



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Maria Fernanda Silva Vieira

**ARBOVIROSES: O DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS
SOROLÓGICOS E SEUS DESAFIOS**

Rio de Janeiro

2021

Maria Fernanda Silva Vieira

**ARBOVIROSES: O DESENVOLVIMENTO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS
SOROLÓGICOS E SEUS DESAFIOS**

**Monografia apresentada à Escola Politécnica de Saúde
Joaquim Venâncio – Fundação Oswaldo Cruz
(EPSJV-Fiocruz) como requisito parcial para
aprovação no Curso Técnico De Nível Médio em
Saúde em Biotecnologia.**

Orientador(a): Dra. Carolina Lessa Aquino

**Rio de Janeiro
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Escola Politécnica Joaquim Venâncio (EPSJV- Fiocruz) pelo apoio institucional e pela oportunidade de realização da Monografia.

Agradeço à minha orientadora Carolina Lessa Aquino por aceitar o convite para conduzir o meu trabalho de pesquisa, em meio à pandemia, agradeço por todo esforço, dedicação, disponibilidade, incentivo e compreensão, que facilitou bastante o desenvolvimento do trabalho monográfico. Muito obrigada por ser um exemplo profissional a ser seguido.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe, Lilian da Conceição, minha irmã Amanda da Conceição e aos meus tios, Elizete Luiza e Cláudio Costa por todo o apoio e por acreditarem no meu potencial.

Agradeço aos meus amigos Júlio Moraes, Wallace Leonardo, Ana Clara Antunes e Gabriel Sant'Anna por juntos compartilharmos as nossas experiências, servindo de apoio mútuo nos momentos de difíceis.

Agradeço à minha amiga Joana Ferreira pela cumplicidade, carinho, apoio, incentivos e força para superar os desânimos.

Agradeço à minha amiga Júlia Freitas pelos 10 anos de amizade, por todas as palavras de coragem e por estar em todos os momentos, bons e ruins.

Agradeço imensamente à Deus pelo amor incondicional, cuidado e por me proporcionar saúde e sabedoria para nunca desistir.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para o meu projeto de pesquisa.

RESUMO

Há décadas, a (re)emergência de arboviroses tem se tornado uma ameaça à saúde pública do Brasil e do mundo. Sendo em sua maioria, arbovírus carreados pelo mosquito *Aedes Aegypti*. Atualmente, sabe-se que 150 arbovírus são nocivos aos seres humanos, no Brasil existem três arboviroses predominantes em várias regiões urbanas e rurais do país, sendo elas: a Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). Devido aos diversos surtos e epidemias de DENV, ZIKV e CHIKV que ocorreram no final do século XX e início do século XXI, as esferas de saúde pública enfrentaram constantes desafios na realização de diagnóstico para as arboviroses emergentes, tendo em vista que todas apresentam manifestações clínicas similares. E devido a existência de outro arbovírus além da Dengue e Zika do gênero dos *Flavivírus*, a Febre Amarela, o diagnóstico laboratorial destas arboviroses necessitam ser não apenas sensíveis, mas também específicos em consequência da possibilidade de reatividade cruzada entre eles. O presente trabalho teve como objetivo a análise qualitativa de revisões bibliográficas sobre as principais arboviroses que impactam na saúde pública do Brasil e do mundo, e o desenvolvimento de testes diagnósticos sorológicos, com foco nos desafios enfrentados pela academia científica. Obtendo-se como metodologia a análise qualitativa de trabalhos acadêmicos retirados das plataformas ARCA- Fiocruz, LILACS, Scielo, PubMed/MEDLINE, entre outras. Como resultado, entende-se que a complexidade dos arbovírus de mesma família e gênero, emergentes no Brasil, dificultam o desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico sorológico e que há grande variação nos valores de sensibilidade e especificidade dos testes atualmente disponíveis, em geral baixos. Espera-se que, com a utilização de novas metodologias e pesquisas, consiga-se elaborar testes sorológicos acessíveis e mais acurados, que possam minimizar a reatividade cruzada e favorecer o diagnóstico específico e sensível.

Palavras-Chaves: Arboviroses, Zika vírus, Dengue vírus, Chikungunya, Febre Amarela, Diagnóstico, Sorologia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Estrutura dos Flavivírus.....	14
Figura 02 – Ciclo de Transmissão do YFV: silvestre e urbano.....	19
Figura 03 – Estrutura Molecular do Vírus Chikungunya.....	24
Figura 04 – Esquema Funcional das técnicas de variação de ELISA.....	30
Figura 05 – Esquema Operacional do LFIA.....	32
Figura 06 – Representação Esquemática do Funcionamento do Teste de DPP.....	34
Figura 07 – Cinética dos Anticorpos IgM e IgG de Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela.....	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	06
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo Geral.....	11
1.1.2 Objetivo Específico.....	11
2. METODOLOGIA.....	12
3. DESENVOLVIMENTO.....	13
3.1 Primeiro Capítulo: Arbovirose.....	13
3.1.1 Flavivírus.....	13
3.1.2 Dengue.....	15
3.1.3 Febre Amarela.....	18
3.1.4 Zika.....	21
3.1.5 Chikungunya.....	23
3.2 Segundo Capítulo: Testes Sorológicos.....	27
3.2.1 ELISA.....	27
3.2.2 Teste Rápido (TR).....	30
3.2.3 Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT).....	35
3.2.4 Aspectos Importantes para Avaliação dos Testes Diagnósticos.....	36
3.3 Terceiro Capítulo: Testes Sorológicos para Arbovirose.....	39
4. CONCLUSÃO.....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças transmitidas por arbovírus (de *Arthropod-borne virus*), isto é, vírus transmitido por artrópodes hematófagos. No mundo, já se tem conhecimento de mais de 500 arbovírus, sendo 150 deles reconhecidos como nocivos ao ser humano (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; YOUNG, 2018). Acredita-se que este número seja apenas 1% do total de arbovírus existentes no mundo (YOUNG, 2018). Os principais arbovírus transmitidos pelos culicídeos que são patogênicos ao homem e aos animais pertencem a cinco famílias virais, sendo elas: *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014; YOUNG, 2018).

Compreende-se que o processo de globalização – e dentro dela, as mudanças climáticas, crescimento desordenado populacional urbano e a flexibilização do meio de transporte para migrações entre cidades e países – afeta diretamente a natureza, possibilitando o deslocamento de agentes patogênicos, favorecendo os vetores sinantrópicos e sua transmissibilidade ao homem. Pelo mesmo motivo, muitas arboviroses são mundialmente conhecidas por sua alta capacidade de dispersão e pelo seu longo percurso geográfico e epidêmico (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG, 2018; HALSTEAD, 2019).

A Chikungunya é um claro exemplo de arbovirose que apresentou tal dispersão mundial. É causada pelo vírus de mesmo nome (CHIKV), da família *Togaviridae*, pertencente ao gênero *Alphavirus*, que foi isolado pela primeira vez em 1953 no leste da África durante uma epidemia (LIMA-CAMARA, 2016; VIEIRA *et al.*, 2019). Durante essa epidemia, foi possível observar os sintomas da doença, como a febre alta, dores de cabeça e a artralgia severa (LIMA-CAMARA, 2016; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). O CHIKV reapareceu de forma alarmante durante o início do século XXI, chamando muita atenção dos estudiosos por iniciar surtos na Ilha Francesa de Réunion e logo depois atravessar o Oceano Índico em direção aos países asiáticos, onde deu origem a novos surtos. Em 2013, o CHIKV atingiu o hemisfério ocidental vindo da Ásia, resultando em mais de 1 milhão de casos reportados (YOUNG, 2018).

Conhecido por ter feito o mesmo percurso do CHIKV, porém silenciosamente pela Ásia, o vírus da Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 em um primata não humano (macaco

rhesus) na Uganda (LIMA-CAMARA, 2016; YOUNG, 2018). O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Em 2007, foi registrada a primeira epidemia de Zika em uma ilha na Micronésia, chamada Yap (LIMA-CAMARA, 2016). Em 2013-14 na Polinésia Francesa e em 2015-16 no Brasil, foram registrados surtos inesperados de ZIKV, que possibilitou as associações patológicas da doença, como a relação do aumento do número de nascidos com microcefalia e ZIKV e outras graves complicações neurológicas como a Síndrome de Guillain-Barré. Durante os dois anos de 2015-16, a epidemia do ZIKV esteve presente em 48 países da América com mais de duzentos mil casos suspeitos e sete mil confirmados, sendo o Brasil o país com o maior número de casos reportados (ESPINAL *et al.*, 2019).

Esta ampliada rota geográfica é possibilitada pelos vetores silvestres e urbanos, fundamentalmente pelos mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* relatado principalmente em áreas urbanas e o *Aedes albopictus*, em áreas silvestres. A espécie *Ae. albopictus* é conhecida por permanecer em áreas com vegetação e preferir criadouros afastados de residências urbanas, se mostrando resistente a climas não-tropicais (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG, 2018; ESPINAL *et al.*, 2019). Já o *Ae. aegypti* circula por áreas mais próximas aos humanos, nas residências urbanas e grandes cidades (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). O mosquito *Aedes aegypti* é mundialmente conhecido por ser carreador de mais por uma arboviroses potencialmente patogênica ao homem, a Dengue.

Do ponto de vista global, os arbovírus da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus* se apresentam como uma grande ameaça à saúde, dentro deste grupo estão os vírus do Oeste do Nilo (WNV), Encefalite Japonesa (JEV), Zika, Febre amarela (YFV), Dengue e seus 4 sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4), entre outros (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; SUKHRALIA *et al.*, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 390 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da Dengue por ano e 3,9 bilhões de pessoas estão à margem da infecção. Em 2019, no Brasil, foram informados 1.544.987 casos, tendo como taxa de incidência 735,2 por 100 mil habitantes (BRASIL, 2020). O DENV e ZIKV possuem ciclos de transmissão simples, envolvendo apenas um vetor e um hospedeiro (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG, 2018). A transmissão ocorre principalmente pelas zonas tropicais, porém ao longo das últimas décadas, vem se observando a inserção destas arboviroses em países da Europa e América do Norte devido às mudanças climáticas e a outros

fatores complexos, não havendo mais limitações ambientais, tornando-se uma ameaça global (YOUNG, 2018; HALSTEAD, 2019).

Nos países que sinalizam áreas endêmicas e epidêmicas de Zika, Dengue, Chikungunya, Febre Amarela, e outras arboviroses, há grande dificuldade na realização do diagnóstico diferencial, pois apenas com a análise clínica por parte do médico não é possível diferenciá-las, uma vez que todas apresentam os sintomas iniciais parecidos como por exemplo febre, dor de cabeça, náuseas e/ou vômitos, mialgia e artralgia. Para além da sintomatologia, é necessária a utilização de métodos diagnósticos laboratoriais para que haja a identificação do agente etiológico da doença e o correto manejo clínico do paciente (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; SAKKAS *et al.*, 2018; ESPINAL *et al.*, 2019).

O diagnóstico laboratorial das arboviroses implica na utilização de diversas técnicas, sendo elas: sorológicas, isolamento viral, moleculares, imunohistoquímicas, entre outras. O diagnóstico molecular é considerado padrão-ouro, ou seja, é o teste realizado para confirmar a veracidade do resultado positivo ou negativo de uma amostra. Acosta-Ampudia *et al* (2018) diz que os métodos moleculares tornaram-se valiosos não apenas para o diagnóstico do paciente, mas também para tipificar o vírus geneticamente e fornecer informações sobre a natureza do ciclo de transmissão viral e o padrão epidemiológico. A principal técnica molecular empregada no diagnóstico das arboviroses é a Transcrição Reversa seguida de PCR quantitativo (qRT-PCR), que busca detectar a presença de material genético viral em amostras de sangue, soro e/ou fragmentos de tecidos (óbitos), entre outros espécimes clínicos (BRASIL, 2019). Estes testes moleculares se destacam por possuírem alta sensibilidade e especificidade para identificar o agente, entretanto, há desvantagens como a necessidade de infraestrutura adequada, equipe experiente para minimizar os erros no processo e o alto custo dos equipamentos para realizar a análise das amostras (BOLLELA; SATO; FONSECA, 1999).

Os diagnósticos sorológicos, por sua vez, visam analisar, por meio de amostras de sangue, soro e/ou plasma, a presença das imunoglobulinas IgM e IgG contra um agente etiológico. Para a maioria das doenças infecciosas, os anticorpos IgM são característicos por indicar uma infecção recente e os anticorpos IgG são detectados após a soroconversão, podendo permanecer por meses, até anos no organismo (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; SUKHRALIA *et al.*, 2019). O Teste imunoenzimático (ELISA) se destaca por sua praticidade e alta sensibilidade, não sendo

necessária grande quantidade de antígeno para a detecção de IgM e IgG na amostra clínica. Entretanto, a especificidade do teste pode ser um fator crítico em áreas endêmicas para diferentes arbovírus, como *Alphavirus* e *Flavivirus* por exemplo, podendo ocorrer reação cruzada e, conseqüentemente, resultados falso-positivos (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; ESPINAL *et al.*, 2019; HALSTEAD, 2019). A reação cruzada ocorre devido às semelhanças genéticas e estruturais entre os arbovírus, principalmente de mesmo gênero (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018; SUKHRALIA *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos (testes rápidos) para arbovírus se destaca no diagnóstico clínico-laboratorial das arbovirose devido à praticidade, eficiência e rápida resposta. Simplificadamente, a técnica de imunocromatografia consiste na coleta de uma gota de sangue, soro ou plasma, normalmente retirada por punção no dedo, que migra por capilaridade pelo suporte imunocromatográfico, até alcançar o antígeno específico. Caso na amostra de sangue haja anticorpo contra o antígeno, a linha de captura se acenderá, indicando a reação antígeno-anticorpo (BRASIL, 2019). O desenvolvimento de testes rápidos para arbovirose visa a detecção do complexo antígeno-anticorpo, por IgM ou IgG, na amostra de sangue coletada, na hora, de um paciente suspeito de infecção por arbovírus, não sendo necessária grande infraestrutura. Esses tipos de testes *point-of-care* (POC) são práticos por não necessitarem de transporte de material biológico para o laboratório e não requererem materiais de alto custo, podendo ser facilmente aplicado nas Unidades Básicas de Saúde (UBS).

Outra técnica sorológica que se mostra muito eficiente e possui uma especificidade maior é o teste de neutralização por redução de placas (PRNT). Esta técnica consiste na análise da formação das placas de lise celular (plaques), sendo assim possível identificar se o paciente possui anticorpos neutralizantes ao vírus ou não. A formação de plaques indica que a amostra não possui anticorpos que impedem o vírus de infectar a célula e a sua não formação indica que houve a neutralização do vírus pelo anticorpo. Porém este teste diagnóstico é caro e necessita de instalações laboratoriais adequadas e pessoal altamente especializado. Por tratar-se de uma técnica que manuseia o vírus para infectar as células no PRNT é de suma importância seguir as normas de biossegurança para evitar infecções associadas ao laboratório (OMS, 2018). O trabalho com arbovírus requer laboratórios de nível de biossegurança NB2 ou NB3, como por exemplo a Dengue e a Febre Amarela respectivamente (WILSON; CHOSEWOOD, 2009).

