



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto



INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Nikolas Alexander Borsato Lino

**PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA DO TIPO *SANDWICH* PARA CAPTURA DO NS1
DO VÍRUS ZIKA**

São José do Rio Preto

2023

Nikolas Alexander Borsato Lino

**PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA DO TIPO *SANDWICH* PARA CAPTURA DO NS1
DO VÍRUS ZIKA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP, SP.

Financiadora: CNPq – n° da Proposta: 5955 / 2023-6

Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal

Coorientador: Dr. Vivaldo Gomes da Costa

São José do Rio Preto

2023

L758p

Lino, Nikolas Alexander Borsato

Padronização de um ELISA do tipo sandwich para captura do NS1 do vírus Zika / Nikolas Alexander Borsato Lino. -- São José do Rio Preto, 2023
39 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e
Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Paula Rahal

Coorientador: Vivaldo Gomes da Costa

1. Virologia. 2. Arbovirus. 3. Virus Zika. 4. Diagnóstico viral. 5. ELISA. I.

Título.

Nikolas Alexander Borsato Lino

**PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA DO TIPO *SANDWICH* PARA CAPTURA DO NS1
DO VÍRUS ZIKA**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, IBILCE/UNESP, SP.

Financiadora: CNPq – n° da Proposta: 5955 / 2023-6

Comissão Examinadora

Dr. Vivaldo Gomes da Costa

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Coorientador

MSc. Gabriela de Lima Menezes

UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Membro Titular

MSc. Maria Letícia Duarte Lima

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Membro Titular

MSc. Gabriela Miranda Ayusso

UNESP - Campus de São José do Rio Preto (IBILCE)

Membro Suplente

São José do Rio Preto

25 de janeiro de 2023

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) foi associado com o incomum aumento de casos de microcefalia no Brasil entre os anos de 2015 e 2016. Em decorrência desta epidemia causada por arbovírus nas Américas, a Organização Mundial de Saúde declarou emergência de saúde pública de interesse internacional. Desde então, o ZIKV tem sido o foco de pesquisas voltadas a mitigar os seus efeitos na saúde humana, incluindo estudos voltados à vigilância epidemiológica molecular, antivirais e formas de prevenção. Testes laboratoriais voltados à identificação acurada do ZIKV são de suma importância, porque, durante a doença, o quadro clínico é inespecífico. Diferentemente dos ensaios de captura de IgM e IgG anti-ZIKV, a NS1 representa um biomarcador de maior precocidade, porque é secretado pelas células infectadas e independe do período de janela imunológica. Outra vantagem da NS1 está relacionada à menor possibilidade da ocorrência de reações cruzadas, as quais são frequentes na sorologia por anticorpos entre os flavivírus por estes compartilharem vários epítomos. Portanto, a relevância do presente estudo situa-se nessa problemática por visar padronizar um ensaio de ELISA *sandwich* para captura da proteína não estrutural 1 (NS1) do ZIKV, ou seja, a proteína que será testada representa um IgG anti-NS1 (anticorpo teste). De resultados principais, foi observado que a caseína na concentração a 0.5% foi o melhor bloqueio, dentre a testagem com leite em pó desnatado e albumina sérica bovina, pois gerou menor *background* nos experimentos. O anticorpo teste revelou positividade para o NS1-ZIKV recombinante nas concentrações de 2.14 µg/mL a 0.03 µg/mL. Por outro lado, satisfatoriamente o anticorpo teste não reagiu de forma cruzada com o NS1 recombinante do vírus dengue (DENV) nas concentrações de 5.32 µg/mL a 0.16 µg/mL. Para o teste de amostras séricas NS1-ZIKV positivas por padrão ouro (PRNT 50), houve sensibilidade de 55.5% (15/27) e especificidade de 88% (30/34). Em síntese, neste estudo piloto os dados gerados mostram que o anticorpo teste não reage de forma cruzada com o NS1-DENV e pode ser um alvo interessante para detecção do NS1-ZIKV, porém testes adicionais são necessários com o intuito de otimizar a sua sensibilidade.

Palavras-chave: Vírus Zika. ELISA *Sandwich*. Diagnóstico NS1.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) was associated with an unusual increase in microcephaly cases in Brazil between 2015 and 2016. As a result of this epidemic caused by arbovirus in the Americas, the World Health Organization declared a public health emergency of international concern. Since then, ZIKV has been the focus of research aimed at mitigating its effects on human public health, including studies aimed at molecular epidemiological surveillance, antivirals and forms of prevention. Laboratory tests aimed at the accuracy of ZIKV are of paramount importance, because, during the disease, the clinical picture is nonspecific. Unlike anti-ZIKV IgM and IgG capture assays, NS1 represents an early biomarker, because it is secreted by infected cells and it is independent of the window period. Another advantage of NS1 is related to the lower possibility of the occurrence of cross-reactions, which are frequent in serology for antibodies between flaviviruses because it shares several epitopes. Therefore, the relevance of the present study lies in this problem as it aims to standardize a *sandwich* ELISA assay for the capture of ZIKV non-structural protein 1 (NS1), that is, the protein that will be tested represents an anti-NS1 IgG (test antibody). From the main results, it was observed that casein at a concentration of 0.5% was the best blocker, among the tests with skimmed milk powder and bovine serum albumin, as it generated a smaller background in the experiments. The test antibody revealed positivity for recombinant NS1-ZIKV at concentrations from 2.14 µg/mL to 0.03 µg/mL. On the other hand, the test antibody did not satisfactorily cross-react with dengue virus recombinant NS1 (DENV) at concentrations from 5.32 µg/mL to 0.16 µg/mL. For testing NS1-ZIKV positive serum samples by gold standard (PRNT 50), there was a sensitivity of 55.5% (15/27) and a specificity of 88% (30/34). In summary, in this pilot study, the data generated show that the test antibody does not cross-react with NS1-DENV and may be an interesting target for detection of NS1-ZIKV, but additional tests are needed in order to optimize its sensitivity.

