocultura.pdf>

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DE TRABALHOS

1) Forma de apresentação: O artigo científico, relato de caso ou revisão bibliográfica deverá ser apresentado de forma completa. Deve ser digitado em formato DOC (**não sendo aceito PDF, ou outro**), contendo Título, nome(s) completo(s) do(s) autor(es) (sem abreviações), colocar UM e-mail do autor correspondente, observar regras de construção do cabeçalho do artigo- vide modelo já publicado.

2) O trabalho deve ter:

- resumo em língua portuguesa (centralizado)
- palavras-chave escrita em negrito e caixa alta (palavras em ordem alfabética, no mínimo três palavras)
- título em língua estrangeira (negrito, caixa alta, centralizado)
- resumo em língua estrangeira (abstract), palavras-chave em língua estrangeira (keywords).
- O resumo deve ter o máximo de 250 palavras.

USO DE REFERÊNCIAS :

CITAÇÕES

*Citações (ABNT), sobre caixa baixa ou ALTA: *Citação no início ou meio de frase (ano) - caixa baixa;
CITAÇÃO NO FINAL DE FRASE (ano) - CAIXA ALTA.

Exemplos:

Se um autor: Vieira (2019) ou (VIEIRA, 2019);

Exemplo:

De acordo com Vieira (2019) a vacinação deve ser realizada até os cinco anos de idade. **OU** A vacinação deve ser realizada até os cinco anos de idade (VIEIRA, 2019)

Se dois autores: Keller e Karmelli (1974) ou (KELLER; KARMELLI, 1974);

Exemplo:

De acordo com Keller e karmelli (1974) o estágio larval ocorre aos 7 dias.

OU: O estágio larval ocorre aos 7 dias (KELLER ; KARMELLI, 1974)

Se três ou mais autores: Vieira et al. (2019) ou (VIEIRA et al., 2019).

Exemplo:

Conforme verificado por Vieira et al. (2019) as incidências temporais são sazonais.

OU: As incidências temporais são sazonais (VIEIRA et al., 2019)

Na lista de Referências só colocar et al. *após* **quinto autor** e os títulos dos periódicos deverão ser completos e não abreviados. Incluir DOI quando o periódico possuir este número, aqueles que não tem DOI colocar apenas o endereço eletrônico do documento.

3) O número de palavras-chave e os respectivos keywords deverão ser três.

4) **O artigo científico regular deve apresentar as seções: introdução, objetivos (que podem estar inseridos na introdução), material e métodos, resultados e discussão, conclusão (se for o caso), agradecimentos (se houverem) e referências.**

A revisão bibliográfica deve possuir as seguintes seções: introdução, tópicos diversos escolhidos pelos autores, considerações finais, agradecimentos (se houverem) e referências.

O relato de caso deve apresentar: introdução, Relato de caso, Resultados e discussão, conclusão.

A formatação seguirá as normas de

- corpo do texto justificado com recuo de parágrafo

- espaçamento **simples** entre linhas

- margem superior e esquerda de 3 cm, margem inferior e direita de 2 cm

- O texto deve ter no mínimo 7 (sete) páginas e com limite máximo de 15 para relatos de caso e artigos científicos, incluindo a lista de referências neste número de páginas.

- Revisões de literatura **NÃO** devem apresentar número de páginas inferior a 15, incluindo a lista de referências.

- papel tamanho A4, com fonte Arial tamanho 12

- **NÃO** NUMERAR nem linhas, nem páginas do documento.

- Não inserir linhas divisórias no texto para separação de autores.

5) Inserção de Tabelas e Figuras deverá ser feita imediatamente após a chamada no texto. As figuras deverão ser apresentadas em formato jpg, com resolução mínima de 300 dpi. Orientamos para que o trabalho tenha preferencialmente tamanho máximo de 1.000Kb.

- As figuras devem informar a FONTE.

- O cabeçalho da Tabela deve vir acima da Tabela (NORMA ABNT)

- A descrição da Figura deve vir abaixo da Figura. Para mais detalhes a respeito da formatação de Tabelas e Figuras consultar trabalhos já publicados no periódico (NORMA ABNT)

6) As situações não previstas devem seguir o que é determinado pelas normas da ABNT.

7) São aceitos trabalhos nos idiomas: **português, espanhol e inglês.**

8) São aceitos artigos nas formas:

a - **Pesquisa científica com resultados;**

b - **Estudo de caso;**

c - **Revisão Bibliográfica;**

9) Para todas as publicações: devem conter, pelo menos, 60% das referências citadas sendo dos últimos cinco anos.

- **Não citar trabalhos oriundos de resumos de congressos, teses e dissertações.**

10) TRABALHOS QUE NÃO ESTIVEREM DENTRO DA FORMATAÇÃO INDICADA NO EDITAL SERÃO RECUSADOS SUMARIAMENTE.

11) As submissões de trabalhos devem ser feitas obedecendo às regras do mesmo.

12) Trabalhos resultantes de pesquisa com pessoas ou animais devem informar o parecer do comitê de ética e número de registro. (esta informação pode ser enviada anexa ao trabalho)

13) Orientações para desenvolvimento do texto:

- Trabalho científico deve ser escrito de forma impessoal, não usem textos em terceira pessoa.
- Referências no texto devem constar na lista final e vice-versa.
- **NÃO SÃO ACEITOS ARTIGOS DE OPINIÃO.**
- Todos os artigos submetidos recebem resposta dos avaliadores e orientações para que os autores possam melhorar seus trabalhos (quando for o caso).

14) As referências deverão ser apresentadas em ordem alfabética, não numeradas e com um espaço entre as mesmas.

IMPORTANTE:

Para as referências oriundas de artigos científicos, OBRIGATORIAMENTE inserir a URL e o número de identificação de DOI (se houver).

Exemplo:

VIJAYARAGHAVAN, K.; JOSHI, U. M. Hybrid Sargassum-sand sorbent: A novel adsorbent in packed column to treat metal-bearing wastewaters from inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 48, n. 13, p. 1685-1693, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2013.815503>>. doi: 10.1080/10934529.2013.815503

Outras informações pelo e-mail biosfera@innovatio.org.br

REGRAS DO EDITAL

1) A Enciclopédia Biosfera é um periódico científico com acesso livre e irrestrito por meio do site www.conhecer.org.br

2) Podem ser submetidos **artigos científicos regulares, relatos de caso e revisões bibliográficas.**

3) Serão publicados apenas trabalhos inéditos. **Não serão aceitos** trabalhos com resultados **já publicados** em anais ou suplementos (congressos, simpósios, encontros, semana acadêmica, jornada) e em dissertação/tese.

4) Por ser uma Enciclopédia, são aceitos artigos em quaisquer áreas do conhecimento.

5) Cada autor poderá submeter até cinco trabalhos por edição, mesmo na condição de autor ou co-autor.