Deste modo, as emergências e re-emergências das arboviroses no Brasil e no mundo vem sendo um grande risco para a Saúde Pública, visto que não há a padronização e eficácia efetiva de um teste diagnóstico econômico, de fácil manuseio e rápido capaz de reconhecer os arbovírus de áreas endêmicas em períodos de epidemias simultâneas, sem reação cruzada (LIMA-CAMARA, 2016). Para a sociedade brasileira, a necessidade de um teste diagnóstico é ainda mais relevante devido a (re) circulação de novas arboviroses. Vieira *et al.* (2015) registra a detecção de seis pacientes reagentes para o arbovírus Mayaro (MAYV) durante a epidemia de dengue em 2015, o que revela a existência de arboviroses negligenciadas no país e que possuem a sintomatologia similar aos demais arbovírus locais.

Visto que o Brasil é um país endêmico para diversas arboviroses e alvo de novos surtos de arbovírus negligenciados, a pesquisa proposta visa contribuir, através da revisão de literatura, para o entendimento dos desafios e progressos para o diagnóstico sorológico destas doenças que tornam-se crescentes na sociedade brasileira. Sendo imprescindível o estudo sobre os testes sorológicos que irão ajudar as unidades de saúde de forma econômica, acessível e prática, não limitando-se aos diagnósticos moleculares que, apesar de eficazes, são complexos e dispendiosos.

Logo, este estudo é importante pois ajudará a compreender a contextualização das arboviroses no Brasil de forma a analisar criticamente os diagnósticos sorológicos utilizados no país em regiões endêmicas e epidêmicas, esclarecendo os obstáculos enfrentados pela academia científica para o desenvolvimento de diagnósticos diferenciais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Esta monografia tem como objetivo geral contribuir para o conhecimento relacionado as arboviroses predominantes no mundo e o desenvolvimento dos testes diagnósticos sorológicos para arboviroses.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- 1) Reconhecer as arboviroses centrais no Brasil;
- 2) Expor os principais arbovírus predominantes no Brasil e no mundo, que causam doenças em humanos;
- 3) Compreender a importância do diagnóstico laboratorial no manejo das arboviroses, com destaque para sorologia;
- 4) Identificar os desafios que envolvem o desenvolvimento de ensaios sorológicos para os arbovírus;

2 METODOLOGIA

Esta pesquisa teve como metodologia a abordagem qualitativa de revisões bibliográficas de livros, artigos, revistas, monografias e outros textos científicos com as palavras-chave: “Arbovírus, Zika vírus, Dengue, Virus Chikungunya, Febre Amarela, diagnóstico, sorologia”. Para a revisão de literatura, foram utilizadas as fontes eletrônicas de dados como as plataformas: ARCA- Fiocruz, LILACS, Scielo, PubMed/MEDLINE, entre outras.

Para a construção da monografia, foi realizado um levantamento bibliográfico através de referências de trabalhos monográficos, dissertações, teses, boletins epidemiológicos, manuais de órgãos de referência para a área da saúde, artigos científicos, entre outros. Para a análise das referências produzidas não houve restrição temporal.

3. DESENVOLVIMENTO (CAPÍTULOS)

3.1 ARBOVIROSES

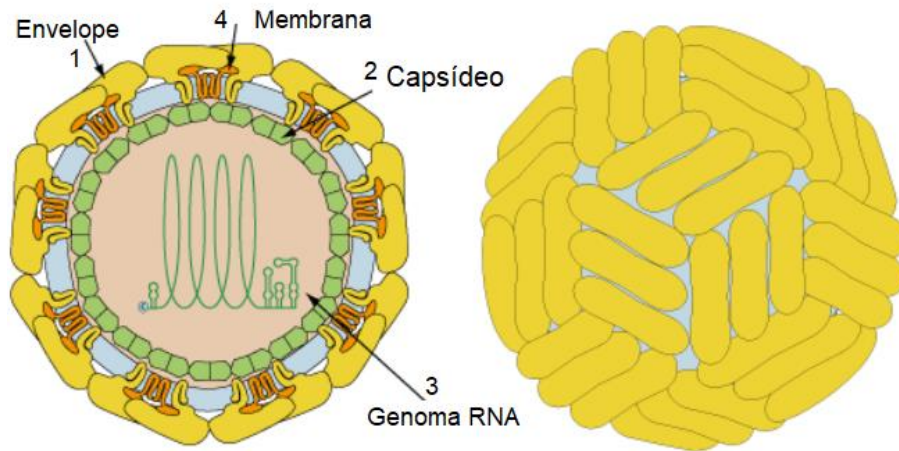
Há mais de duas décadas tem-se observado a emergência e reemergência de doenças virais transmitidas por vetores, sendo estas chamadas de arboviroses. Muitos desses vetores são reconhecidos por serem a causa do aumento de números de mortalidade e morbidade humanas. Entende-se que a maioria das arboviroses são doenças zoonóticas, ou seja, podem ser transmitidas entre os animais e os seres humanos. Os animais são hospedeiros de significativa importância para a transmissão e permanência da circulação do vírus na população, chamados de hospedeiros reservatórios. No ser humano, as doenças podem ocorrer de forma assintomática, sintomática ou como uma doença leve não-específica. Dentre os sintomas das arboviroses, a febre sistêmica é o sintoma mais relatado durante os casos epidêmicos e endêmicos, independentemente de qual seja o arbovírus infectante (HALSTEAD, 2019; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG, 2018).

Em 2014 a OMS reforçou a importância de estarmos atentos aos arbovírus e seus vetores com o slogan “Pequenas picadas, grandes ameaças”. No Brasil, as principais ameaças citadas pela OMS, que serão desenvolvidas a seguir, são os vírus da Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya (OMS, 2014)

3.1.1 FLAVIVÍRUS

Dentre os flavivírus patogênicos ao homem que serão abordados neste trabalho monográfico, estão o vírus da Dengue (DENV), o vírus da Febre Amarela (YFV) e o vírus Zika (ZIKV). Os flavivírus são arbovírus com uma pequena partícula viral de 40 a 60 nm de diâmetro, formado por um capsídeo proteico (C) de forma icosaédrica, envolto por um envelope lipídico onde estão localizadas as proteínas de membrana (M) e espículas virais (E). O genoma é formado pelo RNA genômico de fita simples de senso positivo, com aproximadamente 11 mil pares de bases (Figura 1) (BARBOSA, 1996; BARROS, 2007; HEINZ; STIASNY, 2012).

FIGURA 1 - Estrutura dos flavivírus.



Fonte: Adaptado de ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics

Legenda: À esquerda, a seta 1 está sinalizando a proteína de envelope, envolta por seus dímeros de proteína E; a seta 2 está sinalizando o capsídeo viral formado pela proteína C, em verde; a seta 3 sinaliza o genoma de RNA fita simples no interior da partícula viral; a seta 4 sinaliza a membrana, onde localiza-se as proteínas M. À direita, está representado em amarelo os dímeros de proteína E formando o envelope viral.

Além das proteínas estruturais C, M e E, os flavivírus possuem sete proteínas não estruturais (NS). Todas as proteínas virais são geradas a partir da codificação de uma poliproteína, por meio de uma única fase de leitura (ORF, do inglês Open Reading Frame), sendo as proteínas não estruturais: NS1, NS5, NS3 as maiores e altamente conservadas entre os flavivírus e as NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, proteínas pequenas e de baixa conservação (BARBOSA, 1996; SILVA, 2013; BARBOSA, 2018).

Codificadas na região terminal 5' da ORF, as proteínas estruturais de superfície M, C e E estão relacionadas à maturação extracelular do vírus. Considerada a maior proteína de superfície dos flavivírus, a proteína E possui 51 a 60 kDa e aproximadamente 501 aminoácidos na sua estrutura. Esta apresenta diversas funções, entre elas a montagem de vírus, fusão celular, atividade hemaglutinante e induz a produção de anticorpos neutralizantes, sendo um dos principais antígenos alvo no diagnóstico sorológico. Já a proteína de capsídeo (C) é pequena com o peso molecular de aproximadamente 14 kDa e 112 a 127 aminoácidos. O domínio hidrofóbico no carboxi-terminal da proteína C opera como sequência sinal na inserção da prM para dentro do retículo endoplasmático, onde ocorre o processo de clivagem proteolítica da proteína pré-matriz

precursora da proteína estrutural matriz (prM), que possui cerca de 22 kDa, resultando no produto da Matriz que contém 8 kDa e 75 aminoácidos. A proteína M está associada à maturação tardia do vírus, possibilita a infectividade completa do virion e acredita-se que o entrelaçamento das proteínas prM e E esteja relacionado com a proteção da proteína de envelope (E) no processo de maturação (BARBOSA, 1996; BARROS, 2007; SILVA, 2013;).

3.1.2 DENGUE

O DENV possui 4 sorotipos diferentes, denominados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (PAIXÃO, 2017). A classificação dos sorotipos se dá através das variações que ocorrem na proteína de envelope (E), de modo que os 4 sorotipos possuem similaridade de 60-70%. A proteína E possui 3 ectodomínios, sendo eles: EDI, EDII e EDIII. Esses domínios se diferem na imunogenicidade, o domínio EDIII induz a produção de anticorpos fortemente neutralizantes, específicos para cada sorotipo. Devido a semelhança estrutural dos domínios, o EDIII elicit anticorpos neutralizantes contra ao domínio EDI/II, em consequência disso, anticorpos não neutralizantes e anticorpos fracamente neutralizantes de reação cruzada são produzidos largamente (KHETARPAL; KHANNA, 2016). Atualmente já se sabe que uma pessoa infectada por um dos sorotipos adquire imunidade permanente contra o mesmo, não havendo a possibilidade de uma reinfecção homóloga, porém são aptos à infecção por sorotipos heterólogos. A diferenciação dos sorotipos requer diagnósticos sorológicos e moleculares (BARBOSA, 1966; GUBLER, 1998; KHETARPAL; KHANNA, 2016).

Embora a infecção por DENV possa ocorrer de forma assintomática, comumente em crianças, o indivíduo infectado pode apresentar sintomas de dengue clássica que posteriormente pode se agravar para a dengue hemorrágica e choque. As manifestações clínicas da dengue clássica são inicialmente febre alta, mialgia, cefaleia, vômito e dor atrás dos olhos. Evoluindo para a forma mais grave, a dengue hemorrágica apresenta sintomas como hemorragias pequenas na pele, sangramento nasal e gengival, dentre outros. Para o diagnóstico, é necessária a confirmação da diminuição do número de plaquetas no sangue e a redução da quantidade de sangue circulante (BARBOSA, 1996; GUBLER, 1998; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018).

A glicoproteína NS1 apresenta-se com grande importância na patogenia da Dengue, pois os anticorpos anti-NS1 atuam na destruição das células infectadas pelo sistema complemento (MARINHO, 2015). Esta, que dispõe 46 kDa, altamente conservada, é expressa tanto na região intracelular como na superfície extracelular das células infectadas pelo DENV (BARBOSA, 1996; SILVA, 2013). Juntamente com a NS5, forma o complexo de replicação do RNA viral e executam importantes papéis na interação das proteínas do hospedeiro para a replicação total do vírus. A proteína NS1 pode persistir no sangue do paciente por mais de 4-5 dias após o período de viremia (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Acredita-se que a ativação do sistema complemento ocorra devido a interação das proteínas NS1 de DENV com as proteínas reguladoras do sistema complemento, levando à produção do complexo C5b-9 que está associado aos casos de agravamento da doença (MARINHO, 2015). A proteína NS1 age impedindo a ação do sistema complemento a partir da sua interação com o fator H, resultando no aumento de produção de partículas virais (MARINHO, 2015). Esta também pode potencializar o seu efeito quando se fixa ao complemento.

Na resposta imune celular ao DENV, observa-se a presença de linfócitos T estimulados pelas proteínas NS1, E e NS5, que atuam destruindo as células infectadas (MARINHO, 2015). Na Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) observa-se uma resposta imune celular exacerbada. Alguns estudos visam entender o aumento da replicação viral em monócitos que levam a febre hemorrágica, outros estudam a hipótese da imunidade aumentada via fagócitos mononucleares infectados, estes que são células-alvo na infecção pelo vírus, e podem aumentar a gravidade da doença (BARBOSA, 1996; MARINHO, 2015). Sugere-se também que o extravasamento plasmático por disfunção endotelial ocorra devido a indução de citocinas e não por ação direta do vírus ao endotélio. O nível de elevação das citocinas, conhecido também como “tempestade de citocinas”, nesse processo está associado ao agravamento da doença (MARINHO, 2015).

Outra importante estratégia do sistema imune observada na infecção por DENV é a produção de anticorpos IgM e IgG que surgem posteriormente ao período de viremia. O anticorpo IgM é o primeiro a ser produzido pelo sistema imune após 5 dias do início dos sintomas, apresentando pico no período de 12-20 dias e podendo durar por mais de 30 dias (MULLER;

DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Há o registro de anticorpos da classe IgG após 10 dias desde o início dos sintomas, os anticorpos IgG persistem por período indeterminado em baixos títulos.

Epidemiologicamente, o vírus dengue apresenta um alto potencial de dispersão, tornando-se uma ameaça à saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. Dados da OMS (2019) relatam uma estimativa de que aproximadamente 96 milhões de pessoas manifestam clinicamente a doença por ano em mais de 90 países que possuem regiões de áreas endêmicas para o DENV. Com o vetor da Dengue, o *Aedes Aegypti*, circulando pelo mundo desde o século XVI foram relatados casos de doenças similares à dengue no litoral da América do Sul há mais de duzentos anos (HASTEALD, 2019). No ranking mundial de doenças transmitidas por vetores, o DENV encontra-se na segunda posição de doença com maior índice de morbidade e mortalidade, perdendo apenas para a malária (ESPINAL et al, 2019). Nas Américas, estudos registram que em 2010 ocorreram aproximadamente 53,8 milhões de infecções por DENV na América Latina e no Caribe. A Organização Panamericana de Saúde diz que o índice de Dengue foi de 220 casos por 100.000 habitantes em 2016 (OPAS, 2017).

No Brasil, há registros de casos de Dengue há mais de 3 séculos, os primeiros sorotipos isolados no país foram o DENV-1 e DENV-4 na região norte em 1982, posteriormente os sorotipos de DENV-2 e DENV-3 foram isolados na cidade do Rio de Janeiro, com ocorrências de epidemias que possibilitaram a dispersão do vírus para diversas regiões do país (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2021).