Keywords: Zika Vírus. *Sandwich* ELISA. NS1 Diagnostic.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial, à orientadora, Profa. Dra. Paula Rahal e ao coorientador, Dr. Vivaldo Gomes da Costa, pelo enorme suporte oferecido, o acompanhamento e correção em todas as etapas.

Aos membros do Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) por toda a ajuda, aprendizado e ótimos momentos.

Ao meu pai Valdir por apoiar a minha educação e incentivar meus sonhos.

Às minhas madrinhas Eliana e Edilene, que são um exemplo de amor e família e sempre estiveram presentes.

Aos meus amigos Filho, Priscila, Thaís, Beatriz, Lucas, Sofia, Helena, Ana Julia e Yasmin pelos momentos incríveis que passamos na última década, incentivo e companheirismo.

Aos professores Leonel e Maria Edviges por me incentivarem a me aprofundar nessa área fantástica da ciência que é a biologia.

A todos os docentes da UNESP, que com seus vastos conhecimentos nos deram o suporte teórico para trilharmos o caminho até aqui.

Ao Prof. Dr. Edilson Luiz Durigon pela disponibilização das amostras séricas NS1 positivas para o vírus Zika.

Ao Instituto Butantan, em especial a Dra. Roxane M.F. Piazza e pela colaboração.

Ao órgão de fomento CNPq (nº da Proposta: 5955/2023-6) pelo apoio financeiro para a execução do trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na elaboração e execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Fig.1. Representação do ZIKV especificando o material genético +ssRNA e as proteínas estruturais.....	15
Fig.2. Esquema das etapas do ensaio ELISA.....	23
Fig.3. Gráfico contendo concentrações de diferentes tipos de bloqueios, diluições seriadas do conjugado e número de lavagens das placas.....	24
Fig.4. Imagem esquematizada da titulação em bloco, envolvendo diluições seriadas dos anticorpos teste e anticorpo monoclonal anti-NS1 ZIKV.....	25
Fig.5. Medições de absorvância de NS1 do ZIKV e DENV em diferentes diluições.....	26
Fig.6. Gráfico contendo curva ROC.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

µL: microlitro

°C: graus Celsius

+ssRNA: *Positive sense, single-stranded RNA* (RNA de cadeia simples e senso positivo)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CHIKV: *Chikungunya virus* (Vírus Chikungunya)

DENV: Vírus da dengue

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ESPII: Emergência de saúde pública de importância internacional

GBS: *Guillain-Barre syndrome* (Síndrome de Guillain-Barré)

HRP: *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de Rábano)

IC: Intervalo de confiança

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

JEV: *Japanese encephalitis virus* (Vírus da Encefalite Japonesa)

kDa: Quilodalton

LEGO: Laboratório de Estudos Genômicos

M: Molaridade

ml: Mililitro

mM: Milimolar

mg/mL: Miligrama por mililitro

NS1: Proteína não-estrutural do tipo 1

NS2A: Proteína não-estrutural do tipo 2A

NS2B: Proteína não-estrutural do tipo 2B

NS3: Proteína não-estrutural do tipo 3

NS4A: Proteína não-estrutural do tipo 4A

NS4B: Proteína não-estrutural do tipo 4B

NS5: Proteína não-estrutural do tipo 5

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAHO: *Pan American Health Organization* (Organização Pan-Americana da Saúde)

PBS: *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

PBST: *Phosphate-buffered saline with Tween-20*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PRNT: *Plaque Reduction Neutralization Test* (Teste de Neutralização por Redução de Placas)

qPCR *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)

qRT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative* (Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa)

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

TBS: *Tris-buffered saline* Solução salina tamponada Tris)

TBST: *Tris-buffered saline with Tween 20* (Solução salina tamponada Tris com Tween 20)

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)