6) O artigo poderá ter no máximo cinco autores.

7) Os trabalhos devem ser enviados por e-mail, na forma de anexo, ao e-mail biosfera@innovatio.org.br. O formato do artigo deve ser DOC. Não serão aceitos artigos no formato PDF ou outros. Caso a submissão não ocorra no formato DOC, o artigo será RECUSADO SUMARIAMENTE.

Além do artigo é necessário o envio dos seguintes documentos:

- Autorização para publicação (VER MODELO DE AUTORIZAÇÃO DE TRABALHO NO FINAL DO EDITAL) sem ônus ao Centro Científico Conhecer, assinada por todos os autores do trabalho.
- Cópia do comprovante de pagamento da taxa de submissão.
- Checklist devidamente preenchido e assinado pelo autor correspondente (VER CHECK-LIST NO FINAL DO EDITAL).

Único: A Enciclopédia Biosfera envia e-mail de confirmação do recebimento de cada artigo. Após a submissão a Enciclopédia Biosfera entra em contato somente pelo e-mail que estiver no documento, é a **única forma de contato com os autores** a ser utilizada. Evitar o uso de e-mail de instituição, geralmente não chegam ao destino sendo enviados para lixeira ou spam.

8) Os autores poderão desistir da submissão do artigo. Se esta desistência ocorrer em até 15 dias após a submissão, a taxa de submissão será devolvida. Após este período, não haverá devolução da taxa de submissão.

9) Seleção dos artigos: Os artigos serão avaliados pela Comissão Técnico-Científica. Esta avaliação é feita na modalidade **simples-cego**, no qual apenas a identidade dos revisores é mantida em segredo, inclusive após a publicação do artigo.

10) A Comissão Técnico-Científica poderá tomar as seguintes deliberações:

a) Reprovar o artigo sem observações, nos casos de plágio e/ou auto-plágio com qualquer documento já publicado mediante relatório do software **CopySpider**. A taxa de similaridade não poderá ser maior que **3%**. Maior que esta, o artigo será **RECUSADO SUMARIAMENTE**. Este é um software gratuito que pode ser utilizado pelos autores.

- Cópia literal ou aproveitamento de texto de terceiros é considerado plágio. Quando esta cópia ocorre de um outro trabalho do próprio autor esta prática é considerada autoplágio. **EVITAR QUALQUER FORMA DE PLÁGIO.**

ATENÇÃO: Conforme o Código Penal Brasileiro, artigo 184, **PLÁGIO** é crime. A punição pode variar desde pagamento de multa a reclusão por quatro anos.

b) Reprovar o artigo quando apresentar qualidade técnica insuficiente seja pela inconsistência na redação científica, metodologia e resultados apresentados.

Único: Um artigo é avaliado pelo mínimo de três avaliadores com mestrado ou doutorado. No caso de controvérsia de opiniões, a editora-chefe será responsável por fazer nova avaliação e tomar a decisão final, que pode incluir a solicitação de correções.

c) Solicitar correções no artigo mediante parecer dos editores e revisores. Os autores terão a oportunidade de realizar os ajustes e uma nova avaliação será conduzida para verificar a consistência técnico-científica do trabalho.

d) Aprovar o artigo.

11) Do recurso: A decisão sobre os artigos pela Comissão Técnico-Científica são **IRRECORRÍVEIS**.

12) Publicação: Os artigos serão publicados em formato PDF, sem restrições, no sitio da revista digital **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, de ISSN Nº 1809-0583. A inscrição do trabalho implica em autorização para a publicação integral, sem qualquer ônus ao Centro Científico Conhecer. O(s) autor(es) deverá entregar junto à inscrição a declaração de autorização para publicação, em anexo. **Os trabalhos serão publicados conforme datas constantes no início deste edital.**

13) Para realizar a inscrição de cada artigo, será cobrada uma taxa de submissão no valor de R\$ 90,00 (noventa reais). Cópia do comprovante de depósito deve acompanhar a autorização de publicação enviada por e-mail. O depósito deve ser realizado: **Banco do Brasil , conta n. 24558-5 Agencia 3486-X Titular: CENTRO CIENTIFICO CONHECER**

OBSERVAÇÃO: NÃO EMITIMOS NOTA FISCAL RELATIVA A ESTE SERVIÇO, EMITIMOS RECIBO.

14) Os artigos aprovados para publicação deverão fazer o pagamento de valor complementar de R\$ 110,00 (cento e dez reais). Os artigos recusados para publicação não deverão fazer o depósito deste valor complementar.

15) O artigo será publicado somente se:

- FOR ACEITO PELA COMISSÃO TÉCNICA-CIENTÍFICA;

-HOUVER PAGAMENTO DA TAXA DE PUBLICAÇÃO.

16) Os autores que desejarem fazer o pagamento com cartão de crédito, inclusive de forma parcelada (até seis vezes), deverão fazer esta solicitação pelo e-mail **biosfera@innovatio.org.br**

17) Os autores estão cientes que não será devolvido o valor pago referente a submissão de artigos que forem **recusados**.

18) Após a submissão do artigo, não será aceita a troca, retirada ou inclusão de autores.

19) As informações apresentadas no trabalho são de responsabilidade exclusiva de seus autores.

Atenciosamente,

Profa. Ivonete Parreira

Presidente da Comissão Editorial e Científica

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade contínua, é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts, além de ser integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado em inglês e português, com resumo em português e espanhol.

ANÁLISE DOS TRABALHOS

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

ÉTICA

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho enviado deverá ser acompanhado de consentimento, por escrito, do paciente e de cópia da aprovação (certificado) do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, 1989.

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996).

As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que

questões relacionadas com acurácia ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na secção de Agradecimentos (*Acknowledgements*). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo.

Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

TITULAÇÃO

O nome dos autores deverá ser referido da seguinte forma: primeiro nome e último sobrenome serão grafados por extenso e nomes intermediários serão abreviados. Acrescentar após o nome de cada autor seu respectivo ORCID. Deve-se inserir nos créditos apenas a Instituição onde cada autor atua. O nome da instituição será grafado em português ou no idioma do país sede da instituição, relacionado por número ao nome dos autores correspondentes.

RESUMOS E UNITERMOS

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais e artigos de revisão; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves).

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês.

AGRADECIMENTOS

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

ESTRUTURA DO TEXTO

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento

do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O *Abstract* (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências.

Arte na ciência

Nesta seção, serão aceitas manifestações artísticas relacionadas com a ciência e documentações científicas que possam ser consideradas como arte. Incluem-se, mas não esgotam as possibilidades, textos literários, poemas, fotografias, quadros e figuras.

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Artigos de atualização

São trabalhos descritivos e interpretativos com base na literatura recente sobre a situação global em que se encontra determinado assunto. Devem conter até 3 mil palavras. A estrutura do texto fica a critério do autor, mas deve haver um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês, além de referências bibliográficas.