Devido a circulação de distintos sorotipos de Dengue em uma única região tornou-se de extrema preocupação de saúde pública o controle do vetor (mosquito) pois uma segunda infecção de DENV por sorotipos diferentes pode evoluir para a FHD (KHETARPAL; KHANNA, 2016; ESPINAL, 2019). No Brasil, a partir do século XX, o médico sanitarista Oswaldo Cruz iniciou o programa de eliminação do mosquito *Ae. aegypti*, conseguindo erradicá-lo na cidade do Rio de Janeiro em 1920 e posteriormente, na década de 50, o mosquito passou a ser considerado erradicado em todo o território nacional brasileiro. Esta ação impactou diretamente à transmissibilidade do DENV naquela época, visto que o vírus não permanece em circulação na sociedade sem a presença do mosquito vetor (INSTITUTO OSWALDO CRUZ, [s.d]). Entretanto, em 1960 deu-se a reversão desse quadro, com a reinserção do *Ae. aegypti* na

sociedade e o consequente reaparecimento de casos de dengue em 1981-82 no Brasil, chegando a 1.544.987 casos prováveis de dengue em 2019 (BRASIL, 2020).

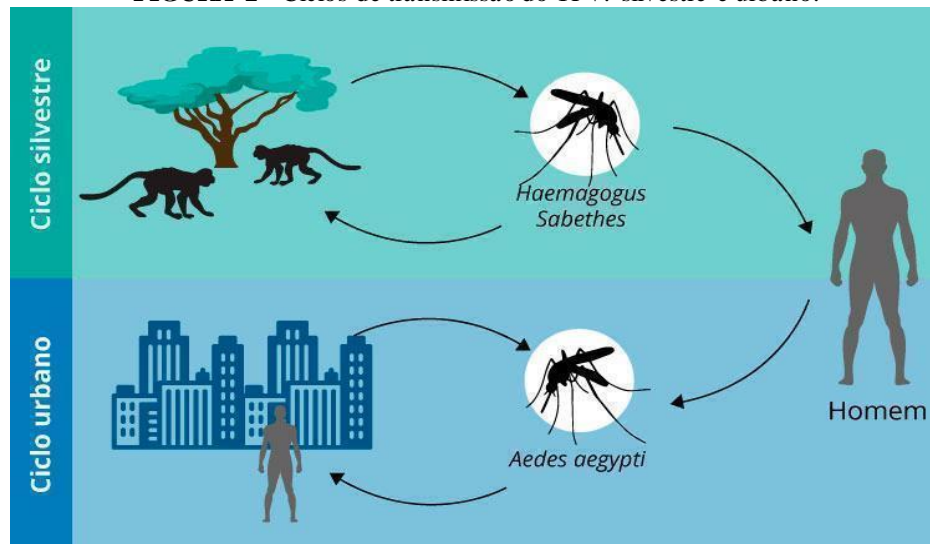
3.1.3 FEBRE AMARELA

Originário da África, o vírus da Febre Amarela (YFV) deixou diversos países do mundo em alerta devido ao seu alto índice de letalidade e morbidade humana (VASCONCELOS, 2003). Hoje a arbovirose ocorre em mais de 40 países, sendo 34 países no continente africano, 13 países na América do Sul e Central (BASTOS, 2018). Apesar de já existir uma vacina eficaz e segura para a profilaxia da Febre Amarela (FA), a doença tem sido a causa da morte de milhares de pessoas. Acredita-se que a primeira epidemia de FA no Brasil tenha ocorrido no final do século XV, afetando os povos indígenas e europeus, a partir dessas ocorrências a doença passou a ser constantemente caracterizada e estudada (FRANCO, 1969; BRITO et al., 2014).

O vírus da febre amarela é classificado como nível de biossegurança 3, ou seja, apresenta alto risco individual e baixo risco para sociedade (WILSON; CHOSEWOOD, 2009). Além de afetar os humanos, afeta também os primatas não humanos, estes que servem de sentinelas da arbovirose e possibilitam que seja realizado um mapeamento do vírus através do monitoramento da infecção de macacos durante possíveis surtos da doença (MONATH; VASCONCELOS, 2015; SILVA et al., 2020).

O YFV possui dois ciclos de transmissão, sendo eles: silvestre e urbano. Diferentemente do DENV, o YFV possui diversos vetores (mosquitos) de gêneros e espécies diferentes, o vetor primário da febre amarela silvestre é o mosquito do gênero *Haemagogus*, entretanto o gênero *Sabethes* também se destaca na transmissão do arbovírus em áreas silvestres (MONATH; VASCONCELOS, 2015; SILVA et al., 2020). O ciclo de transmissão silvestre ocorre quando o mosquito é infectado pelo arbovírus ao picar um primata-não humano ou humano que seja hospedeiro do vírus. Posteriormente o mosquito passa a ser carreador do vírus e começa o seu ciclo de transmissão infectando humanos não vacinados que estão em áreas silvestres. O ciclo de transmissão urbana ocorre quando o vírus é introduzido nas regiões urbanas, através dos humanos (GARDNER; RYMAN, 2010; MONATH; VASCONCELOS, 2015; SILVA et al., 2020). Adiante, o mosquito *Ae.aegypti*, que é predominante dessas regiões, é responsável por infectar os humanos e propagar a doença (Figura 2).

FIGURA 2 - Ciclos de transmissão do YFV: silvestre e urbano.



Fonte: antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao

Legenda: O vírus da Febre Amarela é transmitido entre os hospedeiros humanos e primatas não-humanos através do mosquito do gênero *Haemagogus sabethes* no ciclo silvestre, no qual os mosquitos da zona florestal transmitem o vírus para o macaco e posteriormente para os humanos que adentraram na área silvestre. E pelo mosquito doméstico *Aedes aegypti*, no ciclo urbano, que é responsável pela transmissão do vírus de humano para humano nos centros urbanos.

Em 1932 no estado do Espírito Santo foi confirmada a contaminação pelo YFV em ciclo silvestre e desde então diversos casos passaram a ser confirmados por todo o Brasil. Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) relatam que entre 1980 a meados de 2015 houve 792 casos de febre amarela silvestre, sendo 421 o número de mortos, assim dizendo, mais da metade dos casos foram à óbito (SILVA *et al.*, 2020). Nos últimos 4 anos (2016-2019), a epidemia inesperada da arbovirose nas Regiões Sudeste e Sul do país registrou mais de 10 mil primatas não-humanos afetados nas zonas urbanas, silvestres e rurais (SILVA *et al.*, 2020). No período da epidemia, 772 óbitos pela doença foram confirmados, demonstrando a alta de 2,8 vezes em relação às últimas três décadas e chamando a atenção das autoridades públicas de saúde para casos de FA além das regiões do Norte e Centro-Oeste do país, onde os surtos de FA sempre ocorreram, esporadicamente (SILVA *et al.*, 2020). Todos os casos foram confirmados como febre amarela silvestre, porém a recirculação do arbovírus em zonas urbanas possibilita a retomada do ciclo urbano com transmissão pelo mosquito do gênero *Aedes* através das pessoas não vacinadas, ou seja, suscetíveis ao YFV e que praticam atividades em zonas silvestres. Os primatas não humanos são os mais suscetíveis por não participarem do programa de vacinação contra FA,

dessa forma não usufruindo de nenhuma ação profilática para não serem infectados pelo vírus (SILVA *et al.*, 2020).

No Brasil, a última epidemia urbana de FA ocorreu no ano de 1929 no Rio de Janeiro e o último caso de Febre amarela urbana foi registrado em 1942 no estado do Acre. Desde então, com os programas de erradicação do mosquito *Ae. aegypti* na América do Sul não houve mais casos de Febre amarela urbana no país (COSTA *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde a Febre Amarela apresenta um alto potencial de risco para a saúde da população mundial e necessita de novas estratégias para a contenção da propagação do arbovírus, visto que a doença pode se agravar e levar à morte. Como todas as arboviroses já apresentadas, a Febre Amarela pode ser assintomática ou apresentar sintomas que são subdivididos em 3 formas clínicas: forma leve e moderada, forma grave e forma maligna. A forma leve e moderada é quando o indivíduo infectado apresenta dores de cabeça e febre, podendo haver evolução dos sintomas em 2 a 3 dias para forma moderada, que são os sintomas de mialgia, náusea, vômito, artralgia e astenia (VASCONCELOS, 2003; BRITO *et al.*, 2014). Geralmente os grupos mais afetados por essa forma são aqueles que já apresentaram uma infecção por *Flavivirus* e crianças com anticorpos maternos adquiridos (IgG). A forma grave tem a evolução dos sintomas no período de 3 a 5 dias, apresenta todos os sintomas de forma leve e moderada, com a adição dos sintomas de icterícia e hematêmese (coloração amarela da pele e/ou olhos e vômito com sangue, respectivamente) (VASCONCELOS, 2003; BRITO *et al.*, 2014). Comumente os grupos acometidos são turistas de áreas silvestres, agricultores, lenhadores, pescadores, entre outros. A forma maligna, que ocorre apenas de 5-10% dos casos, apresenta sintomas de febre alta, icterícia, dores abdominais, comprometimento de órgãos como rins e fígado, urina escura, podendo evoluir para morte (VASCONCELOS, 2003; BRITO *et al.*, 2014).

Na infecção pelo vírus amarelo, a viremia ocorre pelo período de 10 dias desde o início dos sintomas, a partir do sexto dia é possível detectar os anticorpos da classe IgM que indicam infecção aguda e persistem até o final da fase pós-virêmica (OPAS/OMS, 2018). Já os anticorpos IgG podem ser detectados a partir de uma semana depois do início dos sintomas.

Apesar de ser uma doença extremamente nociva ao ser humano, desde 1936 já se tem uma vacina eficaz disponível, que é uma vacina atenuada, produzida a partir da cepa 17D em ovos embrionados de galinha (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Desde seu desenvolvimento, mais de 500 milhões de pessoas foram vacinadas e aproximadamente 99%

apresentam proteção por pelo menos 10 anos contra o vírus (GARDNER; RYMAN, 2010; HEINZ; STIASNY, 2012; MONATH; VASCONCELOS, 2015). A vacina induz uma resposta imune, gerando um período virêmico curto que dura de 4 a 7 dias. O indivíduo vacinado produz IgM que podem ser detectados a partir do 5º dia. Em alguns casos, a detecção de IgM pode ser feita meses após a vacinação e em outros casos, até 4 anos depois (OPAS/OMS, 2018). As reações adversas associadas à vacina da Febre Amarela são incomuns, com taxa de incidência de 1,6 casos por 100 mil doses de vacinas (OPAS/OMS, 2018). A vacina da Febre Amarela mostrou-se um dos meios mais eficazes para a profilaxia da doença (trabalhada juntamente com a erradicação do vetor), visto que a vacina consegue induzir resposta imune duradoura ao indivíduo vacinado após a aplicação da dose única da vacina.

3.1.4 ZIKA

Apesar de ser um flavivírus, as informações sobre o vírus da Zika ainda são limitadas. Pesquisas moleculares mapearam o percurso do vírus de modo que se sabe que o vírus Zika é originário do Oeste da África e foi isolado pela primeira vez no sangue de um macaco sentinela da floresta Zika na Uganda em 1947. O primeiro caso em humano foi reportado em 1954 na Nigéria. Durante os anos foi observada a dispersão do vírus pela Ásia, América e ilhas da Oceania, conseqüentemente em 2007 teve-se uma grande epidemia de Zika Vírus na ilha Yap na Micronésia, posteriormente em 2013-14 na ilha da Polinésia Francesa, 2014 no Chile e 2015 no Brasil. Após os diversos surtos de ZIKV pelas Américas, a doença passou a ser considerada uma das maiores crises na saúde global, visto que foi associada a anomalias congênitas, como a microcefalia no feto e a Síndrome de Guillain-Barré. A Polinésia Francesa registrou aproximadamente 66% da população infectada pelo ZIKV e destes 66%, 42 pacientes obtiveram o diagnóstico de Síndrome de Guillain-Barré. No Brasil, estimava-se mais de 10 mil casos, sendo 3 mil diagnosticados com Síndrome Congênita associada à Zika (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; ESPINAL *et al.*, 2019) O ZIKV atingiu mais de 76 países até o ano de 2017, sendo 48 deles países das Américas. Foram notificados mais de 200 mil casos, sendo mais da metade no Brasil. Dentre os casos reportados, mais de 2 mil casos de bebês com síndrome congênita por infecção do ZIKV foram relatados. (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG, 2018; HALSTEAD, 2019; VIEIRA *et al.*, 2019).

O principal meio de transmissão do ZIKV é a picada do mosquito vetor *Ae.aegypti*, porém durante as epidemias de zika, estudos passaram a investigar a possibilidade da transmissão do vírus por transfusão de sangue após um caso relatado em um Hemocentro entre um doador-receptor. Acredita-se que essa via de transmissão seja de baixo risco. Outros estudos já confirmaram a transmissão do ZIKV por relações sexuais, visto que já foi detectado o vírus no sêmem, sangue, urina, saliva e dentre outros fluídos corporais. A transmissão intra-uterina alarmou a população durante os surtos de ZIKV associados à microcefalia, essa transmissão ocorre quando o ZIKV atravessa a placenta e infecta os tecidos responsáveis pelo desenvolvimento cerebral. Para a confirmação dessa via de transmissão, estudos observaram a presença do genoma viral no líquido amniótico de uma grávida cujo feto apresentou microcefalia. (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018; YOUNG,2018; HALSTEAD, 2019; VIEIRA et al., 2019).

No Brasil o Boletim Epidemiológico da Semana 01 a 52 de 2019 revela que mais de 10 mil casos prováveis foram notificados, com uma taxa de incidência de 5,1 casos por 100 mil habitantes. A região nordeste é a região que apresentou a maior taxa de incidência do país: 9,5 casos por 100 mil habitantes.

Pacientes infectados pelo ZIKV na sua maioria apresentam a doença de forma assintomática, porém os pacientes sintomáticos apresentam sintomas muito similares às infecções por Dengue e Chikungunya, o que torna ainda mais difícil o diagnóstico clínico da doença. Dentre as manifestações clínicas de Zika mais comuns estão as dores nas articulações, febre alta à moderada e conjuntivite. Outras manifestações clínicas menos frequentes são: edema, náusea e vômito, dores de cabeça, dores abdominais, icterícias, diarreia e constipação. O período de incubação do vírus ocorre no intervalo de 10 dias e os sintomas podem diminuir de forma gradativa depois de 3 à 7 dias. (PESSOA, 2017; BARBOSA, 2018)

Por ser uma infecção recém-chegada e com caráter emergencial na sociedade, são poucas as informações sobre a resposta imune induzida pelo ZIKV. Estudos observaram que na infecção por ZIKV há a secreção de interferons que atuam de maneira inibitória da replicação viral. Também foi observada a expressão de citocinas inflamatórias na infecção. Outros estudos realizados com camundongos relatam que camundongos deficientes de INFs estão suscetíveis a desenvolver uma doença neurológica e, com a resposta imune inata comprometida, o vírus é

capaz de infectar células de outros tecidos, como as células do tecido nervoso. (PESSOA, 2017)

A infecção por ZIKV induz também a produção de anticorpos IgM e IgG. Os anticorpos IgM representam a fase aguda da doença e são detectados a partir do 4º dia após o início dos sintomas, podendo persistir por 2 a 12 semanas (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). Os anticorpos da classe IgG podem ser detectados a partir do 8º dia após o início dos sintomas e podem persistir por meses após o término da infecção por ZIKV (WITTLIN, 2018).