UNESP: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

ZIKV: *Zika virus* (Vírus Zika)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. Aspectos históricos	13
2.2 Propriedades gerais do ZIKV e da proteína NS1	14
2.3. Transmissão e doença	15
2.4. Diagnóstico.....	16
2.4.1. Isolamento viral.....	17
2.4.2. Métodos moleculares	17
2.4.3. Métodos sorológicos	17
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo Geral.....	19
4.2. Objetivo Específico	19
5. METODOLOGIA	19
5.1. Aspectos éticos, local do estudo e colaboração com o Instituto Butantan	20
5.2. Amostras biológicas	20
5.3. Reagentes e soluções	20
5.3.1. Anticorpo IgG policlonal anti-NS1.....	20
5.3.2. Proteína NS1 purificada	21
5.3.3. Anticorpo monoclonal anti-NS1	21
5.3.4. Anticorpo anti-IgG conjugado a enzima peroxidase (HRP).....	21
5.3.5. Substrato de revelação e solução STOP	21
5.4. Padronização do ELISA <i>sandwich</i>	21
6. RESULTADOS.....	23
6.1 Otimização dos parâmetros do ensaio ELISA	23
6.2. Análise da reatividade cruzada do ensaio ELISA.....	25
6.3 Acurácia do ELISA para detecção do ZIKV.....	26
7. DISCUSSÕES	27
8. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

Arbovirus são importantes vírus emergentes que têm causado grande preocupação internacional. Essa denominação compreende centenas de vírus que compartilham a característica de transmissão por artrópodes, principalmente mosquitos hematófagos, embora não haja necessidade de serem aparentados filogeneticamente (WEAVER *et al.*, 2009). Vírus transmitidos por artrópodes, como Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) se disseminaram pelo mundo nos últimos anos e causaram surtos principalmente em países do hemisfério sul (CABRAL-CASTRO *et al.*, 2016; DONALISIO *et al.*, 2017).

Dentre os locais do globo em que ocorreram epidemias de ZIKV, o Brasil foi o que apresentou maior emergência do vírus (FARIA *et al.*, 2016). Além disso, associações entre casos confirmados de infecções e microcefalia em recém-nascidos e outras doenças neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), foram relatadas no país (RASMUSSEN *et al.*, 2016).

A principal forma de transmissão vetorial do ZIKV ocorre por meio de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* (*A. aegypti* e *A. Albopictus*), muito presentes em regiões tropicais e subtropicais, embora outros foram relatados em pesquisas recentes, como *Culex quinquefasciatus* (AYRES *et al.*, 2016; PATTERSON *et al.*, 2016; VIVEIROS-ROSA *et al.*, 2020). Quanto à transmissão não vetorial, uma forma cada vez mais frequente é a transmissão sexual (O'REILLY *et al.*, 2018).

Uma vez que a transmissão vetorial é considerada a principal via de transmissão do ZIKV, a melhoria no controle do mosquito vetor é uma medida que deveria ser uma prioridade. Infelizmente, esse controle acontece de forma ineficiente em países endêmicos, que muito frequentemente carecem de infraestrutura de saneamento básico (GRISCHOTT *et al.*, 2016; AYLLÓN *et al.*, 2017; COSTA-DASILVA *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Como o tratamento antiviral específico e a vacina não são alternativas existentes no momento e o controle do vetor ocorre de maneira ineficiente, o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas é considerado uma forma eficaz de limitar a propagação do ZIKV (MANORE *et al.*, 2017; PAHO, 2015; PERGOLIZZI *et al.*, 2020).

Embora existam testes diagnósticos aprovados pela ANVISA, os testes atualmente comercializados no Brasil frequentemente apresentam dificuldades no diagnóstico correto, como problemas de reatividade com outros Flavivírus, como o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental, e DENV (SILVA *et al.*, 2020; ENDALE *et al.*, 2021).

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi analisar uma ferramenta sorológica de diagnóstico de ZIKV e verificar as melhores condições para um diagnóstico de boa acurácia laboratorial.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos históricos

O ZIKV foi originalmente isolado em Uganda em 1947, durante um estudo sobre febre amarela na floresta de Zika a partir do sangue de um macaco Rhesus (*Macaca mulata*) que desenvolveu uma doença febril que não foi diagnosticada como febre amarela (DICK *et al.*, 1952). Posteriormente, a natureza zoonótica foi registrada em 1964 (SIMPSON, 1964) e os primeiros isolamentos do vírus a partir de humanos foram realizados na Nigéria (FAGBAMI *et al.*, 1979).

Nos primeiros 60 anos após a descoberta em Uganda, ZIKV permaneceu restrito a uma zona equatorial na África e na Ásia. Em seguida, teve sua presença registrada na Ilha Yap em 2007, na América Latina em 2015 e na América do Norte em 2016 (SONG *et al.*, 2017). Nesse período começaram a ser relatadas associações entre as infecções por ZIKV e neuropatologias: a GBS na Polinésia Francesa foram descrito em 2013 (IOOS *et al.*, 2014; OEHLER *et al.*, 2014) e casos de microcefalia em recém-nascidos no Brasil em 2015 e 2016 (SCHULER-FACCINI *et al.*, 2016).

No Brasil, o ZIKV foi relatado de forma autóctone pela primeira vez em 2015 no município de Camaçari, no estado da Bahia. Através de análises filogenéticas do vírus circulante nesse período, foi observado que a linhagem presente no país era semelhante a um isolado viral coletado de um surto ocorrido anteriormente na Polinésia Francesa (CAMPOS *et al.*, 2015). No final do mesmo ano, houve expansão do vírus para pelo menos 14 estados brasileiros com uma estimativa de 440.000–1.300.000 casos suspeitos (HENNESSEY *et al.*, 2016), seguido de uma epidemia preocupante em 2016.