Relatos de caso

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

Cartas aos editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase "para publicação".

REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na

forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

• Artigos de periódicos (um só autor)
Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.

• Artigos de periódicos (até seis autores)
Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.

• Artigos de periódicos (mais de seis autores)
Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res*. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.

• Artigo de periódico on-line
Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol* [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.

• Livros no todo (dois autores)
Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.

• Capítulos ou parte de livro editado por outro autor
Mendenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.

• Parte de livro em meio eletrônico
São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.

• Evento em meio eletrônico
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. *Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming*; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

• Tese ou dissertação

Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.

• Citações no texto

Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

TABELAS E FIGURAS

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png.

ABREVIÇÕES E NOMES DE MEDICAMENTOS

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

CONTATO COM A SECRETARIA DO JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Tel.: +55 (21) 3077-1400
e-mail: jbpml@sbpc.org.br

COMO SUBMETER UM ARTIGO AO JPBML

1. Entre em www.jbpml.org.br.
2. Se você já é cadastrado, digite seu login e sua senha e clique no botão "Entrar no SGP".

Se ainda não é cadastrado, clique em "Quero me Cadastrar".

3. Primeiro passo: no campo "Informe seu Email", cadastre o e-mail que será usado para receber os avisos e informações do Sistema de Gestão de Publicações (SGP).

Clique em "Continuar cadastro".

4. Segundo passo: preencha os campos do cadastro. Atenção: os campos marcados com * são obrigatórios.

Clique em "Continuar cadastro". Aparecerá a mensagem "Seu cadastro no SGP foi concluído com sucesso". Um e-mail com o login e a senha informados será enviado para seu endereço cadastrado.

Nesta mesma página, clique em "Voltar".

5. Você será encaminhado à página inicial do SGP, com login e senha. Nesta página, digite o login e a senha que você cadastrou e clique em "Entrar no SGP".

Obs.: o login e a senha estão no e-mail que o SGP lhe enviou no final do seu cadastro.

6. Na página de abertura do SGP aparece uma mensagem informando ser esta a primeira vez que você acessa o sistema. Caso contrário, a mensagem informa quantas vezes já o acessou, data e hora do último acesso e que você tem acesso com nível de autor.

7. Observe o menu do lado esquerdo da tela. Se você ainda não submeteu nenhum artigo pelo SGP, todos os itens do menu estão indicados com quantidade "zero".

8. Para submeter um artigo, clique em "Submeter novo artigo para Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial".

9. Janela "Passo 1": informar a classificação do artigo (manuscrito):

- Artigo de revisão
- Artigo original
- Carta ao editor
- Comunicação breve
- Relato de caso

Clique na opção correspondente à classificação do artigo. Por exemplo: Artigo original.

10. Janela "Passo 2": anexar imagens e/ou gráficos usados no artigo. Todas as imagens e/ou gráficos devem estar em um dos seguintes formatos: jpg, gif, png, pdf ou tif.

Após anexar imagens/gráficos, clique em "Enviar imagens". Caso o artigo não tenha imagens, clique em "Não necessito enviar imagens".

11. Nesta janela o autor pode conferir as imagens que enviou e enviar mais. Caso não tenha enviado imagens, aparecerá a mensagem "Nenhuma imagem foi enviada pelo autor".

Clique em "Próximo".

12. Janela "Passo 3": inserir/editar/excluir novos coautores. Para cada novo coautor devem ser preenchidos os campos "Nome", "Titulação", "Cargo" e, opcionalmente, CPF (pedido para posteriormente gerar o termo de Copyright, que garante os direitos autorais).

A ordem de importância dos autores pode ser alterada clicando nas setas amarelas (para cima ou para baixo). O primeiro nome será considerado o autor principal, e os demais, coautores. Após inserir/editar/excluir novos coautores, clique em "Gravar" e em "Próximo".

Se não houver novos coautores, clique em "Próximo".

13. Janela "Passo 4": preencher com o título do artigo e descritores (palavras-chave ou key words). Essas informações devem ser escritas na língua nativa do autor (por exemplo, português ou espanhol) e em inglês.

Clique em "Próximo".

14. Janela "Passo 5": preencher com o resumo (abstract). O autor também pode incluir informações adicionais, como o nome da instituição, nome e endereço para correspondência e se recebeu suporte financeiro. Também é possível redigir uma Carta ao Editor contendo informações adicionais que considere importantes. Somente o editor terá acesso a esta carta. Clique em "Próximo".

15. Janela "Passo 6": redigir o artigo propriamente dito. É fornecido um editor de texto com os comandos necessários para formatação. É possível "colar" um texto já escrito e formatado em MS Word. Clicar em "Próximo".

16. Janela "Passo 7": Transferência de Declaração de Direitos Autorais (Copyright Transfer Statement). Preencher os campos solicitados, imprimir e enviar para a SBPC/ML pelo fax (21) 2205-3386. Clicar em "Próximo".

15. Janela "Passo 8": formato de visualização do artigo (html ou pdf). Nesta janela, o autor decide se vai submeter o artigo ou vai excluí-lo e desistir de fazê-lo.

16. Janela "Concluído": indica que você terminou o processo de submissão do artigo.

19. Você receberá um e-mail comunicando que o artigo foi submetido a avaliação.

Indexadores



ANEXO IV – Normas de publicação da Revista da Sociedade Brasileira de Med. Tropical

INSTRUCTIONS

Scope and policy

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine is a multidisciplinary, open-access, and peer-reviewed journal publishing original research from all fields of tropical medicine (including epidemiology, clinical studies, pathology, and immunology) and infectious diseases. It is the official journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. The journal publishes Major Articles, Short Communications, Case Reports, Editorials, Letters to the Editor, Images in Infectious Diseases, Technical Reports, Obituaries, and Special Numbers (supplements). Review articles are invited by the Editor or Associate Editors. The journal publishes manuscripts only in English. **Its content is freely accessible to readers, and no publication fee is charged from the authors.**

From 2017, the journal has established that the authors will be requested to send the certificate of English review and editing by a professional English editing company during the manuscript submission process.

From January 2019, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** has adopted the yearly continuous publication modality, which is available online on SciELO database.

Review policy

Submission to **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** implies that the manuscript has not been published previously (except in abstract format), and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts submitted for publication in this journal are initially evaluated by the administrative staff to ensure compliance with the journal guidelines. The manuscripts that meet the basic requirements are then sent to reviewers for evaluation through a peer-review system. The journal editors will use detailed reports from the reviewers to decide whether to accept a submitted paper. In case of a difference of opinion among the reviewers, the manuscript will be sent to another reviewer to validate the final editorial decision, in accordance with the submission workflow of the journal (**available online at <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#006>**).