3.1.5 CHIKUNGUNYA

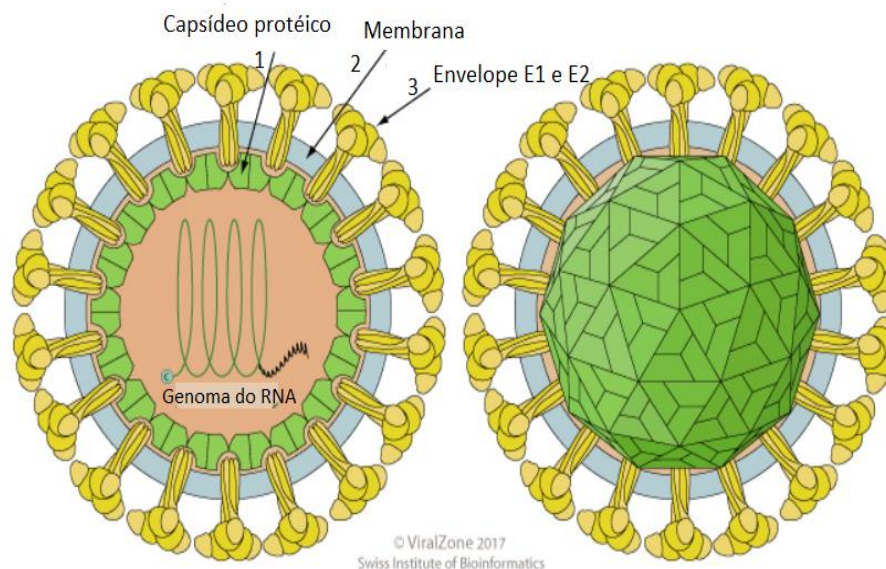
Isolado pela primeira vez em 1953, o vírus da Chikungunya chama atenção das autoridades de saúde pela sua alta capacidade de dispersão mundial. O nome Chikungunya origina-se da língua Kimakonde, idioma falado na Tanzânia, onde o vírus foi isolado pela primeira vez, e significa “aqueles que se dobram”, referindo-se à postura dos pacientes que apresentavam um dos sintomas mais recorrentes no quadro grave da infecção pelo CHIKV, as dores nas articulações. Acredita-se que o CHIKV tenha sido causador de diversos surtos epidemiológicos desde 1779, porém na época o vírus ainda era pouco conhecido e esses surtos provavelmente foram relatados como epidemias de Dengue. Após o isolamento feito em 1953 na Tanzânia, os surtos de CHIKV começaram a ser mais recorrentes, associando-se à doença. (HASTEALD, 2019)

A dispersão do vírus por diversos continentes foi possibilitada através dos mosquitos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (YOUNG, 2018). Durante a década de 60 até o início dos anos 2000 os casos associados ao CHIKV eram reportados predominantemente nos continentes africanos e asiático, porém durante o ano de 2004 foi identificado o vírus nas ilhas Comores no Oceano Índico, posteriormente em 2005-6 observou-se a expansão do CHIKV em 6 ilhas do Oceano Índico, seguidas por epidemias de Febre Chikungunya. Em 2007 registrou-se o surto de Febre Chikungunya na Itália, país considerado não-tropical, e na Índia que resultou em mais de 1 milhão de casos (YOUNG, 2018, HALSTEAD, 2019). Mais tarde, em 2013, o vírus foi reportado no Caribe e logo depois, em 2014, o CHIKV já havia atingido as Américas, resultando em mais de 1 milhão de casos em mais de 40 países do continente (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; ESPINAL et al., 2019). O primeiro caso autóctone no Brasil ocorreu no

segundo semestre de 2014 e, segundo o Ministério da Saúde, de janeiro a abril de 2015 mais de 3 mil casos foram notificados apenas nos estados do Amapá e Bahia naquele ano (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015).

Pertencente ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae*, o CHIKV possui, assim como os *Flavivirus*, uma pequena partícula viral que mede aproximadamente 70 nm de diâmetro e um capsídeo protéico de forma icosaédrica, envolto por um envelope lipídico onde localizam-se as glicoproteínas virais E1, E2 e E3. O genoma viral é composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 12 mil pares de base (Figura 3). (FERREIRA, 2018; WITTLIN, 2018)

Figura 3 - Estrutura molecular do vírus Chikungunya.



Fonte: Adaptado de ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Legenda: À esquerda, a seta 1 está sinalizando o capsídeo protéico, em verde; a seta 2 está sinalizando a membrana, em azul; e a seta 3 sinaliza os dímeros da proteína de Envelope (E1 e E2). À direita, está representado em amarelo os dímeros de proteína E formando o envelope viral, também está representado em verde a forma icosaédrica da proteína do capsídeo (C).

O genoma viral do CHIKV possui duas ORF. Uma das fases está majoritariamente localizada na extremidade 5' do fragmento de RNA e é responsável pela poliproteína que, ao ser

clivada, dá origem à 4 proteínas não estruturais chamadas de nsP1, nsP2, nsP3, nsP4. Já a ORF que está localizada na extremidade 3' é responsável pela poliproteína que dá origem às proteínas estruturais, sendo elas as proteínas do envelope (E1, E2, E3), a proteína do capsídeo (C) e a 6k. As proteínas do envelope possuem funções como: promover a ligação entre a célula do hospedeiro e a partícula viral; estabelecer a fusão da membrana ao envelope viral para que haja a liberação do nucleocapsídeo no citosol celular. Ainda não se sabe o papel da proteína E3. A proteína 6k possui diversas funções, uma delas é a capacidade de alterar a permeabilidade celular, esta é associada a montagem do vírus e atua como sequência sinal no direcionamento da proteína E1. (FERREIRA, 2018)

O CHIKV pode ser oriundo de quatro linhagens geneticamente diferentes, sendo elas: Oeste Africano, Asiático, Oceano Índico (IOL, *Indian Ocean lineage*), Leste-Centro-Sul-Africano (ECSA, *East-Central-South African*), algumas dessas linhagens apresentam mutações adaptativas nos genes das proteínas de envelope e foram associadas ao aumento da infectividade do CHIKV (AZEVEDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 2015; FERREIRA, 2018; WITTLIN, 2018).

Diferente das arboviroses apresentadas anteriormente neste capítulo, a Febre Chikungunya possui um percentual de pacientes sintomáticos mais recorrente, sendo estes maiores que 60% dos infectados pelo arbovírus. As manifestações clínicas são caracterizadas por febre alta, dor lombar, cefaleia, severa artralgia, mialgias. Alguns pacientes podem apresentar sintomas de erupções cutâneas, como exantema maculopapular e/ou eritematosos. São observados sintomas de náuseas e vômito, hiperpigmentação, diarreia, dor abdominal, fotossensibilidade, bolhas, entre outros. Embora a doença seja considerada uma doença aguda, os sintomas de artralgia severa podem persistir por anos na vida dos pacientes infectados pelo CHIKV, sendo necessário um longo acompanhamento terapêutico para melhora das dores. (CUNHA; TRINTA, 2017; FERREIRA, 2018)

O período de incubação do CHIKV é de 1 a 12 dias, porém a doença costuma se desenvolver em até 6 dias após a picada do vetor (CUNHA; TRINTA, 2017; FERREIRA, 2018; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018). A fase virêmica acontece até uma semana depois do início dos sintomas, posteriormente é possível a detecção de anticorpos IgM que podem aparecer nos primeiros dias da infecção e persistir, em casos crônicos da doença, por anos (CUNHA; TRINTA, 2017; FERREIRA, 2018). A produção de IgG ocorre a partir da segunda

semana da infecção, podendo ser detectada depois de meses e/ou anos da infecção (CUNHA; TRINTA, 2017; WITTLIN, 2018).

3.2 TESTES SOROLÓGICOS

Os testes sorológicos têm como objetivo a análise de amostras de sangue e/ou plasma para a detecção de anticorpos e/ou antígenos em diversas doenças. Tais testes são imprescindíveis por fornecerem informações para diagnóstico de pacientes com suspeita de diversas infecções, como HIV, Sífilis, Hepatites, Chagas, coronavírus, infecções por arbovírus, entre outras doenças. Para além do diagnóstico de doenças, os testes sorológicos também auxiliam no diagnóstico de gravidez. Classicamente, os testes sorológicos visam a interação antígeno-anticorpos e como exemplos de ensaios amplamente empregados no diagnóstico de doenças infecciosas, estão ELISA, PRNT, testes rápidos, inibição da hemaglutinação e imunofluorescência indireta.

A técnica de Inibição da Hemaglutinação (IH) visa analisar a capacidade do antígeno de ligar-se ao anticorpo, pois quando há essa reação, o agente etiológico torna-se incapaz de induzir hemaglutinação ao meio. Já a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) visa analisar a interação antígeno-anticorpo através da aplicação de anticorpos marcados com fluoresceína direcionados contra os anticorpos do paciente em amostras de soro e/ou plasma. A utilização de um microscópio de fluorescência permite a visualização do fluoróforo (BRASIL; KOALADESIGN, 2019).

Neste capítulo serão abordados os princípios e fundamentos dos testes sorológicos amplamente utilizados para o diagnóstico de arboviroses, que são as técnicas de ELISA, imunocromatografia de fluxo lateral (testes rápidos) e PRNT. Serão abordados, ainda, parâmetros importantes de avaliação em relação a acurácia, para que possam ser identificados corretamente os pacientes com a doença e possíveis reações cruzadas.

3.2.1 ELISA

Fundamentada na detecção da interação antígeno-anticorpo, com revelação através de reações enzimáticas, a técnica de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) surgiu durante duas pesquisas que ocorriam ao mesmo tempo na década de 70. A técnica deriva-se da modificação do método de radioimunoensaio, que foi utilizada pela primeira vez por Yalow e Berson na década de 60. Desde então, tornou-se um método indispensável em diferentes pesquisas laboratoriais e médicas, bem como para fins diagnósticos. (SAKAMOTO *et al.*, 2018).

imunoadsorção enzimática seja comumente usado para diagnóstico, a técnica de ELISA possui destaque em outras áreas de aplicação, como por exemplo na indústria de alimentos para detectar potenciais alergênicos, na química ambiental, indústria farmacêutica e pesquisas biomédicas (SOUZA; VARGAS; JUNQUEIRA, 1999; OTIENO *et al.*, 2013; PASHMFOROSH *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2019). Quando usada para diagnóstico sorológico, visa detectar anticorpos e/ou antígenos através de amostras de soro e tem como objetivo a análise quantitativa e/ou qualitativa dos antígenos e/ou anticorpos presentes na amostra. (AYDIN, 2015; TIGHE *et al.*, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]

A técnica tem como princípio a detecção da reação do complexo antígeno-anticorpo, realizada em placas de polipropileno de 96 poços (THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]). Para que seja possível a detecção dessas moléculas, é necessária a utilização de um anticorpo conjugado a uma enzima e seu respectivo substrato enzimático (SAKAMOTO *et al.*, 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]). As enzimas fosfatase alcalina, β -galactosidase, glicose oxidase e peroxidase são amplamente usadas. Quando utiliza-se fosfatase alcalina e p-nitrofenil fosfato como substrato, a coloração produzida será amarelada. No entanto, para uma detecção mais sensível, utilizam-se substratos quimioluminescentes e fluorogênicos, como por exemplo nitrofenil galactosídeo para β -galactosidase. Devido a reação colorimétrica quantitativa, a leitura é realizada em um leitor de placas, sendo necessário utilizar o comprimento de onda específico da reação empregada para a obtenção e análise dos resultados. (SAKAMOTO *et al.*, 2018)

Desde a primeira variação da técnica em 1971, o ELISA direto, outras variações foram sendo desenvolvidas ao longo dos anos e hoje estão disponíveis, sendo algumas delas: ELISA direto, ELISA competitivo, ELISA competitivo indireto, ELISA sanduíche, ELISPOT e In-cell ELISA. Para este trabalho monográfico, serão detalhados os tipos de ELISA direto, indireto, sanduíche e MAC ELISA, que atualmente são os métodos mais utilizados para o diagnóstico sorológico de arboviroses.

O método de ELISA direto foi simultaneamente desenvolvido com a técnica de ELISA em 1971 por Engvall e Perlmann e Van Weemen e Schuurs. A técnica consiste na imobilização de anticorpo ou antígeno na superfície da placa, ocorrendo posteriormente a incubação do antígeno ou anticorpo marcado com a enzima e a subsequente lavagem da placa de microtitulação para remoção dos anticorpos/antígenos não ligados. Por fim, é adicionado ao meio o substrato adequado ao sistema de revelação utilizado para que haja a produção de sinal. O método de

ELISA direto é pouco usado, porém tem aplicação frequente para coloração imuno-histoquímica de tecidos e células (SAKAMOTO et al., 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]). A principal vantagem do ELISA direto em relação às demais variações da técnica é ser simples e necessitar apenas de um anticorpo específico (AYDIN, 2015; SAKAMOTO et al., 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]).

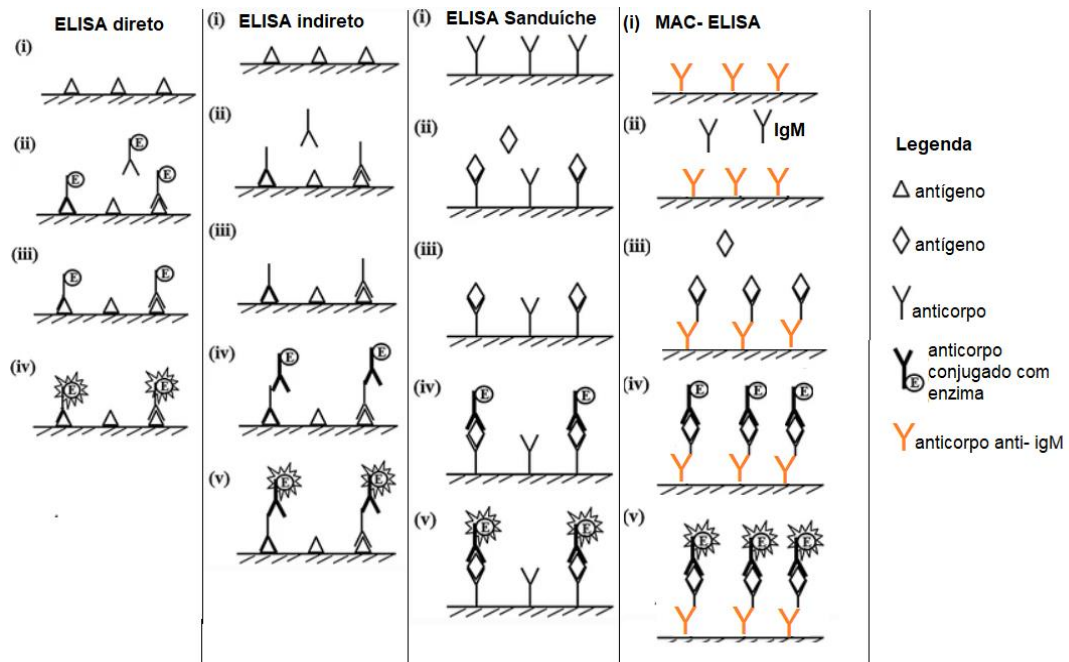
Inspirado no método de ELISA direto, a técnica de ELISA indireto foi desenvolvida em 1978 por Lindström e Wagner, que realizaram o método para medir IgG suíno em uma pesquisa. Esta técnica é utilizada para analisar a existência de anticorpos em anti-soro. O ELISA indireto possui essa nomenclatura pois é necessária a adição de um anticorpo secundário marcado com enzima para ligar-se ao anticorpo primário. A técnica consiste na imobilização do antígeno à superfície da placa de microtitulação, adição do anticorpo primário (que no diagnóstico sorológico é a amostra de soro estudada), seguida da lavagem da placa para eliminar os anticorpos não ligados. Uma segunda incubação é realizada adicionando o anticorpo secundário marcado com enzima para que seja possível a revelação/evidenciação, caso tenha sido formado, do complexo antígeno-anticorpo. Por fim é adicionado o substrato da enzima que irá produzir a coloração ao meio. Sendo assim, é possível determinar a concentração de anticorpos específicos para o antígeno na amostra investigada. (AYDIN, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]

Reportada como o método até cinco vezes mais sensível em relação às outras variações de ELISA, a técnica de ELISA Sanduíche foi desenvolvida em 1977 por Kato e colegas e é comumente utilizada para a detecção de antígenos específicos. A técnica consiste na adsorção do anticorpo de captura na superfície da placa; então, é incubada a amostra suspeita de conter o antígeno alvo ao meio e, em seguida, é realizada a lavagem da microplaca para retirar os antígenos não ligados ao anticorpo de captura. Posteriormente, é realizada a incubação com o anticorpo marcado com enzima e adicionado o substrato da enzima, gerando cor. (AYDIN, 2015; SAKAMOTO *et al.*, 2018; THERMO FISHER SCIENTIFIC, [s.d.]