É possível considerar que duas ondas distintas de possível infecção pelo ZIKV se estenderam por todas as regiões brasileiras em 2015 e 2016. Foram notificados 1.673.272 casos, dos quais 41.473 (2,5%) foram em mulheres grávidas. Foram notificados, aproximadamente, 1.950 casos de microcefalia relacionada à infecção e a maioria dos casos (1.373 [70,4%]) ocorreu na região nordeste após a primeira onda de infecção pelo ZIKV, com pico de ocorrência mensal estimado em 49,9 casos por 10.000 nascidos vivos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Entretanto, o ZIKV não permaneceu restrito ao Brasil durante a epidemia de 2016 (PAHO, 2016; YAKOB *et al.*, 2022). Nesse período, a transmissão autóctone do ZIKV havia sido relatada em 22 países e territórios da América Latina e Caribe e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (ESPII) em 1º de fevereiro de 2016 (YAKOB *et al.*, 2022; PIELNAA *et al.*, 2020).

A partir de 2017 os casos caíram substancialmente no Brasil e no mundo, mas um número significativo de infecções ainda é notificado atualmente. Entre 2017 e 2021, mais de 100.000 casos de ZIKV foram relatados desde o término do período de Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional em 2016 (YAKOB *et al.*, 2022).

2.2 Propriedades gerais do ZIKV e da proteína NS1

O ZIKV, família *Flaviviridae*, é um vírus envelopado que contém RNA fita simples e sentido positivo (+ssRNA) como material genético. Esse genoma contém 10,794 nucleotídeos e codifica 3,419 aminoácidos. O material genético codifica três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope), encontradas no *vírião*, e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que participam do complexo de replicação viral (PETERSEN *et al.*, 2016; LINDENBACH *et al.*, 2003) (Fig. 1).

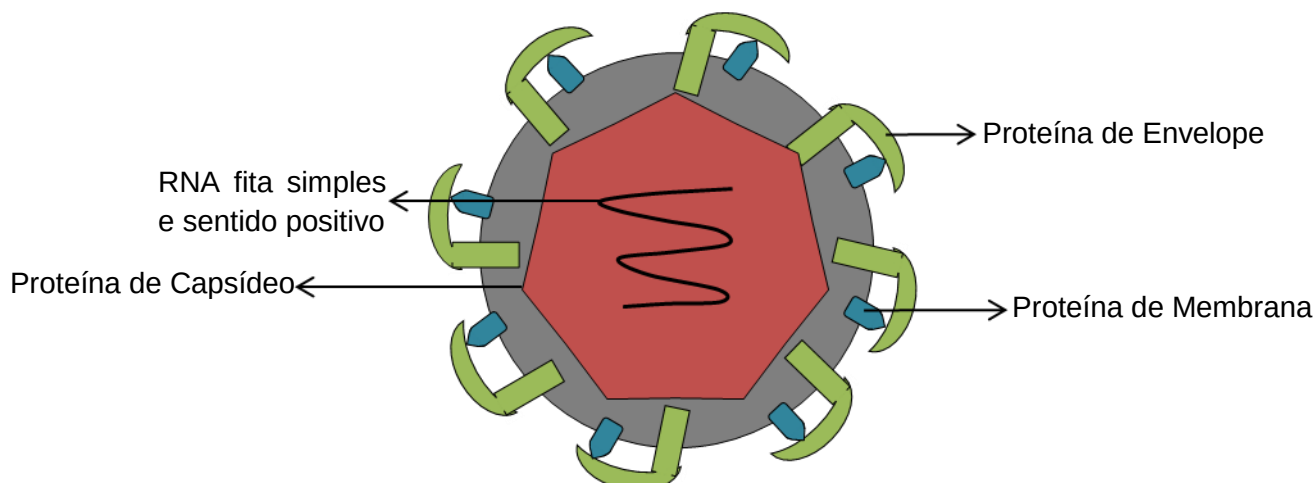


Fig. 1. Representação do ZIKV especificando o material genético +ssRNA e as proteínas estruturais. Os elementos representados em azul, verde e vermelho indicam, respectivamente, membrana, envelope e capsídeo.

A NS1, proteína alvo para captura no trabalho, tem papel chave no complexo de replicação e montagem do *vírião*; é glicosilada e existe em diferentes formas multiméricas nos espaços intracelular e extracelular. Portanto, possui muitas propriedades que a tornam interessante em termos de desenvolvimento de vacinas e no diagnóstico contra os flavivírus (LINDENBACH *et al.*, 2003; CARPIO *et al.*, 2021; BERTHET *et al.*, 2014; FAYE *et al.*, 2014).

A NS1 é uma glicoproteína de 352 aminoácidos com peso molecular aproximado de 40 a 50 kDa. É um alvo muito interessante no diagnóstico clínico de fase aguda, pois é abundantemente produzida pelos flavivírus nos estágios iniciais da infecção (LINDENBACH *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2014).