Manuscripts must be written in English and submitted electronically using the following link: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Poor use of English language in manuscripts is the major cause of delay in publication. We strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts preferably translated and edited by a professional English translation and editing company, or checked by a scientist who is a native English speaker. A copy of the certificate should be sent to the journal.

The editorial office can be contacted at the following address:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

e-mail: rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br

Website: <http://www.scielo.br/rsbmt>

Fast-track submissions: According to the established editorial policy, manuscripts considered eligible for fast-track evaluation by the Journal's Editors will be peer-reviewed within one week and, if accepted, they will be published within four to eight weeks. Disease priority will be determined by the Editorial Board according to its epidemic occurrence in Brazil or worldwide.

Preprints: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine supports the international initiatives that resulted in a more transparent editorial process, currently known as the "Open Science" tendency. Thus, manuscripts deposited in the preprint server (bioRxiv) could be submitted to *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine. The peer-review process for articles based on preprint servers will be decided by the Journal's Editorial Board.

(<https://blog.scielo.org/en/2019/10/23/tropical-medicine-infectious-and-parasitic-diseases-journals-align-with-open-science-editorial-practices/#.XbMJH5JKiJA>).

Manuscript types

The journal invites the following types of manuscripts for consideration: Major Articles, Review and Mini-Review Articles, Editorials, Short Communications, Case Reports, Obituaries, Technical Reports, Images in Infectious Diseases, Letters to the Editor, and Special Numbers (Supplements).

Major Articles: Major Article manuscripts must report original research, not previously published or in consideration for publication elsewhere. Major articles have a limit of 3,500 words (excluding the abstract, title, references, and illustrations). Manuscripts must include a structured abstract of not more than 250 words, organized using the following headings: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The manuscript text should be organized into the following sections: title, running title, structured abstract, keywords (three to six), manuscript text (Introduction, Methods, Results, and Discussion), acknowledgments, conflict of interest statement, financial support, references, and figure legends. A total of five illustrations (tables and figures) are allowed.

Systematic Reviews and meta-analyses: We consider submissions with systematic reviews and meta-analyses as research articles. Authors may submit these manuscripts by selecting the "major articles" modality. Reports of systematic reviews and meta-analyses must adhere to the PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>) Statement or other guidelines applicable to the study design.

Review Articles: Review articles should present a critical review of recent trends and progress in the study of infectious diseases/tropical medicine, rather than a simple literature review. **Review articles are usually invited by the Editor or Associate Editors.** Review articles have a limit of 3,500 words (excluding the abstract, title, references, and illustrations) and should be accompanied by a non-structured abstract of up to 250 words. Five illustrations (tables and figures) are allowed. The journal also publishes mini-reviews. These articles have a limit of 3,000 words (excluding the abstract, title, references, and illustrations) and must be accompanied by a non-structured abstract of up to 250 words. Mini-reviews may contain up to three illustrations (tables and figures). The manuscript should be organized into the following sections: title, running title, abstract (non-structured), manuscript text, acknowledgments, conflict of interest statement, financial support, references, and figure legends.

Editorials: Editorials are typically written on invitation, bearing in mind the scope of the journal and its editorial policy. Editorials have a limit of 1,500 words, and do not require an abstract and keywords. They may use one illustration (table or figure), and should have a conflict of interest statement, and a list of 10 or fewer references.

Short Communications: Short communication manuscripts should be reports on exciting new results/techniques of research or investigation in areas within the scope of the journal. Such articles have a limit of 2,000 words (excluding the abstract, title, references, and illustrations). They should have a structured abstract of not more than 100 words (with the subheadings: Introduction, Methods,

Results, and Conclusions) and may include up to 15 references. Up to three illustrations (tables and figures) are allowed. Three to six keywords are allowed. The body of the manuscript should not be divided into topics or subheadings. Acknowledgments, conflict of interest statement, and financial support must be included.

Case Reports: Case Reports must be brief reports with a limit of 1,500 words (excluding the abstract, title, references, and illustrations), with a maximum of three illustrations (tables and figures), up to 12 references, three keywords, and a non-structured abstract of up to 100 words. The body of the manuscript should be divided according to the following headings: Introduction, Case report, Discussion, References, and Figure legends. Acknowledgments, conflict of interest statement, and financial support must be included.

Technical Reports: Technical reports should be concise reports on the results and recommendations of a meeting of experts. Such reports may be also considered if they are formatted as an editorial.

Images in Infectious Diseases: An Images in Infectious Diseases submission must include up to three photographs/figures with the best possible quality. Up to three authors and three references are allowed. The maximum length of such an article is 250 words (excluding title and references), with an emphasis on figure description. The theme should involve the clinical lesson clarified by appropriate illustrations and figure descriptions.

Letters to the Editor: Readers are encouraged to write about any topic related to infectious diseases and tropical medicine that fits into the scope of the journal. Letters should be no longer than 1,200 words, without abstract and keywords, and with only one illustration (table or figure). Letters may discuss material previously published in the journal and cite up to 12 references.

Special Numbers: Proposals for special numbers (supplements) must be made in writing to the Editor and/or Guest Editor. They will be evaluated on the basis of suitability of the topic, program organization, scientific format or production, according to the scope of the journal.

Manuscript preparation

Authors are advised to read these instructions carefully and follow them closely to ensure the timely and efficient review and publication of their manuscript. The editors reserve the right to return manuscripts that do not comply with these guidelines.

Online submission system: All manuscripts to be considered for publication in the journal should be submitted in electronic form via the online submission system at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>. The author must choose one manuscript category from the "Manuscript types" menu: Major Article, Editorial, Review Article, Mini-Review, Short Communication, Case Report, Technical Report, Images in Infectious Diseases, Letter to the Editor, Authors' Reply, or Other (when a submission does not fit any other category). Authors and co-authors are entirely responsible for the contents of the manuscript.

Cover Letter: a) It must contain a statement that the proposed manuscript describes original research and is not published or under consideration for publication by another scientific journal. The cover letter must also state that the data/results of the manuscript are not plagiarized. b) The letter must be signed by all authors and, when strictly impossible, the first and the last author may sign by proxy for the other co-authors. c) The authors must include a declaration of their agreement that the manuscript, after submission, may not have the order or the number of authors altered without providing any justification and/or information to *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* or *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. d) The authors must declare that if the manuscript is accepted for publication, they agree to the transfer of all copyrights to the journal.

Authors must state the server, period, and DOI code in the Cover Letter when uploading a manuscript to the preprint server.

Authors' contribution: The authors must provide one or more contributions each, specifying the contribution of each author to the study, in a separate document, in the submission system. The authors' contributions will be published at the end of the manuscript.

Supplemental material: it is defined as files related to a specific manuscript, which authors supply for publication linked to their manuscripts. Generally, they are additional pieces to the article that could not be included in the issue, such as appendices, spreadsheets, tables, figures that is impossible to present within the article. All supplementary material will be sent to reviewers for peer review. The Editor-in-Chief, Associated, and Section Editors will define the about limits for received supplementary material.