Semelhante à técnica de ELISA sanduíche, o ELISA captura de IgM (MAC-ELISA) baseia-se na captura de anticorpos IgM presentes no soro do paciente. A técnica consiste na adsorção de anticorpos anti-IgM na microplaca; então é adicionado o soro do paciente suspeito de conter IgM e, em seguida, é realizada a lavagem da microplaca para retirar o excesso de soro e os

anticorpos não ligantes ao anticorpo de captura. Posteriormente é incubado o antígeno alvo à placa para que esse se ligue aos anticorpos IgM capturados. Lava-se a placa novamente para retirar os antígenos não ligantes, logo depois adiciona-se anticorpo específico para o antígeno e conjugado com uma enzima para que seja possível a evidenciação do complexo antígeno-anticorpo, caso tenha sido formado. A alteração colorimétrica é identificada por um leitor de ELISA. (CDC, 2018)

FIGURA 4 – Esquema funcional das técnicas de variação de ELISA



Fonte: Adaptado de SAKAMOTO (2018)

3.2.2 TESTES RÁPIDOS (TR)

Tendo em vista que a maioria dos testes laboratoriais convencionais para diagnóstico requerem tempo, elevada capacitação profissional e infraestrutura laboratorial, os testes rápidos chegaram para inovar de modo rápido e simples a maneira de realizar diagnósticos sorológicos. Na década de 80, o primeiro teste rápido foi desenvolvido e introduzido na sociedade, sendo este conhecido como teste de gravidez, que tem como metodologia a técnica de imunocromatografia de fluxo lateral (LFIA, do inglês *Lateral Flow Immunoassay*). Desde então, outras metodologias de teste rápido foram desenvolvidas e introduzidas para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (BRASIL, [s.d.]; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

Os testes rápidos em geral são feitos de maneira presencial e utiliza-se apenas uma pequena amostra de sangue coletada por punção digital ou venosa, swab nasal ou saliva. Os resultados levam em média de 5 a 30 minutos para serem interpretados. Alguns testes rápidos são reconhecidos como POC. Os testes POC são testes que visam tornar mais rápida e eficiente a realização de diagnósticos nas unidades de atenção primária em saúde, o que facilita o encaminhamento do paciente ao tratamento adequado (LINGERVELDER *et al.*, 2019).

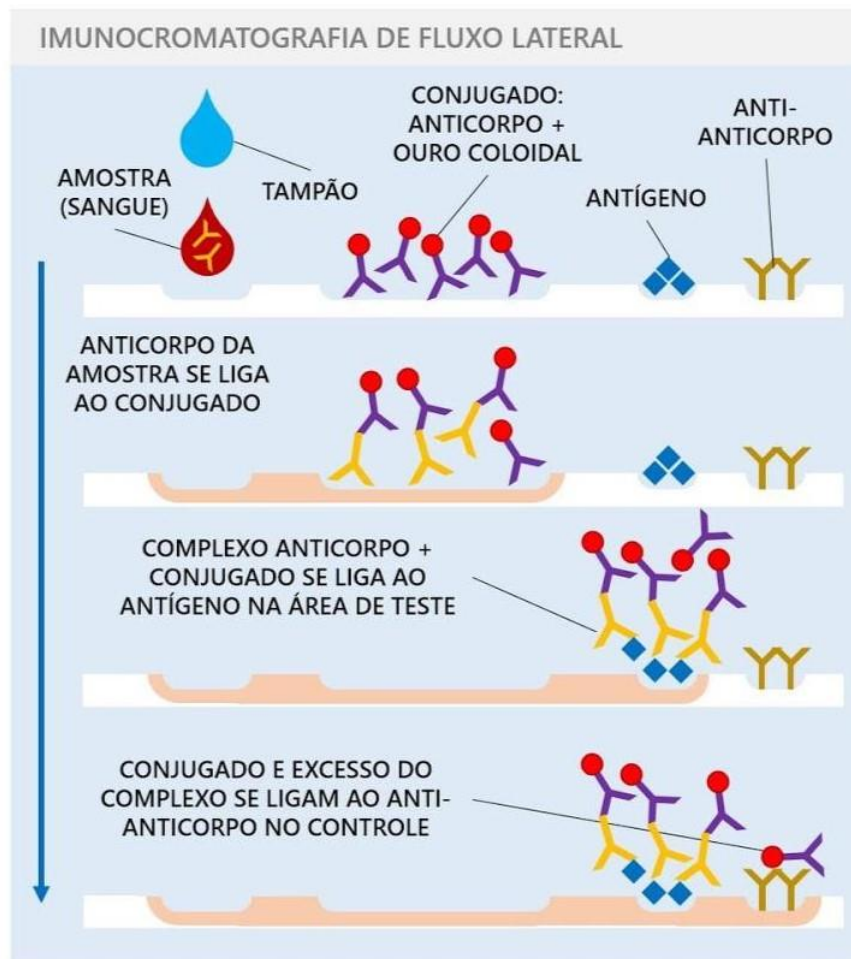
Atualmente os principais testes imunocromatográficos utilizados para diagnósticos são os de imunocromatografia de fluxo lateral e imunocromatografia de duplo percurso, utilizando apenas uma pequena amostra líquida (urina, sangue, suor, saliva, soro, plasma, entre outros) para sua realização. O princípio e funcionamento destes testes seguem detalhados a seguir, com foco na abordagem para diagnóstico sorológico que visam a detecção de anticorpos em amostras de soro.

Devido ao baixo custo de produção, os ensaios de fluxo lateral (LFIA) são amplamente usados em ambientes hospitalares, clínicas laboratoriais e consultórios médicos para a identificação de antígenos e anticorpos em amostras biológicas. As técnicas de LFIA são constituídas por uma plataforma que visa detectar, qualificar e/ou quantificar componentes alvos de uma amostra. A metodologia da técnica de imunocromatografia de fluxo lateral (representada pela Figura 4) consiste na aplicação de uma amostra líquida que irá migrar por capilaridade através de filtros e membranas que compõem o cartão de suporte (BRASIL, [s.d.]; KOCZULA; GALLOTTA, 2016).

A amostra com analito (que no diagnóstico sorológico é a amostra de soro do paciente) é aplicada no filtro absorvente com surfactantes e solução tampão; logo, a amostra migra para a região onde se encontra o anticorpo conjugado a nanopartículas de ouro coloidal/microesferas de látex. O conjugado é um anti-anticorpo específico para a detecção do isotipo de imunoglobulina que se deseja detectar (anti-IgG, anti-IgM, etc). A amostra, agora misturada ao conjugado, segue por capilaridade em direção à membrana de nitrocelulose, que contém a linha de teste, esta que é composta por antígeno e a linha de controle, que contém anticorpo anti-imunoglobulina. Por fim, a amostra segue para o filtro de absorção que, além de assegurar que a amostra irá continuar o percurso por ação capilar, também é responsável por absorver o acúmulo de reagentes, impedindo que haja refluxo líquido. É possível analisar a olho nu a intensidade das linhas teste e controle.

Para a interpretação do resultado, deve-se considerar que a linha controle sempre deverá acender para que haja a validação do teste e a linha teste, quando acesa, indica um resultado positivo (Figura 5). (BRASIL, [s.d.], [s.d.]; KOCZULA; GALLOTTA, 2016; URUSOV; ZHERDEV; DZANTIEV, 2019)

FIGURA 5 - Esquema operacional do LFIA

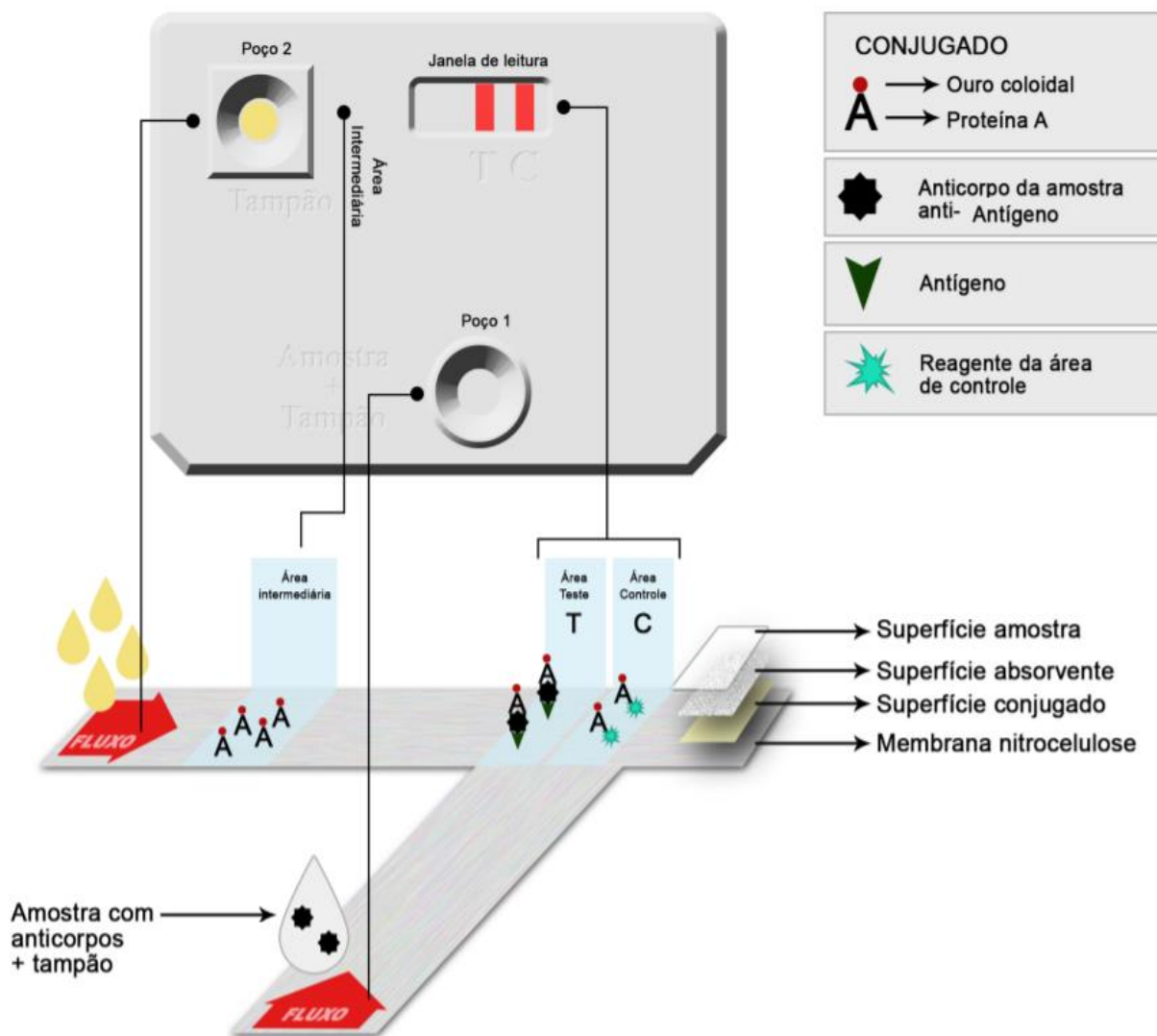


Fonte: <https://www.studocu.com/pt-br/document/universidade-de-santo-amaro/microbiologia-e-imunologia/anotacoes-de-aula/aula-imunologia-ii-curso-de-medicina/4316374/view>

Legenda: Representação esquemática do funcionamento do teste. Na parte esquerda superior da imagem, a amostra suspeita de conter anticorpos específicos para o antígeno + solução diluente são colocados no poço migrando para a área do conjugado (ouro coloidal-anticorpo). Ao meio, a amostra liga-se ao conjugado anticorpo-ouro coloidal migrando para a membrana de nitrocelulose composta por substâncias absorvidas. Na parte direita inferior da imagem, o complexo anticorpo-ouro coloidal-analito-anticorpo é formado na linha de teste revestida de anticorpos, indicando resultado positivo e o complexo anticorpo-ouro coloidal-anticorpo é formado na linha de controle, assegurando a validação do teste.

Já a técnica de imunocromatografia de plataforma de duplo percurso, do inglês *Dual Path Platform* (DPP), desenvolvida pela empresa norte-americana Chembio Diagnostics, é uma evolução da técnica de LFIA. Como mostra a figura 6, a grande área “T” é composta pela área intermediária (conjugado de proteína A-ouro coloidal), área de teste (revestida de antígeno), área de controle (reagente da área de controle) e dois poços, sendo o poço 1 destinado à aplicação de solução tampão e da amostra a ser testada com anticorpos específicos ao antígeno impregnado na membrana de nitrocelulose, já o poço 2 é destinado à aplicação apenas de uma solução tampão que irá fazer com que o conjugado da área intermediária migre para a área de teste. O cassete possui uma janela de leitura acima da área de teste para que seja possível a análise do resultado positivo ou negativo, indicado pela coloração das linhas de teste e controle. Na tecnologia DPP é possível que a leitura do resultado seja feita de forma eletrônica através de um equipamento denominado microleitor.

FIGURA 6 - Representação esquemática do funcionamento do teste DPP



Fonte: Adaptado de Manual de Diagnósticos de HIV – Bio-Manguinhos.