Diferentemente, as respostas por IgM se desenvolvem após o quarto dia do início dos sintomas, persistindo por até 12 semanas. Também de surgimento tardio, quando comparado a NS1, a resposta por IgG se desenvolve logo depois da resposta por IgM e permanece alta por vários meses após a infecção (ZHAO *et al.*, 2019).

2.3. Transmissão e doença

ZIKV é transmitido principalmente pela picada do mosquito *Aedes aegypti*, sendo considerado um arbovírus. Entretanto, desde o isolamento do vírus em 1947 (IMPERATO *et al.*, 2016; LANCIOTTI *et al.*, 2008), o ZIKV também foi observado em 17 gêneros de mosquitos *Aedes*, como *Aedes africanus*, *Aedes albopictus*,

(SHARMA *et al.*, 2019; SLAVOV *et al.*, 2016) e *Culex quinquefasciatus* (BOCCOLINI *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016).

Quanto às formas de transmissões vetoriais, o ZIKV pode ser transmitido por mosquitos infectados em um habitat silvestre para macacos *Rhesus* e vice-versa, em um ciclo enzoótico entre primatas não humanos. O vetor deste mosquito infectado, então, pode infectar humanos neste habitat após uma picada de mosquito ou um mosquito de propagação dos habitats silvestres para áreas rurais ou urbanas em um ciclo epidêmico. O ciclo epidêmico geralmente começa quando os humanos são infectados pelos mosquitos infectados após a viremia e a replicação viral, enquanto o vírus se espalha para as áreas reprodutivas humanas e, portanto, o ciclo continua (HERRERA *et al.*, 2017; ROIZ *et al.*, 2018; YUN *et al.*, 2016; BASU *et al.*, 2016).

Já em relação à transmissão não vetorial, é possível acontecer a transmissão vertical, a transmissão sexual e também por meio da transfusão de sangue (PAHO, 2015; PERGOLIZZI *et al.*, 2020).

O ZIKV, geralmente, provoca uma doença autolimitada e cerca de 80% dos casos são assintomáticos (DUFFY *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2017). Porém, em casos sintomáticos, podem ser observados relatos de dor de cabeça, artralgia, erupção cutânea e, menos frequentemente, distúrbios digestivos, dor retro-orbital e linfadenopatia cervical (FARIA, *et al.*, 2016; DUFFY *et al.*, 2009; OLSON *et al.*, 1981; ZANLUCA *et al.*, 2015).

A infecção tem sido associada com doenças neurológicas graves, incluindo microcefalia e GBS e meningoencefalite (RASMUSSEN *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017).

2.4. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV é particularmente desafiador em regiões endêmicas de DENV e com cocirculação de outros arbovirus, como o DENV e CHIKV, tornando o diagnóstico baseado apenas em dados clínicos e epidemiológicos não confiáveis (CABRAL-CASTRO *et al.*, 2016).

Ademais, o diagnóstico laboratorial específico é essencial para o controle do número de casos de ZIKV, uma vez que atualmente não existem vacina e tratamento antiviral específico e o diagnóstico correto permite a vigilância entomológica direcionada a locais endêmicos e com potencial epidêmico elevado e a consequente diminuição da transmissão (AYLLÓN *et al.*, 2017).

Atualmente, é possível identificar a infecção por ZIKV indiretamente pela detecção de anticorpos circulantes ou diretamente e essa análise pode ocorrer por meio de três principais técnicas: isolamento viral, métodos moleculares e métodos sorológicos (MAGALHAES *et al.*, 2017; PESSÔA *et al.*, 2016; SILVA, 2019).

2.4.1. Isolamento viral

Trata-se de um método baseado na utilização do cultivo celular para detectar o ZIKV. É vantajoso por ser amplamente utilizado em laboratórios de saúde pública e de pesquisas e é uma estratégia altamente específica para detectar o ZIKV. Porém, é muito laborioso e necessita de mão de obra especializada, limitando a sua utilização para o diagnóstico de rotina do ZIKV (DICK *et al.*, 1952; DIGOUTTE *et al.*, 1992; SILVA, 2019).

2.4.2. Métodos moleculares

Atualmente, a transcrição reversa seguida da PCR quantitativa (qRT-PCR) é a técnica padrão-ouro para o diagnóstico molecular do ZIKV e pode ser utilizada em amostras de mosquitos ou clínicas de humanos. O primeiro teste de diagnóstico de RT-PCR para o ZIKV foi desenvolvido em 2008 por Faye e colaboradores para auxiliar no diagnóstico da epidemia da Micronésia de 2007 (FAYE *et al.*, 2008) e o mais atual foi desenvolvido pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) em 2018. Esse último desenvolveu um kit Trioplex baseado na qRT-PCR que permite a detecção do ZIKV, DENV e CHIKV de forma simultânea em um único ensaio (FAYE *et al.*, 2013; LANCIOTTI *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2018).

2.4.3. Métodos sorológicos

Os principais métodos sorológicos são imunofluorescência indireta e imunocromatografia (teste rápido), PRNT (*Plaque reduction neutralization test*) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). As duas últimas exigem uma infraestrutura laboratorial sofisticada e PRNT é considerada a atual técnica padrão-ouro sorológica (CORDEIRO *et al.*, 2019; KUNO *et al.*, 2003). A primeira técnica sorológica para diagnóstico de ZIKV foi desenvolvida em 2007, pelo CDC, sendo um ELISA para detecção específica de IgM anti-ZIKV durante a epidemia na Micronésia e, posteriormente, outros testes sorológicos foram apresentados.