We strongly recommend that Supplementary Material uploaded into the system be in the following format:

- Preferable be uploaded in PDF format or provide link to access files;
- Supplementary tables and figures with five or more pieces please provide a PDF file. Providing small size files for quick download purposes.

Manuscript Template

The manuscript should be prepared using a word processing software, and saved as a .doc or .docx file. Preferred font is Times New Roman, size 12, with double spacing throughout the text, figure legends, and references, with margins of at least 3 cm. Organize the manuscript into the following sections: Cover Letter (addressed to the Editor-in-Chief), Title Page, including Manuscript Title, Running title, Abstract, Keywords, followed by Manuscript Text, Conflict of Interest statement, Acknowledgments, Financial Support, References, and Figure Legends. Cover Letter, Title Page, Acknowledgments, and Financial Support must be provided as separate documents. Abbreviations should be used sparingly.

Title Page: The title page should include the authors' names in direct order and without abbreviations, along with institutional affiliations in the following sequence: author's institution, department, city, state, and country. For Brazilian authors, please do not translate the names of institutions. Complete address of the corresponding author must be specified, including telephone number and e-mail address. The number of authors and co-authors per paper should be limited in accordance with the number of authors that contributed to the manuscript. Except for national and international multicenter studies, up to 20 authors and co-authors will be allowed. The remaining authors' names will be published in a footnote. Provide the ORCID number of the corresponding author and all co-authors.

Potential reviewers: Authors must provide names and contact information (e-mail address and institutional affiliations) of three potential unbiased reviewers, from an institution different from that of the authors.

Title: The title should be as concise, clear, and informative as possible. It should not contain abbreviations and should not exceed 250 characters.

Running Title: The running title may include up to 100 characters.

Structured Abstract: The structured abstract should summarize the results obtained and the major conclusions in such a way that a reader not already familiar with the particular topic of the paper can understand the implications of the article. The abstract should not exceed 250 words and must be structured with the following headings: Introduction, Methods, Results, and Conclusions. The use of

abbreviations should be avoided.

Keywords: Three to six keywords should be listed immediately below the structured abstract (Example: Tuberculosis. Primary health care. Structure of services.). Please visit the website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> for reference.

Introduction: The article's introduction should be brief, and stating the purposes for which the study has been performed. Previous studies should be cited only when essential.

Methods: The methods used in the study should be clear and sufficiently detailed, so that the readers and reviewers can understand precisely what has been done and allow replication of the study by others. Standard techniques only need to be referenced.

Ethics: If the work involves human subjects, the author should indicate that the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional, regional, or national) and in accordance with the principles of Declaration of Helsinki, 1964, as revised in 1975, 1983, 1989, 1996, and 2000. For animal experiments, the author should indicate whether a national research council's guide for animal experimentation or any law on the care and use of laboratory animals was complied with. The approval number must be sent to the journal. In case of research on humans, authors must include in the methods section (ethical considerations subsection), a statement that the study was approved by the Institutional Ethics Committee.

Clinical trials: In the case of clinical trials, the manuscript should be accompanied by the registration number and agency of registration of the clinical trial (REBEC platform).

Results: The results section should be a concise and impersonal account of the new information (all relevant positive and negative findings) revealed by the study. Avoid repeating in the text the data presented in the tables or illustrations and use past tense to write the results.

Discussion: The discussion section should be limited to the significance of the new information and tightly argued, considering the clinical relevance, strengths, and study limitations. Do not include a general review of the topic. Keep the discussion concise and relevant. The main conclusions should be presented as the last paragraph of the discussion section.

Acknowledgments: Any acknowledgments should be short, concise, and restricted to those that are necessary and do not meet the authorship criteria. In case of sponsoring institutions, do not use acronyms.

Conflict of Interest: All authors are required to disclose any type of conflict of interest during the development of the study.

Financial Support: List all the financial support received from agencies, institutions, and other organizations that funded a part or whole of the research.

References: Only references cited in the text should be included in the list at the end of the manuscript. The references should be numbered consecutively in progressive order using Arabic numerals as they appear in the text. The reference list should be formatted according to the Vancouver style. All authors, up to six, must be listed. For seven or more authors, list the first six, followed by "et al." Type the reference list on a separate page at the end of the manuscript, using double spacing.

Numbered references to personal communications, unpublished data, or manuscripts either "in preparation" or "submitted for publication" should not be listed among the references. Papers accepted for publication should be referred to as "in press" and the letter of acceptance of the journal must be provided. Such material can be incorporated at the appropriate place in the text in accordance with the following examples: (AB Figueiredo: Personal Communication, 1980), (CD Dias, EF Oliveira: Unpublished Data). In-text citations should be indicated using the appropriate reference numbers as

superscripts to the corresponding word, separated by comma or hyphen, example, World^{1,2}, Life^{30,42,44-50}. The references at the end of the manuscript should follow the system used in ‘the uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals’ (for more information, please visit <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). The titles of journals referenced should be abbreviated according to the style used in the *Index Medicus* (for more information, please visit <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

Responsibility for the bibliographic citations in the text and reference list lies entirely with the authors.

Following are the sample references:

1. Articles from journals: Last names and initials of the six cited authors (For seven or more authors, list the first six, followed by “et al.”), full title of the article (in original language), abbreviated title of the journal (can be found at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), year of publication, volume number, the first and the last page numbers.

Example 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol*. 2005;62(1):112-6.

Example 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;50(1):44-51.

2. Book chapter: Cite last names and initials of all Authors of the chapter, Chapters’ full title, Editors, Title of book, edition, Place of Publication: Publisher, Year of publication, chapter pages.

Example: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health*. 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

3. Book: Last names and initials of the authors, Title of book, edition, Place of Publication: Publisher, Year of publication, Pagination.

Example: Carlson BM. *Human embryology and developmental biology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

4. Websites: Author/organization’s name. Title of the page [Internet]. Place of publication: Publisher’s name; Date or year of publication [updated yr month day; cited yr month day]. Available from: URL

Example: Diabetes Australia. *Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov 5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

5. Dissertation/PhD Theses: ***Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*** will not accept the citation of dissertations for a Master of Science, PhD theses, or similar material.

6. World Health Organization (WHO). *Chemotherapy of leprosy for control programmes*. Technical Report Series 675. Geneva: WHO; 1982. 36 p.

7. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. *Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de Situação: Mato Grosso do Sul*. 5ª edição. Brasília: MS; 2011. 39 p.

Illustrations: All illustrations should be submitted as separate files, and named using only the figure number (e.g., Figure 1, Figure 2). All figures should be numbered using Arabic numerals and cited consecutively in the text. Authors can upload colored, or black and white figures.