Legenda: Na parte superior da imagem observa-se o cassete que possui 3 partes, sendo elas: poço 1, poço 2 e janela de leitura. Na parte inferior da imagem observa-se a ilustração do funcionamento interno do teste e seus elementos. No poço 1 é adicionada a amostra, suspeita de conter anticorpos, e solução tampão que irão migrar até a área de teste e ligar-se ao antígeno da linha de teste. Então, aplica-se no poço 2 a solução tampão que fará o conjugado (proteína A-ouro coloidal) migrar para a área de teste formando o complexo proteína A-ouro coloidal-antígeno-anticorpo, indicando teste positivo. O conjugado continuará a migrar para a validação do teste na área de controle.

Após a aplicação da amostra e solução tampão no poço 1, a mistura irá migrar por capilaridade para a área de teste impregnada de antígeno, caso haja anticorpos específicos ao

antígeno, eles irão ligar-se, formando um complexo antígeno-anticorpo. Posteriormente, a solução tampão é aplicada no poço 2, possibilitando que o conjugado de proteína A-ouro coloidal migre para a área de teste e forme o complexo antígeno-anticorpo-conjugado. A reação deste complexo produzirá uma coloração rosa/roxa na linha de teste, indicando resultado positivo. O conjugado continua migrando pela membrana, passando pela área de controle produzindo o sinal rosa/roxo, indicando a validação do teste. (BRASIL, [s.d.], [s.d.]; Chembio Diagnostics, 2021)

A metodologia DPP garante o aumento da sensibilidade e especificidade do teste devido a separação do percurso de antígeno-anticorpo ao processo de revelação, como ocorre na técnica de ELISA. Para mais, a técnica permite que sejam desenvolvidos testes multiplex, ou seja, testes conhecidos pela possibilidade de diagnosticar mais de uma doença simultaneamente, como por exemplo o DPP para diagnóstico de HIV, que é capaz de diferenciar infecção por HIV-1 e HIV-2 (Chembio Diagnostics, 2021)

3.2.3 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS - PRNT

Considerada pela OMS como ensaio padrão ouro para analisar anticorpos neutralizantes, a técnica de PRNT para vírus foi descrita pela primeira vez na década de 50 e, posteriormente, adaptações da técnica para detecção de arbovírus e outros agentes infecciosos foram desenvolvidas. O ensaio de PRNT tem como princípio a análise da interação antígeno-anticorpo por meio da incubação de diluições seriadas da amostra de soro sob investigação com uma amostra do vírus viável, em concentração única padronizada. Para a análise e medição da infectividade viral, a mistura é semeada em células suscetíveis ao vírus, mantidas em cultura. As células são envoltas por um meio semissólido (e.g. agár) capaz de conter a propagação viral. O ensaio por ser conduzido em tubos de ensaio ou placas de microtitulação. (WHO, 2007)

Quando há a infectividade viral, são geradas placas de lise que podem ser contadas, podendo assim, determinar o percentual de redução da infectividade total viral, devido a neutralização do vírus pelos anticorpos presentes na amostra de soro. A técnica envolve dois controles, sendo um positivo e um negativo, o que permite comparar o número de plaques das diluições e fornecer um resultado quantitativo. Para o controle positivo é incubado patógeno e solução tampão em vez da amostra de soro e, portanto, deve haver formação de plaque. Para o controle negativo, as células são cultivadas na ausência de vírus, não infectadas, logo não deve

haver formação de plaque. Para a análise do resultado, é observada a presença ou ausência de placas de lise, cada placa formada indica que houve um foco de infecção do vírus à célula, caso contrário, sugere que houve formação do imunocomplexo antígeno-anticorpo, pois os anticorpos presentes na amostra neutralizaram o vírus e impediram a infecção celular. Por fim, é possível realizar a contagem e comparação do número de placas de lise para que seja determinado o percentual de redução na infectividade do patógeno e o título de anticorpos neutralizantes presentes na amostra de soro. (WHO, 2007; JARMAN *et al.*, 2009)

Apesar de considerada padrão ouro para o diagnóstico de muitas infecções virais, a técnica de PRNT pode levar de 7-10 dias para a obtenção dos resultados, além disso, necessita de capacitação profissional especializada, infraestrutura laboratorial e possui um alto custo, o que torna inviável em casos de vigilância em larga escala. (MADRID; PORTERFIELD, 1969; CRUZ, 2014; FEITOSA, 2015)

3.2.4 ASPECTOS IMPORTANTES PARA AVALIAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS.

Antes de se considerar a utilização de um teste diagnóstico, deve-se tomar conhecimento da acurácia do mesmo. A acurácia de um teste é aquela que diz respeito à capacidade do teste de discriminar entre os indivíduos que possuem a condição alvo e os que não possuem, sendo isto a capacidade de um teste de acertar os indivíduos portadores da doença e os não portadores. As medidas de precisão de diagnóstico auxiliam na quantificação da acurácia (SIMÕES, 2011). Para além da análise da acurácia, outros conceitos de precisão precisam ser analisados, como a reprodutibilidade e a repetitividade para a avaliação dos testes (SIMÕES, 2011; BRANDÃO, 2013; NOGUEIRA, 2019).

Comumente realizado por indústrias, os ensaios de reprodutibilidade e repetitividade (R&R) permitem a avaliação da capacidade de um teste de gerar resultados similares quando reproduzidos por diferentes operadores e instrumentos em relação a variabilidade de uma série de medições, realizados em lugares e tempos diferentes (SIMÕES, 2011; BRANDÃO, 2013; NOGUEIRA, 2019). Compreende-se que a reprodutibilidade diz respeito aos resultados obtidos com o mesmo método de ensaio e material idênticos, mas por laboratórios/ operadores diferentes

e usando equipamentos diferentes, sendo os testes executados com maiores intervalos de tempo entre uma realização e outra (SIMÕES, 2011). Já a repetitividade refere-se as variações nos resultados obtidos pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e os mesmos métodos com os mesmos materiais (SIMÕES, 2011; NOGUEIRA, 2019). Os resultados obtidos na reprodutibilidade e repetitividade são importantes para avaliar o desempenho dos testes diagnósticos quando manuseados em ambientes diferentes, ou até mesmo no mesmo ambiente várias vezes. Dito isto, é importante avaliar os R&R visto que os testes diagnósticos precisam ser capazes de apresentar bons resultados quando aplicados no cotidiano de diversos ambientes clínicos e laboratoriais e por diferentes profissionais.

Um teste diagnóstico pode fornecer 4 possíveis interpretações: a) verdadeiro-positivo (VP), resultado positivo em pacientes com a doença; b) falso-positivo (FP), resultado positivo em pacientes sem a doença; c) verdadeiro-negativo (VN), resultado negativo em pacientes sem a doença; e d) falso-negativo (FN), resultado negativo quando há a presença da doença. É de suma importância que os percentuais de sensibilidade (S) e especificidade (E), que representam respectivamente a probabilidade de um teste apresentar resultados positivos para indivíduos com a doença ($S = VP/VP+FN$) e apresentar resultados negativos para indivíduos sem a doença ($E = VN/VN+FP$), sejam analisados. Logo, a acurácia de um teste é definida a partir da proporção dos verdadeiros positivos e negativos ($A = VP+VN/VP+FN+VN+FP$). (KAWAMURA, 2002; SIMÕES, 2011; BORGES, 2016)

Entretanto, para a análise da prevalência, esta que indica a possibilidade de detectar resultados positivos antes de se obter o resultado do teste, é necessário realizar a proporção dos valores preditivos. Os valores preditivos (VP) são divididos em dois, sendo: valores preditivos positivos (VPP), que se relacionam a possibilidade de o indivíduo ter a doença, visto que testou positivo ($VPP = VP/VP+FP$) e valores preditivos negativos (VPN), relacionam-se a possibilidade do indivíduo de não ter a doença, visto que testou negativo ($VPN = VN/VN+FN$) (KAWAMURA, 2002; SIMÕES, 2011; BORGES, 2016). Os valores preditivos também possuem relevância por possuírem informações sobre a população a ser examinada (SOARES, 2011).

Os testes com alta sensibilidade e especificidade indicam a diminuição de falsos-negativos e falsos-positivos e são medidas próprias do teste. Contudo, a possibilidade de um teste apresentar sensibilidade e especificidade igual a 100% não existe, pois o aumento da sensibilidade resulta na queda da especificidade e vice-versa. A escolha para desenvolver um

teste mais específico ou sensível irá depender do objetivo e do impacto do seu uso na prática. Como por exemplo, quando há intenção de diagnosticar uma doença, tende-se como melhor teste aquele com alta especificidade pois terá mais impacto no valor preditivo positivo. Ou seja, em caso de resultado positivo é pouco provável que a pessoa não esteja, de fato, doente (SOARES, 2011) ou quando há intenção de descartar o diagnóstico de uma doença, entende-se que o melhor teste deve ter alta sensibilidade pois terá mais impacto no valor preditivo negativo. Ou seja, em caso de resultado negativo é pouco provável que a pessoa esteja, de fato, doente (SOARES, 2011).

3.3 TESTES SOROLÓGICOS PARA ARBOVIROSES

Atualmente para o diagnóstico de Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela estão disponíveis diversas técnicas, sendo as mais comuns: imunofluorescência indireta, isolamento viral, ELISA, ensaios imunocromatográficos do tipo teste rápido, inibição da hemaglutinação, testes moleculares, entre outros.

O isolamento viral durante muitos anos foi considerado padrão ouro para diagnóstico de infecções virais, porém com o desenvolvimento de novas abordagens que apresentam mais praticidade, a utilização da técnica de isolamento viral tornou-se menos comum, tendo também como causa a existência de vírus que não são capazes de serem isolados. (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). O desenvolvimento de técnicas moleculares foi crucial para a detecção dos arbovírus aqui citados, devido a sua alta sensibilidade e especificidade e, ainda hoje, torna-se indispensável para o diagnóstico diferencial de algumas arboviroses (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Dentre os testes moleculares mais utilizados para o diagnóstico de Dengue, Zika, Chikungunya e Febre amarela estão as técnicas de PCR e RT-PCR. Entretanto essas técnicas apresentam grande desvantagem em relação às técnicas sorológicas, devido ao alto custo, difícil padronização, necessidade de alta capacitação profissional e infraestrutura laboratorial, tornando-se inviável a aplicação rotineira em países subdesenvolvidos com re-emergência e emergência de arboviroses.

Como visto anteriormente, os testes sorológicos (em sua maioria) apresentam destaque para o diagnóstico de arboviroses em razão da praticidade, baixo custo, sensibilidade e especificidade consideráveis. Destacam-se os NS1 Ag ELISA, IgG/IgM ELISA, LFIA, DPP, MAC-ELISA e PRNT para o diagnóstico de Dengue, Zika, Chikungunya e febre amarela. Entretanto, cada teste deverá ser empregado em períodos específicos, de acordo com a especificidade de cada doença (Quadro 1). (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; OPAS/OMS, 2018; MUNOZ-JORDAN, 2017; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Visto que a maior parte das arboviroses aqui apresentadas são causadas por Flavivírus, com exceção do CHIKV, o principal desafio dos testes sorológicos já desenvolvidos e em

desenvolvimento está em garantir alta especificidade devido às similaridades estruturais desse gênero de arbovírus.

QUADRO 1 –TESTES SOROLOGICOS EMPREGADOS PARA ZIKA, DENGUE, CHIKUNGUNYA E FEBRE AMARELA

<i>Vírus,</i>	<i>Tipo De Teste</i>	<i>Procedimento De Coleta</i>	<i>Molécula Detectada</i>
<i>Dengue</i>	<i>ELISA</i>	<i>Amostra única: >1º dia início dos sintomas até 8 º dia</i>	<i>NS1</i>
	<i>ELISA</i>	<i>Amostra única: Após 5º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgM</i>
	<i>ELISA</i>	<i>Amostra única: Após o 8º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgG</i>
	<i>MAC-ELISA</i>	<i>Amostra única: 7º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgM</i>
	<i>TR</i>	<i>Amostra única: até 8º dia do início dos sintomas</i>	<i>NS1</i>
	<i>TR</i>	<i>Amostra única: Após 5º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgM/IgG</i>
	<i>TR</i>	<i>Amostra única: início dos sintomas</i>	<i>NS1, IgM e IgG</i>
<i>Zika</i>	<i>ELISA</i>	<i>1º Amostra: Após 5º dia do início dos sintomas 2º Amostra: 3 a 4 semanas depois da 1º coleta</i>	<i>IgM/IgG</i> <i>IgM</i>
	<i>MAC-ELISA</i>	<i>1º Amostra: Após 5º dia do início dos sintomas 2º Amostra: 3 a 4 semanas depois da 1º coleta</i>	<i>IgM</i>
	<i>TR</i>	<i>Amostra única: Após 8º dias do início dos sintomas</i>	<i>IgM/IgG</i>
<i>Zika, Dengue</i>	<i>TR</i>	<i>Amostra única: Após 8e dia do início dos sintomas</i>	<i>NS1/IgM</i>
<i>Zika, Dengue e Chikungunya</i>	<i>Imunofluorescência indireta</i>	<i>Não informado</i>	<i>IgM/IgG</i>
<i>Chikungunya</i>	<i>ELISA</i>	<i>Amostra única: Após 5º dia do início dos sintomas até 15º dia</i>	<i>IgM</i>
	<i>ELISA</i>	<i>Amostra única: Após 14º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgG</i>
	<i>TR</i>	<i>Amostra única: Após 5º do início dos sintomas</i>	<i>IgM/IgG</i>
<i>Febre Amarela</i>	<i>MAC-ELISA</i>	<i>1º Amostra: Após 5º dia do início dos sintomas 2º Amostra: 2 a 3 semanas depois da 1º coleta Amostra única: Após 5º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgG</i>
	<i>PRNT</i>	<i>1º Amostra: Após 5º dia do início dos sintomas 2º Amostra: 2 a 3 semanas depois da 1º coleta Amostra única: Após 5º dia do início dos sintomas</i>	<i>IgM/IgG</i>

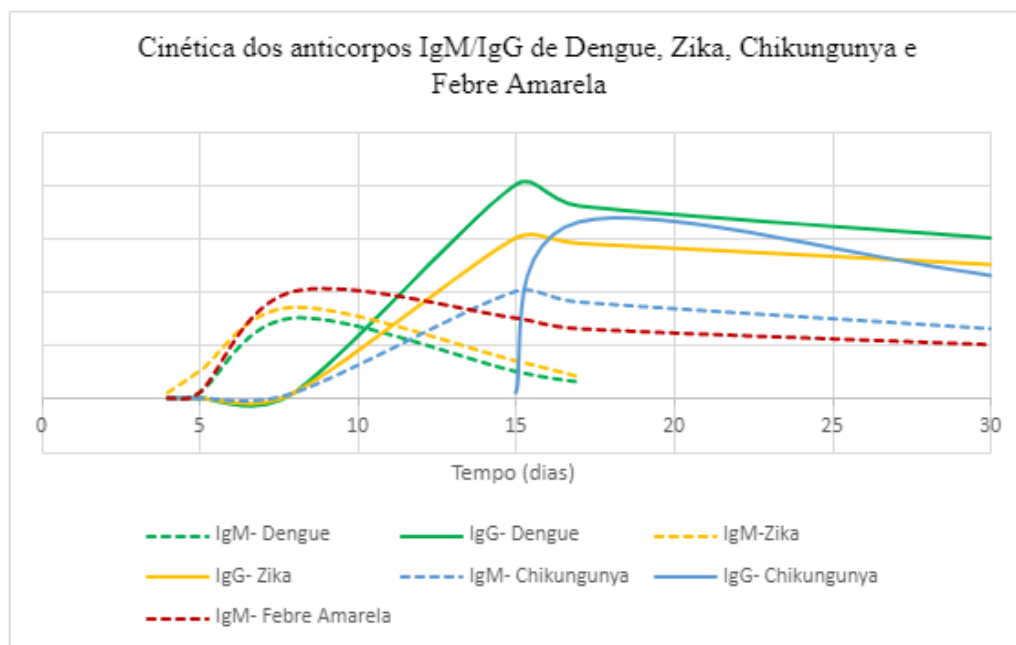
Fonte: Compilação do autor

Para o diagnóstico de dengue, destaca-se o uso do NS1 Ag ELISA, baseando-se no formato de sanduíche (SOUZA, 2012; LIMA, 2014). A proteína NS1 é secretada em grandes quantidades por células infectadas e pode ser detectada na corrente sanguínea de indivíduos infectados a partir do início dos sintomas, permanecendo até 9 dias ou mais (KHETARPAL;

KHANNA, 2016; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Testes Rápidos também são utilizados para detecção de NS1 (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Estudos que realizaram meta análise para a avaliação da acurácia de diferentes testes sorológicos disponíveis para dengue (NS1 Ag ELISA, ELISA IgM e testes imunocromatográficos NS1) apontaram que a sensibilidade dos testes de NS1 Ag ELISA foi de 32% e especificidade de 97% a 100%, enquanto os testes rápidos para detecção de NS1 apresentaram variações de 25% a 54% de sensibilidade e 78% de especificidade (SOUZA, 2012; CRUZ, 2014).