3. JUSTIFICATIVA

Desde o seu surgimento no Brasil, o ZIKV se espalhou a um ritmo alarmante em grande parte dos estados (OMS, 2015). De fato, foi evidenciada a relação de causalidade com o aumento de neuropatias (SONG *et al.*, 2017), o que levou a Organização Mundial da Saúde a declarar “emergência de saúde pública de interesse internacional” de fevereiro a novembro de 2016 (OMS, 2016; OMS, 2016b). Durante os cinco anos seguintes, 2017–2021, as taxas de infecção diminuíram substancialmente, mas regiões endêmicas persistem pelo país. Consequentemente, mais de 100.000 casos foram relatados desde que o período de Emergência de Saúde Pública terminou (YAKOB *et al.*, 2022).

Como não existe tratamento antiviral específico e nem vacina para febre zika, a forma mais efetiva de diminuir a transmissão é diagnosticar a doença para, assim, isolar os indivíduos contaminados e evitar, tanto a transmissão vetorial, quanto a não vetorial, como a transmissão vertical, a transmissão sexual e a transfusão de sangue (PAHO, 2015; PERGOLIZZI *et al.*, 2020).

Tendo em vista o alto grau de similaridade clínica da febre Zika com outras viroses, a utilização de exames laboratoriais que permitam o correto diagnóstico diferencial do patógeno causador é de extrema importância para a escolha do manejo clínico adequado e das medidas preventivas (HAMEL *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020). Posto isto, o teste laboratorial de ELISA representa um método conveniente e de praticidade para os seguintes propósitos: confirmação dos casos clínicos; vigilância epidemiológica de infecções; e avaliação do estado imunológico do indivíduo (SAKAMOTO *et al.*, 2018).

Os principais testes aprovados pela ANVISA estão voltados à detecção de IgM e IgG anti-ZIKV. Esses biomarcadores dificultam o diagnóstico precoce devido ao período de janela imunológica, pois ambos os anticorpos não são detectáveis nos primeiros dias da doença e, frequentemente, mostram problemas de especificidade em razão dos flavivírus compartilharem vários epítomos, os quais podem atuar como um alvo chave para as reações cruzadas (MACIEJEWSKI *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020). Em contraste, o presente teste propõe utilizar a NS1, sendo inovador por permitir a captura do antígeno nos primeiros dias da doença, ao invés do anticorpo, o que possibilita um diagnóstico precoce.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Padronizar um teste de ELISA visando a captura do NS1 do ZIKV em amostras séricas de humanos, sabidamente positivas e negativas para ZIKV.

4.2. Objetivo Específico

- a) Identificar os melhores tipos de bloqueio (leite em pó desnatado (LPD), albumina sérica bovina (BSA) e caseína (CAS)) que irão proporcionar as menores reatividades inespecíficas nos poços considerados brancos;
- b) Obter as melhores condições de concentrações (5,0-0,5%) dos bloqueios nos poços brancos, os quais contêm todos os insumos laboratoriais do presente teste, visando gerar o menor *background* entre eles;
- c) Testar em blocos as melhores condições de concentração do anticorpo de sensibilização (anticorpo teste), anticorpo monoclonal anti-NS1 do ZIKV e anticorpo anti-IgG conjugado a enzima peroxidase;
- d) Analisar as condições experimentais que mais contrastam entre os valores de absorbância dos controles negativos (amostras sorológicas negativas para ZIKV) versus controle positivo (NS1 do ZIKV purificado);
- e) Selecionar e testar as melhores condições de contraste de absorbância entre os controles negativos e controle positivo (NS1 do ZIKV purificado) comparado aos controles biológicos positivos (amostras de indivíduos sabidamente positivas para NS1 do ZIKV);
- f) Analisar os dados obtidos do anticorpo teste (anticorpo policlonal anti-NS1 do ZIKV), quanto aos parâmetros de acurácia laboratorial, incluindo a sensibilidade e especificidade.

5. METODOLOGIA

O presente tópico descreve todos os métodos empregados no decorrer do trabalho. Neste espaço é descrito aspectos éticos, local do estudo e colaboração com o Instituto Butantan;

5.1. Aspectos éticos, local do estudo e colaboração com o Instituto Butantan

As amostras sorológicas, que foram incluídas na triagem laboratorial, foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP-IBILCE) de São José do Rio Preto – SP (CAAE: 60482022.6.0000.5466).

Todas as etapas envolvidas nos processos de produção dos anticorpos IgG policlonal anti-NS1 ZIKV (anticorpo teste), monoclonal anti-NS1 ZIKV (2F2), e das proteínas NS1 purificadas (ZIKV e DENV) foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan sob a supervisão da profa. Dra. Roxane M.F. Piazza. Devido a colaboração, os insumos produzidos foram encaminhados para o Laboratório de Estudos Genômicos (LEGO) da UNESP de São José do Rio Preto – SP.