Titles and Legends: Titles and legends should be typed at the end of the manuscript with double

spacing.

Dimensions: The dimensions of the illustrations and figures should not exceed 18 cm width by 23 cm height. The correct specifications for each figure format are as follows:

- **Images/Photographs** must be submitted in high-resolution **TIFF** format. Verify that the photograph must have been taken at a minimum resolution of 600 dpi—preferably between 900 and 1200 dpi—and prepared using an image editing program (e.g., Adobe Photoshop, Corel Photo Paint).
- **Graphics** should be created using any statistical software and saved/exported using the original extensions (.xls, .xlsx, .wmf, .eps., or .pdf).
- **Maps** should be professionally vectorized (drawn) in high resolution using CorelDraw or Adobe Illustrator software.

Tables: Tables should be typed with single spacing, with a short descriptive title (positioned above the table), and submitted as separate files. Legends for each table should be placed below the table. All tables should be numbered using Arabic numerals and cited consecutively in the text. Tables should not have vertical lines, whereas, horizontal lines should be kept to a minimum. Tables should be a maximum of 18 cm wide by 23 cm high, using Arial, size 9 font.

Submission Process: All manuscripts should be submitted online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> in accordance with the instructions at the top of each screen. The peer review process is performed completely online.

On Resubmissions and Revisions: The journal differentiates between: a) manuscripts that have been rejected, and b) manuscripts that will undergo further consideration after requested changes have been made.

Resubmissions: If you have received a letter of rejection and wish the editors to reconsider their decision, you may resubmit your manuscript. In this case, your file will be considered a new submission and you will receive a new manuscript number.

Revision: If the peer reviewers recommend revising your manuscript, please send it for a second analysis and review, forwarding the revised manuscript with the same manuscript number as the original.

After Acceptance: Once a manuscript is accepted for publication, the publication process includes the following steps:

1. a) A copyright assignment form, provided by the journal's secretary and signed by the authors, must be returned to the journal.
2. b) Proofs will be sent to the corresponding author to be carefully checked for typesetting accuracy. Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage of the editing process. The corrected proofs should be returned to the journal as soon as possible after their receipt by the corresponding author.
3. c) Erratum requirements will only be accepted in case of confirmation of the fault on part of the technical staff of **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**.
4. d) Accepted articles will be available in a continuous publication modality online on SciELO database.

Page Charges: There will be no page charges for publication in this journal.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine does not provide any kind of translation service.

Workflow

SUBMISSION WORKFLOW OF REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE

All manuscripts to be considered for publication in *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* / **Society of Tropical Medicine** should be submitted in electronic form via (<http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>).

Journal's review policy (workflow):

- 1 – All manuscripts submitted for publication in the journal are initially evaluated by the journal's administrative staff to ensure they comply with the journal's rules.
- 2 – Manuscripts that meet the standards of the journal are evaluated by the Editor, Associate Editors, and the Editorial Board if they fit into the scope and editorial policy of the journal. Subsequently, the administrative staff sends the manuscript to the Editor-in-Chief.
- 3 – The Editor-in-Chief (or Associate/Section Editors) assigns the manuscript to the reviewers.
- 4 – Each submitted manuscript is sent to at least two reviewers in a double-blinded manner, and a double-blind generation of a reasoned report (peer-review system), which is used by the editors to decide whether to accept or reject. In case of difference of opinion among the reviewers, the manuscript is sent to a third reviewer to help reach a decision by the Editorial Board.
- 5 – Reviewer comments (free form review) are forwarded to the corresponding author to address the queries.
- 6 – The authors must respond to the queries, point by point, of each reviewer, highlighted with a different color. A revised version of the manuscript in accordance with the journal's guidelines. The revised version is sent back to the reviewers and a reasoned report on the manuscript.
- 7 – Reviewers' scores of the manuscript and the authors' responses are analyzed by the Editor, Associate Editors, and the Editorial Board.
- 8 – The Editor-in-Chief makes the final decision regarding acceptance or rejection of the manuscript for publication.
- 9 – The final editorial decision is sent to the authors.
- 10 – After this step, the editing process is initiated. The accepted manuscripts are sent for English editing.
- 11 – The English review results and edited document are sent to the authors for analysis. The authors must return the final edited version.
- 12 – Next, the layout process begins. The journal will communicate closely with the corresponding author regarding photographs, maps, illustrations, and the article's general format.
- 13 – Authors must disclose any conflicts of interest or financial support and must provide a signed copy of the manuscript.
- 14 – Proofs are sent to the corresponding author to be checked, along with all co-authors for typesetting.
- 15 – The final version of each manuscript will be available at http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issues&pid=0037-8682&lng=en&nrm=iso

APÊNDICES

APÊNDICE I – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Convidamos o(a) senhor(a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “MONTAGEM E VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG DE ZIKA VÍRUS”. Meu nome é Christiane Oliveira Lima Licínio e sou a pesquisadora responsável. Sou biomédica, inscrita no Conselho de Classe CRBM-3 sob número 1229. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, rubricue todas as páginas e assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pela pesquisadora responsável, via e-mail (chrislima28@hotmail.com) e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, acrescentando o número 9090 antes do seguinte contato telefônico: (62) 98404-4432. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Estadual de Goiás (CEP-UEG), localizado no Prédio da Administração Central, BR 153, Km 99, Anápolis/GO, CEP: 75.132-903, telefones: (62) 3328-1439 e (62) 98325-0342, funcionamento: 8h às 12h e 13h às 17h, de segunda a sexta-feira.

A pesquisa é sobre um novo teste laboratorial para detecção de anticorpos IgG para Zika Vírus, um teste realizado através do sangue que é capaz de dizer se o paciente teve ou não infecção por esse vírus. Com isso, sua participação será através da amostra de sangue, e iremos testar ela no produto em desenvolvimento, para sabermos se realmente funciona ou não. Você responderá um questionário sobre os sintomas que apresentou, quando esses sintomas apareceram, se foram feitos ou não exames laboratoriais enquanto você esteve doente e demais perguntas sobre sua saúde em geral. Além disso, serão coletados 10 mL de sangue, em ambiente ambulatorial. Essa coleta de sangue é a mesma realizada em laboratórios de análises clínicas, quando o médico solicita exames para avaliação da sua saúde. Serão realizados testes de Zika vírus, no produto em desenvolvimento, e de Dengue, com um método de triagem já comercializado.

Toda pesquisa apresenta tanto riscos como benefícios, porém os benefícios serão maiores que os riscos. Os benefícios da pesquisa são grandes, já que será possível fazer um diagnóstico rápido e barato de uma enfermidade que acomete muitas pessoas todos os anos, causando impactos na saúde de adultos e crianças. As principais preocupações quanto a essa doença são a microcefalia em recém nascidos e as disfunções neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. O diagnóstico não tem sido feito da forma correta, por falta de ensaios como este em desenvolvimento.