Por muitos anos a técnica de IH foi aplicada para a detecção de DENV, porém esta técnica demanda tempo para confirmação de diagnóstico e necessita de amostras de soro pareadas, além de apresentar baixa especificidade por alta reação cruzada em áreas endêmicas para flavivírus (CRUZ, 2014; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Por outro lado, a técnica IgM e IgG ELISA tornou-se rotineira para diagnóstico de dengue, tendo em vista que em uma infecção primária por DENV os títulos de IgM são altos durante a fase aguda da doença podendo permanecer até meses depois da infecção (Figura 7) (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). A captura de IgG em uma infecção primária pode ser feita posteriormente à fase aguda. Os títulos de IgG são encontrados em baixas concentrações em infecções primárias, no entanto, em infecções secundárias por DENV os títulos de IgG atingem picos a partir de 3 dias após o início dos sintomas e podem ser detectados pela técnica de IgG ELISA (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). As técnicas de IgM ELISA apresentam aproximadamente 30% de sensibilidade e especificidade de 55% a 85% em fase aguda, entretanto na fase convalescente os testes de IgM apresentam aumento da sensibilidade para 72,9% a 97,9% (SOUZA, 2012; CRUZ, 2014).

FIGURA 7 - Cinética dos anticorpos IgM e IgG de Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela.



Fonte: Compilação do autor

Legenda: Na figura estão representados pelo eixo x, o número de dias após o início dos sintomas e, no eixo y, os níveis de anticorpos IgM ou IgG.

O protocolo de manejo clínico do Ministério da Saúde para pacientes com dengue recomenda o uso de testes sorológicos para detecção de IgM e NS1 por ELISA ou TR para confirmação de diagnóstico por DENV (BRASIL, 2016).

Com os avanços tecnológicos, o desenvolvimento de TR para DENV foi possibilitado e atualmente existem TR multiplex capazes de detectar NS1, IgM e IgG simultaneamente (SD Bioline Dengue Duo) que apresentam sensibilidade de 91% e especificidade de 96% (KERKHOF et al., 2019; MATA et al., 2020). Visto que os testes de DPP demonstram-se mais sensíveis e específicos, os TRs são usados para a detecção de IgG e IgM específicos para DENV juntamente com o teste sorológico de ELISA IgM/IgG para diminuir as chances de falso-positivo.

Compreende-se que o diagnóstico sorológico de ZIKV seja desafiador por tratar-se de um recente flavivirus emergente e ainda não se tem uma técnica padrão ouro para o diagnóstico dessa arbovirose. O diagnóstico confirmatório de ZIKV atualmente é feito pela técnica de RT-PCR, porém o uso desta técnica em amostras de soro é limitado, pois o RNA viral só é detectado em

até 5 a 7 dias após o início dos sintomas. Entretanto, estudos relatam que a utilização de amostras de urina pode prolongar o período de detecção para 14 dias (MUNOZ-JODAN, 2017; BARBOSA, 2018; WITTLIN, 2018). Nesse contexto, o diagnóstico sorológico para ZIKV torna-se essencial pois é capaz de detectar anticorpos IgM e IgG em período pós virêmico (a partir de 8 dias), sendo aplicado também como diagnóstico complementar de um possível RT-PCR negativo (MUNOZ-JODAN, 2017).

Os testes sorológicos disponíveis para ZIKV até o presente momento baseiam-se nas técnicas de ELISA IgM, ELISA IgG, MAC-ELISA, TR IgM/IgG (LFIA/DPP) e PRNT (MUNOZ-JORDAN, 2017; WITTLIN, 2018). Para pacientes suspeitos de exposição prévia ao ZIKV recomenda-se o uso emergencial do teste MAC-ELISA aprovado pela FDA (do inglês *Food & Drug Administration*), todavia os testes de IgM demonstram-se mais sensíveis em casos sintomáticos após fase virêmica, uma vez que os títulos de IgM apresentam pico no oitavo dia, como pode ser visualizado na Figura 7. Em áreas de co-circulação de diferentes flavivirus, o resultado positivo do MAC-ELISA apenas indica infecção recente por flavivirus, necessitando do diagnóstico confirmatório por PRNT para descartar a hipótese de reação cruzada (MUNOZ-JORDAN, 2017; KERKHOF et al., 2019).

Portilho e colaboradores (2020) avaliaram a acurácia do MAC-ELISA desenvolvido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC/EUA). A pesquisa apresentou resultados de 100% de especificidade e 12,5% de sensibilidade para amostras coletadas no período virêmico (até 4 dias após o início dos sintomas) e 75% para amostras coletadas no período de 5 a 9 dias após o início dos sintomas. Na fase de convalescença, os resultados foram de 91%, 100% e 0% de sensibilidade para amostras coletadas em intervalos crescente de dias, entre 12 e 102 dias, 258 e 260 dias, 722 e 727 dias, respectivamente e 93,2% de especificidade. Já outro estudo compilou dados de sete artigos, para análise da acurácia de kits comerciais de diagnóstico sorológico de ZIKV, dos quais quatro eram sobre ELISA IgM, IgG, IgM/IgG. “A sensibilidade dos kits ELISA variou de 23,7% a 88,2% para IgG; 20,7% a 58,8% para IgM; 39,5% a 100,0% para IgM/IgG. A especificidade foi de 95,2% a 100,0% para IgG; 95,7% a 100,0% para IgM; 92,5% a 99,8% para IgM/IgG” (MARTINS, 2018). Tomando esses estudos como base, observa-se que apesar de apresentar uma baixa sensibilidade em amostra coletadas no período virêmico da infecção, a técnica MAC-ELISA possui um desempenho relevante para amostras coletadas após a viremia e

convalescentes. Já os kits comerciais de ELISA apresentaram pouca compatibilidade nos resultados, para além disso, a taxa de 58,8% de sensibilidade para ELISA IgM foi obtida após a fase virêmica, apresentando baixa sensibilidade quando comparada ao MAC-ELISA.

Em áreas endêmicas para mais de um flavivírus, como no Brasil (particularmente DENV e ZIKV), a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para detecção de IgM e IgG tornam-se comprometidas, podendo os testes apresentar reação cruzada devido à similaridade da proteína E, principal alvo dos anticorpos de indivíduos infectados. A proteína E de ZIKV difere apenas em 41-46% ao complexo sorológico de dengue (DEJNIRATTISAI, 2016). Já a proteína E de Febre Amarela apresenta identidade de 39% a 43% com os 4 sorotipos de DENV (RODRIGUES, 2010).

Estudos realizados para analisar a reatividade cruzada em amostras de soro coletadas de pacientes em fase aguda e convalescente destacaram um grande potencial de reação cruzada em infecções por DENV ou ZIKV. Felix *et al* (2017) analisaram a performance de três kits comerciais de ELISA IgG/IgM. A pesquisa incluiu 122 amostras de soros de 61 pacientes positivos para ZIKV por qRT-PCR e não confirmados para DENV de Araraquara, São Paulo. Todos os soros de pacientes com infecção em fase aguda de ZIKV apresentaram reatividade cruzada nos ELISA anti-dengue, incluindo soroconversão IgM-IgG para dengue. Outro estudo de coorte foi elaborado por Dejnirattisai *et al* (2016) com finalidade de observar a infecção de dengue em crianças no nordeste da Tailândia. Nesse estudo, todas as 18 amostras foram obtidas entre 2002 e 2004, época na qual não havia relatos de zika na região. Os sorotipos das amostras foram classificados pela técnica RT-PCR. Todas as amostras indicaram positividade para ZIKV nos testes de ELISA de captura de IgG e IgM. Priyamvada *et al.* (2016) testou 14 amostras de pacientes infectados por dengue em Bangkok, Tailândia. Ambas as amostras de soro em fase aguda e convalescente apresentaram altos títulos de ligação ao lisado de ZIKV. Todas as 14 amostras testadas em IgG ELISA para o lisado de ZIKV obtiveram resultado positivo. Esses estudos são, portanto, exemplos do difícil manejo do diagnóstico diferencial entre ZIKV e DENV.

Em consequência de toda a problemática já apresentada em relação à reatividade cruzada nos ensaios sorológicos, o diagnóstico laboratorial de Febre Amarela prioriza o uso da técnica molecular de RT-PCR, porém, assim como na infecção por ZIKV, um resultado negativo

não descarta a possibilidade de um falso-negativo, desta forma, o uso de testes sorológicos é realizado de forma confirmatória.

O protocolo de manejo clínico para FA recomenda o uso de técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos em casos suspeitos que apresentam exposição prévia em áreas em surto de FA e/ou regiões rurais e silvestres, e que apresentam quadro febril agudo. Considera-se suspeito todo caso com MAC-ELISA IgM positivo (BRASIL, 2018). Para a correta interpretação do diagnóstico sorológico de FA deve-se levar em consideração se o paciente é vacinado ou foi vacinado recentemente (< 30 dias), pois os títulos de anticorpos IgM de um indivíduo recém-vacinado podem ser detectados a partir do quinto dia e atingir picos duas semanas depois. Em casos de resultados positivos para IgM ELISA deve-se realizar o diagnóstico diferencial por IgM, abrangendo outras doenças infecciosas, sendo elas: dengue, hepatites virais, malária, febre tifóide, entre outros. Leva-se em consideração, ainda, o perfil epidemiológico da região. O resultado negativo para outras infecções indica caso provável de FA. Já um resultado positivo pode indicar infecção por outro flavivírus, devendo-se realizar o teste PRNT para confirmação. Para resultados negativos do IgM ELISA realizados em amostras coletadas até 7 dias após o início dos sintomas, o resultado é considerado inconclusivo, sendo necessário testar uma segunda amostra coletada com pelo menos uma semana de diferença. Para amostras coletadas após 8 dias após o início dos sintomas pode-se excluir hipótese de FA. (OPAS, 2018).

Os testes sorológicos também oferecem informações importantes sobre a resposta imune do paciente infectado por CHIKV. Após o oitavo dia do início dos sintomas é possível detectar anticorpos IgM e a partir do 15º dia detecta-se IgG (Figura 7). Para o diagnóstico sorológico de CHIKV, utiliza-se majoritariamente a técnica de ELISA IgM/IgG e Testes rápidos (WITTLIN, 2018; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Comercialmente estão disponíveis diversos kits de ELISA, porém um recente estudo da Avaliação Externa de Qualidade (AEQ), que analisou o desempenho de mais de 50 laboratórios para diagnóstico molecular e sorológico de CHIKV, observou que os *in-house* ELISA desenvolvidos pelos laboratórios para detecção de IgM e IgG apresentam maior sensibilidade em relação aos kits comerciais de ELISA IgM e IgG, tendo em vista que a técnica *in-house* ELISA é utilizada para identificar anticorpos contra o antígeno viral completo e na técnica de ELISA comercial utilizam-se proteínas recombinantes (JACOBSEN; 2016; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Vale ressaltar, porém, que

ensaios comerciais de imunofluorescência apresentaram uma melhor sensibilidade em relação à técnica de ELISA em amostras de soro positiva para IgM e IgG em diluições seriadas (JACOBSEN, 2016).

KIKUTI et al (2020) realizou uma avaliação da acurácia de dois kits comerciais ELISA IgM (Inbios International, Inc., Seattle, EUA; e Euroimmun, Luebeck, Alemanha) para o CHIKV utilizados em áreas endêmicas de dengue, zika e chikungunya. A coleta das amostras foi realizada em pacientes com doença febril aguda no período de 1 a 7 dias após o início dos sintomas (fase aguda) e no período de 19 a 38 dias após o início dos sintomas (fase convalescente). Os kits comerciais foram executados em amostras positivas e negativas para os três arbovírus CHIKV, DENV, ZIKV, todas confirmadas por RT-PCR. As amostras pareadas de fase aguda e convalescente do kit Inbios demonstraram sensibilidade de 4% e 92,4%, respectivamente, enquanto o kit da Euroimmun apresentou sensibilidade de 10,3% em fase aguda e 96,9% para fase convalescente. Já a especificidade do kit Inbios foi de 97,7% em fase aguda e 90,5% em fase convalescente, o kit Euroimmun apresentou uma menor especificidade, sendo 88,5% em fase aguda e 83,9% na fase convalescente.

Com isto, o melhoramento das técnicas de ELISA tradicionais vem sendo alvo de muitos grupos de pesquisa. NATRAJAN e colegas (2019, p.6) relatam que a utilização de peptídeos antigênicos da proteína E2, uso das proteínas E1 ou E2 e/ou uso de anticorpos monoclonais recombinantes anti-E2 demonstraram maior especificidade comparado ao uso do vírus inteiro como antígeno. A técnica de ELISA para o bloqueio de proteínas E2 não apresentou reações cruzadas significativas contra outros Alphavirus e identificou anticorpos que geram proteção cruzada com diferentes linhagens de CHIKV.