No tocante à padronização, todas as etapas para determinar as melhores concentrações de trabalho do anticorpo de sensibilização, bloqueio, anticorpo monoclonal anti-NS1, conjugado e amostras na microplaca de ELISA foram executadas no LEGO.

5.2. Amostras biológicas

Quanto à definição dos grupos sabidamente positivos e negativos para o NS1 do ZIKV, houve o seguinte agrupamento: 27 amostras séricas positivas para o NS1 do ZIKV, previamente testadas por PRNT 50, foram encaminhadas pelo Prof. Dr. Edilson Luiz Durigon, Universidade de São Paulo, para utilização nos ensaios como sabidamente positivas; por outro lado, o painel de amostras NS1 negativas para o ZIKV, constituíram de 34 amostras séricas contendo resultados de qRT-PCR em tempo real negativo para o ZIKV, as quais foram classificadas como sabidamente negativas. Estas amostras biológicas foram codificadas e armazenadas no LEGO.

5.3. Reagentes e soluções

5.3.1. Anticorpo IgG policlonal anti-NS1

O anticorpo IgG policlonal anti-NS1 (anticorpo teste) foi encaminhado para o Laboratório de Estudos Genômicos em forma liofilizada. Primeiramente, foi dissolvido em 1 mL de fosfato de sódio 20 mM e foi quantificado utilizando o Nanodrop, com concentração de 2.57 mg/mL. A determinação da melhor

concentração foi definida a partir de etapas de titulação em bloco em microplacas de ELISA.

5.3.2. Proteína NS1 purificada

No LEGO, a proteína não estrutural 1 (NS1) do ZIKV já purificada e dissolvida em PBS foi quantificada por meio do Nanodrop (Thermo Fisher), com concentração de 0.856 mg/mL. Posteriormente, foi alíquotada e armazenada no freezer a -20°C para ser utilizada durante as etapas de padronização. O mesmo processo aconteceu com a proteína NS1 do DENV, tendo uma concentração de 0.266 mg/mL.

5.3.3. Anticorpo monoclonal anti-NS1

O anticorpo monoclonal anti-NS1 (2F2) dissolvido em PBS foi quantificado por meio do Nanodrop, com concentração de 1 mg/mL, e armazenado no freezer a -20°C. A fim de determinar a melhor concentração, foram realizadas etapas de titulação em bloco em microplacas de ELISA.

5.3.4. Anticorpo anti-IgG conjugado a enzima peroxidase (HRP)

O Anticorpo anti-IgG conjugado a enzima peroxidase (HRP) (Thermo Scientific, n. 31430) foi adquirido comercialmente e armazenado no freezer a -20°C.

5.3.5. Substrato de revelação e solução STOP

O substrato de revelação utilizado foi a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (BD PptEIA), sendo armazenado em geladeira a -8°C.

O ácido clorídrico, responsável por estabilizar temporariamente a reação colorimétrica causada pela degradação do HRP após adição do TMB, foi utilizado em concentração de 1 M e armazenado em temperatura ambiente.

5.4. Padronização do ELISA *sandwich*

Na etapa de padronização, titulações em bloco foram realizadas a fim de determinar as melhores concentrações de trabalho do anticorpo de sensibilização, bloqueio, anticorpo monoclonal anti-NS1, conjugado e, finalmente, das amostras de soro sabidamente negativas e positivas para infecção pelo ZIKV. Para tanto, microplacas de ELISA de 96 poços (Nunc Maxisorp) foram fixadas com 100 µl de anticorpo teste (anticorpo policlonal anti-NS1 IgG purificado de coelho) diluído a 30-

1.8 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato, incubadas a 37°C por duas horas e, então, a 4°C e overnight. Após o descarte da solução contendo anticorpo teste excedente nos poços, eles foram lavados várias vezes com 300 µl de solução tamponada (TBS) contendo 0,05% de Tween-20 (TBST). A posteriori, foram testadas concentrações variadas (5,0-0,5%) contendo os bloqueios LPD, BSA e CAS.

Em continuidade a etapa de bloqueio, os poços foram lavados por diversas vezes com 300 µl de TBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Nesta fase, em vez da amostra biológica contendo soro, foi utilizado TBS como branco. O propósito foi testar diversas condições de concentração, lavagem e tempo dos reagentes visando à condição capaz de gerar o menor valor de absorbância (valor desejável abaixo de 0.1). Dessa forma, após definir as condições que geraram menor reação de fundo nos poços brancos, as amostras biológicas controle negativo e controle positivo (NS1 do ZIKV purificado) foram incluídas. As diluições para os controles positivos e negativos foram 1/10, testados em duplicata. Os poços também foram lavados após a incubação na etapa de bloqueio antes da adição da amostra biológica.

A fim de verificar a presença de reatividade cruzada, uma solução contendo a proteína NS1 do DENV também foi testada em concentrações similares à proteína NS1 do ZIKV. Ademais, após a lavagem dos poços, foi definida a concentração otimizada para o soro de cabra contendo IgG anti-camundongo conjugado a peroxidase (1/2500; 1/5000; 1/10000). Finalmente, a microplaca de ELISA foi revelada pela adição de 100 µl de TMB (KPL, EUA) a 37 °C por 15 min. A reação foi estabilizada pela adição de 50 µl de 1 M HCl, e a absorbância de cada poço, medida a 450 nm. As diluições que geraram a máxima diferença de absorbância em 450 nm foram selecionadas para testar as amostras experimentais de soro.