Na coleta podem acontecer algumas intercorrências, como por exemplo, a formação de edema no local da introdução da agulha, dor ou endurecimento do local, vermelhidão ou pequeno inchaço na pele. Todos esses riscos são minimizados pelo treinamento e capacitação do pessoal de coleta, que possuem larga experiência na execução desta tarefa. Caso haja algum aspecto anatômico que dificulte o acesso ao vaso sanguíneo, o responsável pela coleta irá avaliar e se considerar muito arriscado, você será dispensado da participação da pesquisa, sem nenhum prejuízo a você. Nos casos de dor ou inchaço, basta aplicar uma pequena porção de gelo (disponível no local da coleta) por no local, por 2 minutos. O edema é minimizado quando, após a coleta, o local da incisão é pressionado por 1 minuto. A possibilidade de transmissão de alguma doença é mínima, pois são utilizados materiais descartáveis para a coleta (seringas, tubos e agulhas) e o coletador usará máscara, jaleco, touca e luvas descartáveis. A quantidade de sangue a ser colhida não promove mal-estar ou efeitos adversos ao paciente. Caso haja algum desconforto de sua parte, tanto em revelar dados sobre sua saúde ou algum desconforto emocional para a coleta de sangue, você poderá desistir da sua participação, a qualquer momento. Alguma pergunta do questionário que lhe cause desconforto ou constrangimento pode ser deixada de responder, sem qualquer prejuízo.

Caso você queira desistir da participação, após lermos esse termo ou mesmo depois de consentir em sua participação, seja por quaisquer razões, tem o direito e liberdade de não participar ou de retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta de dados, sem nenhum prejuízo à sua pessoa. Seu material biológico será descartado, por meio de incineração. Caso necessário, terá acesso, a assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios devido a sua participação nesse estudo.

Você não terá nenhum custo e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. A pesquisadora responsável garante total sigilo das suas informações, sendo que seu nome não será divulgado de forma nenhuma. Os dados coletados serão divulgados, mas sem identificação de nenhum participante. Também é nossa inteira responsabilidade quaisquer danos ou riscos que esta pesquisa possa trazer a você, seja de aspecto físico ou psicológico. Os custos de locomoção dos participantes e acompanhantes ao local da pesquisa também serão ressarcidos pelos pesquisadores. Caso seja necessário o encaminhamento a pronto socorro, o custo será por conta da pesquisadora responsável.

É importante ressaltar que todas as etapas da pesquisa serão realizadas de forma individualizada. As amostras biológicas coletadas serão utilizadas apenas para as finalidades consentidas por você, ou seja, testes de Zika e Dengue. Ao final da pesquisa as mesmas serão incineradas, conforme as normas

para descarte biológico. Enquanto houver o uso das amostras, elas serão armazenadas sob congelamento entre -15°C a -20°C, no laboratório onde serão processadas.

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, Christiane Oliveira Lima Licínio, pesquisadora responsável por este estudo, esclareço que cumprirei as informações acima e que o participante terá acesso, se necessário, a assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios devido a sua participação nesse estudo e que suas informações serão tratadas com confidencialidade e sigilo. O participante poderá sair do estudo quando quiser, sem qualquer penalização. Se tiver algum custo por participar da pesquisa, será ressarcido; e em caso de dano decorrente do estudo, terá direito a indenização, conforme decisões judiciais que possam suceder.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÕES

Eu,, abaixo assinado, discuti com a pesquisadora Christiane Oliveira Lima Licínio sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros a mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de assistência, confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é voluntária e isenta de despesas e que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício.

Anápolis, ___ de _____ de _____

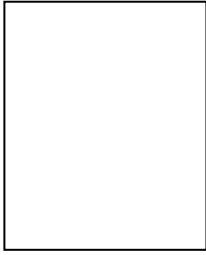
ASSINATURA DO PARTICIPANTE

DATA: ___/___/___

ASSINATURA DO PESQUISADOR

DATA: ___/___/___

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



Two horizontal lines extending to the right from the box, providing space for the witness's signature or stamp.

APÊNDICE II – Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE)

Convidamos você a participar como voluntário (a) da pesquisa “MONTAGEM E VALIDAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG DE ZIKA VÍRUS”. Meu nome é Christiane Oliveira Lima Licínio e sou a pesquisadora responsável. Sou biomédica, inscrita no Conselho de Classe CRBM-3 sob número 1229. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, rubriche todas as páginas e assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pela pesquisadora responsável, via e-mail (chrislima28@hotmail.com) e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, acrescentando o número 9090 antes do seguinte contato telefônico: (62) 98404-4432. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Estadual de Goiás (CEP-UEG), localizado no Prédio da Administração Central, BR 153, Km 99, Anápolis/GO, CEP: 75.132-903, telefones: (62) 3328-1439 e (62) 98325-0342, funcionamento: 8h às 12h e 13h às 17h, de segunda a sexta-feira.

A pesquisa é para sabermos se um exame de Zika se realmente funciona ou não. Você ou seu (s) responsável (is) responderão um questionário sobre o que você sentia enquanto estava doente, quando esses sintomas apareceram, se foram feitos ou não exames laboratoriais enquanto você esteve doente e demais perguntas sobre sua saúde em geral. Além disso, serão coletados 10 mL de sangue, em ambiente ambulatorial. Essa coleta de sangue é a mesma realizada em laboratórios de análises clínicas, quando o médico solicita exames para avaliação da sua saúde. Serão realizados testes de Zika vírus, no produto em desenvolvimento, e de Dengue, com um método de triagem já comercializado.

Toda pesquisa apresenta tanto riscos como benefícios, porém os benefícios serão maiores que os riscos. Os benefícios da pesquisa são grandes, já que será possível fazer um diagnóstico rápido e barato de uma enfermidade que acomete muitas pessoas todos os anos, causando impactos na saúde de adultos e crianças. As principais preocupações quanto a essa doença são a microcefalia em recém nascidos e as disfunções neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barrè. O diagnóstico não tem sido feito da forma correta, por falta de ensaios como este em desenvolvimento.