Entretanto, é importante ressaltar que em áreas onde há a co-circulação de outros arbovírus do complexo Floresta de Semliki (Mayaro), existe grande possibilidade de reação cruzada nos testes comerciais já disponíveis para CHIKV, havendo a necessidade da aplicação de testes confirmatórios, como o PRNT já citado anteriormente (CUNHA; TRINTA, 2017; FERREIRA, 2018). Prat *et al*, 2014 avaliou a acurácia de 4 testes sorológicos aprovados pela Comissão Europeia, sendo dois TR CHIKV IgM e dois ELISAs para detecção de IgM e IgG. Para a análise dos TR, 23 amostras além de amostras infectadas por MYV e vírus o'nyong-nyong, ambos alfavírus, foram utilizadas. Os testes rápidos SD Biotec e CTK Biotech apresentaram

baixa sensibilidade, de 20% e 30% respectivamente e especificidade de 73% e 93% respectivamente. Os testes ELISA IgM/IgG das empresas Euroimmun e IBL International mostraram sensibilidade > 70%. “Os ELISAs de ambas as empresas detectaram o vírus o'nyong-nyong IgM e IgG. [..]. Essa reatividade cruzada destaca o fato de que a soroneutralização é necessária para diferenciar os vírus do mesmo sorogrupo.” (PRAT et al., 2014). Os testes da IBL International e Euroimmun obtiveram especificidade de 88% IgM/96% IgG e 82% IgM /95% IgG, respectivamente.

Por fim, com a (re) emergência de arboviroses no mundo, novas tecnologias para diagnóstico sorológico estão sendo desenvolvidas, levando em consideração os critérios de REASSURED (do inglês *real-time connectivity, ease of specimen collection, affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid, equipment-free, delivered*). As novas tecnologias em desenvolvimento visam a descoberta de melhores biomarcadores proteicos para a produção de testes diagnósticos multiplex, capazes de detectar mais de uma arbovirose simultaneamente, como por exemplo o teste rápido já disponível DPP-ZDC, que é capaz de detectar simultaneamente IgG/IgM de Dengue, Zika e Chikungunya. Acredita-se que os testes multiplex irão ajudar a reduzir o tempo de diagnóstico em regiões endêmicas para diferentes arbovírus do mesmo gênero em comparação aos testes já comercializados. Atualmente o mapeamento de epítomos de células B, que tem por objetivo identificar pequenas proteínas reconhecidas por anticorpos específicos, é uma estratégia cada vez mais utilizada. Entretanto, os desafios para o desenvolvimento de novos testes sorológicos, ainda são muitos: a baixa especificidade, dificuldade de automação, padronização, validação do teste, validação dos biomarcadores e controle de qualidade (calibração e quantificação). (TIGHE et al., 2015; KERKHOF et al., 2019)

4. CONCLUSÃO

Em consequência da contínua expansão de novos arbovírus (re)emergentes pelo mundo, o número de pessoas infectadas cresce expressivamente. Atualmente o Brasil apresenta diversas regiões endêmicas para arboviroses pertencentes ao gênero *Flavivirus*, o que é uma questão importante para saúde pública tendo em vista a dificuldade no manejo clínico dos pacientes. A obtenção de diagnósticos sorológicos conclusivos é fundamental, principalmente para os arbovírus da Dengue e Zika, visto que há grande reatividade cruzada. Isso reforça a importância do desenvolvimento de novas tecnologias capazes de garantir melhor especificidade e sensibilidade aos testes sorológicos. Hoje, o enfrentamento da reatividade cruzada acontece exclusivamente com as arboviroses da família *Flaviviridae*, entretanto, com os recentes diagnósticos que confirmaram a inserção de novos arbovírus da família *Togaviridae*, como Mayaro (MYV) e Ross River (RRV) em áreas endêmicas de CHIKV, esta questão torna-se mais uma vez relevante para os testes sorológicos já existentes. Desta forma, é de suma importância o investimento nas tecnologias de detecção multipatogênicas e o desenvolvimento de novas adaptações em função das técnicas já disponíveis.

5. REFERÊNCIAS:

ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. **Mayaro: an emerging viral threat?** Emerging Microbes & Infections, v. 7, n. 1, p. 1–11, dez. 2018.

AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Risco do chikungunya para o Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 0, p. 1–6, 2015.

AYDIN, S. **A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA.** Peptides, v. 72, p. 4–15, out. 2015.

BARBOSA, L. S. **Características clínicas, epidemiológicas e perfil de citocinas em pacientes naturalmente infectados pelo dengue, zika ou coinfectados durante a epidemia de 2016,** Mato Grosso do Sul, Brasil. Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, p. 130, jun. 2018.

BARBOSA, M. L. **DENGUE: REVISÃO.** Revista Instituto Adolfo Lutz. v. 56, n 1, p. 27-45, 1996.

BARROS, M. C. DO E. S. **Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão.** p. 108, 2007.

BASTOS, L. F. C. S. **OPAS/OMS Brasil - Folha informativa - Febre amarela | OPAS/OMS.** Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875>. Acesso em: 21 jan. 2021

BOLLELA Valdes R., Daisy N. Sato e Benedito A. L. Fonseca **Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar** Rev. Saúde Pública, 33 (3): 281-6, 1999 www.fsp.usp.br/~rsp

BORGES, L. S. R. **Diagnostic Accuracy Measures in Cardiovascular Research.** **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 2016.

BRANDÃO, N. A. L. Repetitividade e reprodutibilidade na validação de métodos para testes de germinação de sementes de espécies florestais. p. 108, 2013.

BRASIL, E.; KOALADESIGN, D. BY. **EUROIMMUN - Diagnóstico Médico-laboratorial Brasil.** Disponível em: <<https://www.euroimmun.com.br/tecnicas/>>. Acesso em: 1 fev. 2021.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Febre amarela : guia para profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.** – 1. ed., atual. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 67 p. : il.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (ed.). **Boletim Epidemiológico:** monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 01 a 52. Brasília, 2020. 51 v. Disponível

em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>> Acesso em: 24 jun. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3^a. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019. 740 p. : il.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya : manejo clínico** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 65 p. : il.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico** : adulto e criança [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016. 58 p. : il.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS [recurso eletrônico]** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 136 p. : il.

BRASIL, Telelab - Ministério da Saúde. **Princípios metodológicos do teste rápido Alere para diagnóstico da sífilis**, [s.d.]. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22199/mod_resource/content/4/Sifilis%20-%20Manual%20Aula%208.pdf> Acesso em: 22 jan. 2021

BRASIL, Telelab - Ministério da Saúde. **Princípio do teste rápido TR DPP® HIV 1/2 Bio-Manguinhos (FO)**, [s.d.]. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22170/mod_resource/content/2/HIV%20DPP%20Fluido%20oral%20Bio%20Manguinhos.pdf> Acesso em: 22 jan. 2021

BRASIL, Telelab - Ministério da Saúde. **Metodologias e funcionamento dos testes rápidos mais utilizados no Brasil**, [s.d.]. Disponível em: <https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/22198/mod_resource/content/1/S%C3%ADfili s%20-%20Manual%20Aula%207.pdf> Acesso em: 22 jan. 2021

COSTA, Z. G. A. et al. **Evolução histórica da vigilância epidemiológica e do controle da febre amarela no Brasil**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, v. 2, n. 1, p. 11–26, mar. 2011.

CRUZ, J. S. Avaliação de teste diagnóstico para identificação da infecção pelo vírus da dengue em pacientes com síndrome febril aguda. **Mestrado. CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ. Salvador.**, 2014.

CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. **Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 112, n. 8, p. 523–531, ago. 2017.

Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da febre amarela. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=guidelines-5053&alias=46877-laboratory-diagnosis-of-yellow-fever-virus-infection&Itemid=270&lang=en>. Acesso em: 15 jun. 2020.

DEJNIRATTISAI, W. et al. **Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus.** *Nature immunology*, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, set. 2016.

Dual Platform – Chembio Diagnostics, Inc. Disponível em: <<https://chembio.com/innovation/dual-platform/>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ESPINAL, M. A. et al. **Emerging and Reemerging *Aedes* -Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy.** *American Journal of Public Health*, v. 109, n. 3, p. 387–392, mar. 2019.

FEITOSA, A. L. P. **Padronização de uma nova técnica para detecção de anticorpos neutralizantes anti-dengue baseada na rt-pcr em tempo real.** p. 77, 2015.

FERREIRA, F. C. P. DE A. DI M. **Febre Chikungunya em gestantes e recém-nascidos: revisão sistemática da literatura e relato de caso no Estado do Rio de Janeiro.** Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, p. 121, mar. 2018.

FRANCO, O. **História da Febre-Amarela no Brasil.** Rio de Janeiro: [s.n.].

GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. **Yellow Fever: A Reemerging Threat.** *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 30, n. 1, p. 237–260, mar. 2010.

GUBLER, D. J. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 480–496, jul. 1998.

HALSTEAD, S. B. **Travelling arboviruses: A historical perspective.** *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 31, p. 101471, set. 2019.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. **Flaviviruses and flavivirus vaccines.** *Vaccine*, v. 30, n. 29, p. 4301–4306, jun. 2012.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Dengue: Vírus e vetor.** Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>>. Acesso em: 15 jan. 2021.

JACOBSEN, S. et al. **External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection.** *Journal of Clinical Virology*, v. 76, p. 55–65, 1 mar. 2016.

JARMAN, R. et al. **Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary Dengue Virus Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 825–833, 1 nov. 2009.

KERKHOF, K. et al. **Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia?** *Trends in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 276–292, abr. 2020.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. Journal of Immunology Research, v. 2016, p. 1–14, 2016.

KIKUTI, M. et al. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viruses. International Journal of Infectious Diseases, v. 91, p. 38–43, 1 fev. 2020.

KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. Essays in Biochemistry, v. 60, n. 1, p. 111–120, 30 jun. 2016.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. Revista de Saúde Pública, v. 50, n. 0, 2016.

LINGERVELDER, D. et al. Point-of-care testing in primary care: A systematic review on implementation aspects addressed in test evaluations. International Journal of Clinical Practice, v. 73, n. 10, out. 2019.

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, set. 2014.

MADRID, A. T. DE; PORTERFIELD, J. S. A Simple Micro-culture Method for the Study of Group B Arboviruses*. Bull. Org. mond. Santé, n. 40, p. 113–121, 1969.

MARINHO, C. F. Influência do Sistema Complemento na infecção, ativação celular e alteração da permeabilidade endotelial na Dengue. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2015.

MARTINS, T. M. Abordagem sobre os kits empregados no diagnóstico laboratorial da Zika nas diferentes metodologias- um estudo de revisão. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

MATA, V. E. et al. Testes imunocromatográficos rápidos para o diagnóstico da dengue: uma revisão sistemática e metanálise. Cadernos de Saúde Pública, v. 36, n. 6, 2020.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. Journal of Clinical Virology, v. 64, p. 160–173, mar. 2015.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. The Journal of Infectious Diseases, v. 215, n. suppl_2, p. S89–S95, 1 mar. 2017.

MUNOZ-JORDAN, J. L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities.

NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. Journal of Clinical Microbiology, v. 57, n. 6, p. e00350-19, /jcm/57/6/JCM.00350- 19.atom, 24 maio 2019.

NOGUEIRA, A. B. **Avaliação da repetibilidade e da reprodutibilidade do ensaio de duplo puncionamento.** Mestrado em Engenharia de Construção Civil e Urbana—São Paulo: Universidade de São Paulo, 26 jul. 2019.

OMS. WHO | **World Health Day 2014: Vector-borne diseases.** Disponível em: <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/en/>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

OPAS/BIREME. **“Pequenas picadas, grandes ameaças” é o tema do Dia Mundial da Saúde 2014.** Disponível em: <https://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=235:pequenas-picadas-grandes-ameacas-e-o-tema-do-dia-mundial-da-saude-2014&Itemid=183&lang=pt>. Acesso em: 21 jan. 2021.

OPAS/OMS. **Diagnóstico laboratorial de infecção pelo Vírus da Febre Amarela.** set. 2018.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country: Deaths (SD/D) x100 CFR Figures for 2016 (to week noted by each country).** 2017. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2016-cha-dengue-cases-jan-26-ew-52.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (Brasil). Organização Mundial da Saúde. **Folha informativa – Dengue e dengue grave.** 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5963:folha-informativa-dengue-e-dengue-grave&Itemid=812#:~:text=Outro%20estudo%20sobre%20a%20preval%C3%Aancia,3%2C2%20milh%C3%B5es%20em%202015.. Acesso em: 24 jun. 2020.

OTIENO, P. O. et al. **Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the determination of chlorpyrifos ethyl residues in water and sediments.** Talanta, v. 117, p. 250–257, dez. 2013.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. **Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases.** BMJ Global Health, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, jan. 2017.

PASHMFOROSH, M. et al. **Topical Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of *Citrullus colocynthis* Extract Cream in Rats.** Medicina (Kaunas), 2018.

PESSOA, N. L. **Estudo da resposta imune inata celular in vitro contra Dengue virus e Zika virus.** p. 168, [s.d.].

PRAT, C. M. et al. **Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus.** Emerging Infectious Diseases, v. 20, n. 12, p. 2129–2132, dez. 2014.

RODRIGUES, G. O. L. **Reatividade cruzada entre Dengue vírus e outros vírus do gênero flavivírus.** Programa de Pós-Graduação. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 53, 2010.

SAKAMOTO, S. et al. **Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites.** Journal of Natural Medicines, v. 72, n. 1, p. 32–42, jan. 2018.

SAKKAS, H. et al. **Oropouche Fever: A Review.** Viruses, v. 10, n. 4, p. 175, 4 abr. 2018.

SILVA, N. I. O. et al. **Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease.** Virology Journal, v. 17, n. 1, p. 9, dez. 2020.

SIMÕES, M. **Avaliação da acurácia e confiabilidade do teste sorológico de neutralização por redução de placas de lise (MICRO-PRNT) na detecção de anticorpos para o vírus da febre amarela.** p. 101, 2011.

SOUZA, C. G. D. **Avaliação da sensibilidade de diferentes testes diagnósticos para a dengue.** Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo., p. 71, 2012.

SOUZA, S. V. C.; VARGAS, E. A.; JUNQUEIRA, R. G. **Eficiência de um kit de ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no estado de Minas Gerais.** Food Science and Technology, v. 19, n. 3, p. 401–405, dez. 1999.

SUKHRALIA, S. et al. **From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses.** European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 38, n. 1, p. 3–14, jan. 2019.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Overview of ELISA - BR.** Disponível em: <www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>. Acesso em: 21 jan. 2021.

TIGHE, P. J. et al. **ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls.** PROTEOMICS – Clinical Applications, v. 9, n. 3–4, p. 406–422, abr. 2015.

VASCONCELOS, P. F. C. **Febre amarela.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, n. 2, p. 275–293, abr. 2003.

VIEIRA, D. S. et al. **Epidemiological profile of Zika, Dengue and Chikungunya virus infections identified by medical and molecular evaluations in Rondonia, Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 61, p. e40, 2019.

WILDER-SMITH, A. et al. **Dengue.** The Lancet, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 26 jan. 2019.

WILSON, D. E.; CHOSEWOOD, L. C. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.** p. 438, set. 2009. Disponível em: <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF>. Acesso em: 24 jun. 2020.

WITTLIN, B. B. **Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense.** Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, p. 72, 2018.

World Health Organization Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. CH-1211 Geneva 27, Switzerland. 2007.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. In: HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. (Eds.). . **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1062p. 1–10.