Na coleta podem acontecer algumas intercorrências, como por exemplo, a formação de edema no local da introdução da agulha, dor ou endurecimento do local, vermelhidão ou pequeno inchaço na

pele. A pessoa que vai coletar seu sangue possui experiência de muito tempo realizando esse procedimento, isso diminui a chance de ocorrer qualquer um desses fatores. Caso seja muito difícil coletar seu sangue, o responsável pela coleta irá avaliar e se considerar muito arriscado, você será dispensado da participação da pesquisa, sem nenhum prejuízo a você. Nos casos de dor ou inchaço, basta aplicar uma pequena porção de gelo (disponível no local da coleta) por no local, por 2 minutos. O edema é minimizado quando, após a coleta, o local da incisão é pressionado por 1 minuto. A possibilidade de transmissão de alguma doença é mínima, pois são utilizados materiais descartáveis para a coleta (seringas, tubos e agulhas) e o coletador usará máscara, jaleco, touca e luvas descartáveis. A quantidade de sangue a ser colhida não promove mal-estar ou efeitos adversos ao paciente. Caso haja algum desconforto de sua parte, tanto em revelar dados sobre sua saúde ou algum desconforto emocional para a coleta de sangue, você poderá desistir da sua participação, a qualquer momento. Alguma pergunta do questionário que lhe cause desconforto ou constrangimento pode ser deixada de responder, sem qualquer prejuízo.

Caso você queira desistir da participação, após lermos esse termo ou mesmo depois de consentir em sua participação, seja por quaisquer razões, tem o direito e liberdade de não participar ou de retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta de dados, sem nenhum prejuízo à sua pessoa. Seu material biológico será descartado, por meio de incineração. Caso necessário, terá acesso, a assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios devido a sua participação nesse estudo.

Você não terá nenhum custo e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. A pesquisadora responsável garante total sigilo das suas informações, sendo que seu nome não será divulgado de forma nenhuma. Os dados coletados serão divulgados, mas sem identificação de nenhum participante. Também é nossa inteira responsabilidade quaisquer danos ou riscos que esta pesquisa possa trazer a você, seja de aspecto físico ou psicológico. Os custos de locomoção dos participantes e acompanhantes ao local da pesquisa também serão ressarcidos pelos pesquisadores. Caso seja necessário o encaminhamento a pronto socorro, o custo será por conta da pesquisadora responsável.

É importante ressaltar que todas as etapas da pesquisa serão realizadas de forma individualizada. As amostras biológicas coletadas serão utilizadas apenas para as finalidades consentidas por você, ou seja, testes de Zika e Dengue. Ao final da pesquisa as mesmas serão incineradas, conforme as normas para descarte biológico. Enquanto houver o uso das amostras, elas serão armazenadas sob congelamento entre -15°C a -20°C, no laboratório onde serão processadas.

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, Christiane Oliveira Lima Licínio, pesquisadora responsável por este estudo, esclareço que cumprirei as informações acima e que o participante terá acesso, se necessário, a assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios devido a sua participação nesse estudo e que suas informações serão tratadas com confidencialidade e sigilo. O participante poderá sair do estudo quando quiser, sem qualquer penalização. Se tiver algum custo por participar da pesquisa, será ressarcido; e em caso de dano decorrente do estudo, terá direito a indenização, conforme decisões judiciais que possam suceder.

ASSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÕES

Eu,, abaixo assinado, discuti com a pesquisadora Christiane Oliveira Lima Licínio sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque quer minha amostra de snague. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa

Anápolis, ____ de _____ de _____

DATA: __/__/__

ASSINATURA DO MENOR

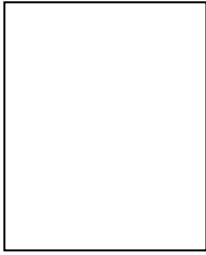
DATA: __/__/__

ASSINATURA DOS PAIS / RESPONSÁVEIS

DATA: __/__/__

ASSINATURA DO PESQUISADOR

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



APÊNDICE III – Questionário de Informações do Paciente

1. Identificação do Paciente				
Cadastro n°: _____ / _____	Sexo: <input type="checkbox"/> FEMININO <input type="checkbox"/> MASCULINO		Idade:	
Nome:				
Endereço:				
Cidade:	Estado:		CEP:	
CPF:	RG:			
Telefone/ Fax:				
E-mail:				
Local de abordagem do participante:				
2. Questionário Geral				
Fumante? Há quanto tempo?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Consome bebidas alcoólicas? Periodicidade	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Possui histórico familiar de doenças hepáticas?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Possui histórico familiar de diabetes?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Possui histórico familiar de dislipidemias?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Possui histórico familiar de doenças cardíacas?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Foi acometido por Dengue? Quando?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Foi acometido por Zika? Quando?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
Foi acometido por Chikungunya? Quando?	<input type="checkbox"/> (NA)	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	OBS. :
3. Questionário Específico				
Em caso positivo de acometimento de arboviroses, quais foram os sintomas apresentados?				
<input type="checkbox"/> Febre – Temperatura :	<input type="checkbox"/> Cefaléia			
<input type="checkbox"/> Prurido	<input type="checkbox"/> Mialgia			
<input type="checkbox"/> Tosse	<input type="checkbox"/> Artralgia – Quanto tempo :			
<input type="checkbox"/> Coriza	<input type="checkbox"/> Linfadenopatia			
<input type="checkbox"/> Hiperemia Conjuntival	<input type="checkbox"/> Vômitos			
<input type="checkbox"/> Dor retroorbital	<input type="checkbox"/> Outros			
Data do início dos sintomas	Duração dos sintomas			
Foram feitos testes laboratoriais após o aparecimento dos sintomas ?				
<input type="checkbox"/> Hemograma	Alterações encontradas : <input type="checkbox"/> Leucopenia <input type="checkbox"/> Plaquetopenia <input type="checkbox"/> Outras <input type="checkbox"/> NA			

<input type="checkbox"/> Teste para Dengue	Tipo de teste : <input type="checkbox"/> Teste rápido <input type="checkbox"/> Elisa <input type="checkbox"/> PCR (molecular) <input type="checkbox"/> NA	
<input type="checkbox"/> Teste para Zika	Tipo de teste : <input type="checkbox"/> Teste rápido <input type="checkbox"/> Elisa <input type="checkbox"/> PCR (molecular) <input type="checkbox"/> NA	
<input type="checkbox"/> Testes Hepáticos	Tipo de teste : <input type="checkbox"/> TGP <input type="checkbox"/> TGO <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> NA	
Resultados dos testes laboratoriais, caso o entrevistado possua :		
É morador ou trabalha em área com presença de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> ? Descreva a provável área em que possa ter havido a contaminação.		
Foi submetido a algum tipo de tratamento? Houve internação hospitalar? Por quanto tempo?		
Em quanto tempo houve o reestabelecimento?		
Houve alguma sequela?		
Informações adicionais:		
4. Responsável pelo preenchimento		
Nome:		
e-mail:	Telefone:	
Local e data:		
5. Conclusão do questionário (preenchimento pelo pesquisador responsável)		
<input type="checkbox"/> Aprovado plenamente		
<input type="checkbox"/> Aprovado com ressalvas (paciente será comunicado posteriormente)		
<input type="checkbox"/> Não atendeu aos requisitos necessários para a participação da pesquisa, até o momento da avaliação		
6. Considerações finais do pesquisador responsável		
7. Aprovação do Comitê:		
Data:	Assinatura:	