As amostras biológicas testadas no ELISA foram comparadas com os resultados das amostras de soro no qRT-PCR em tempo real. Os *cut off* foram determinados pela média das absorbâncias dos controles negativos acrescidos de três desvios padrão, com valores acima do *cut off* considerado positivos e abaixo considerado negativos para a captura do NS1 do ZIKV.

Em suma, todo o experimento foi conduzido em microplacas de ELISA e os resultados, medidos em absorbância por um espectrofotômetro (FLUOstar Omega) com comprimento de onda de 450nm para o substrato de revelação 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Fig. 2).

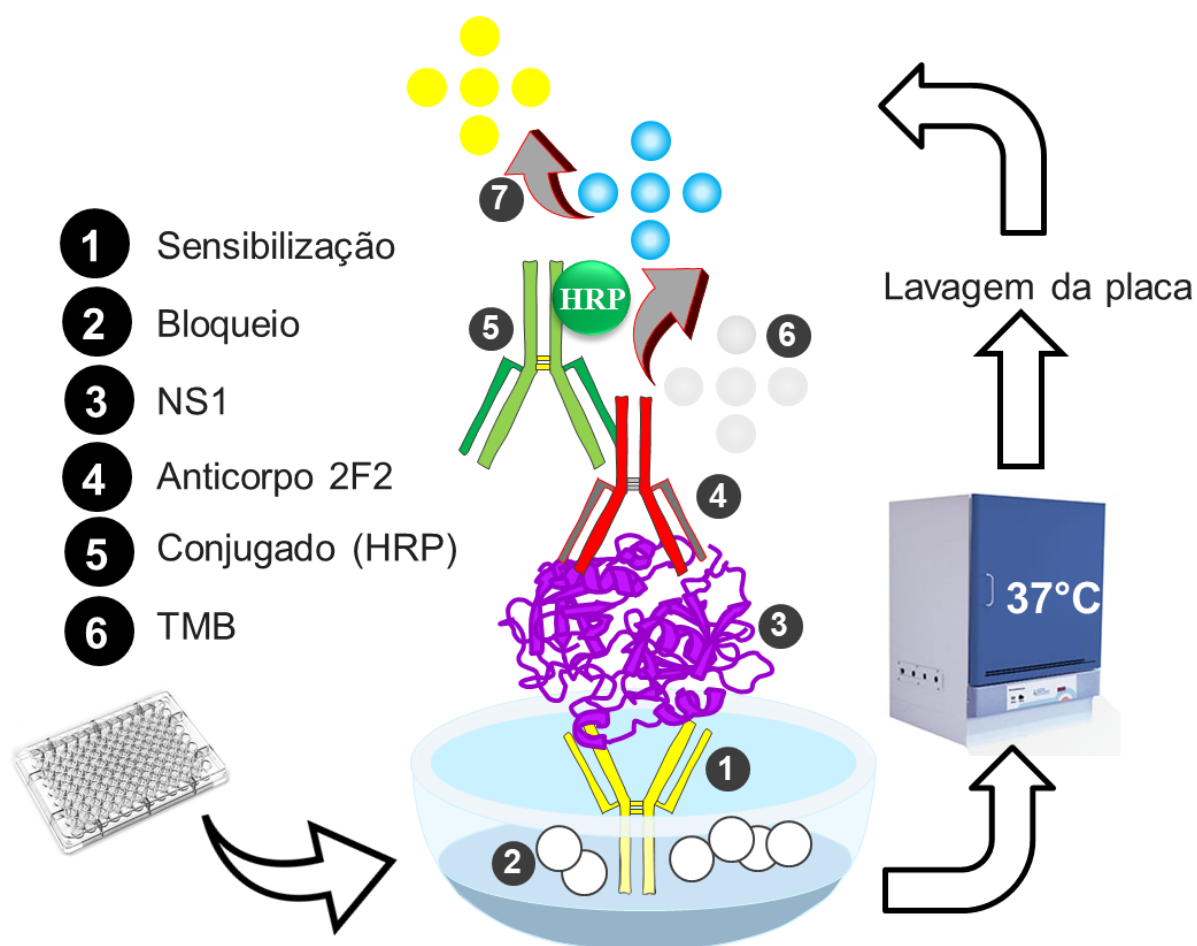


Fig. 2. Esquema das etapas do ensaio ELISA. Sequencialmente, as etapas são: sensibilização, bloqueio, adição de amostra biológica e controles positivos e negativos, anticorpo monoclonal, anticorpo conjugado a enzima peroxidase, substrato de revelação e solução STOP.

6. RESULTADOS

6.1 Otimização dos parâmetros do ensaio ELISA

Primeiro, foram ajustados individualmente os tipos e concentrações de bloqueio, e diluições do conjugado com o propósito de se obter menor *background* para o branco na placa de ELISA (Fig. 3).

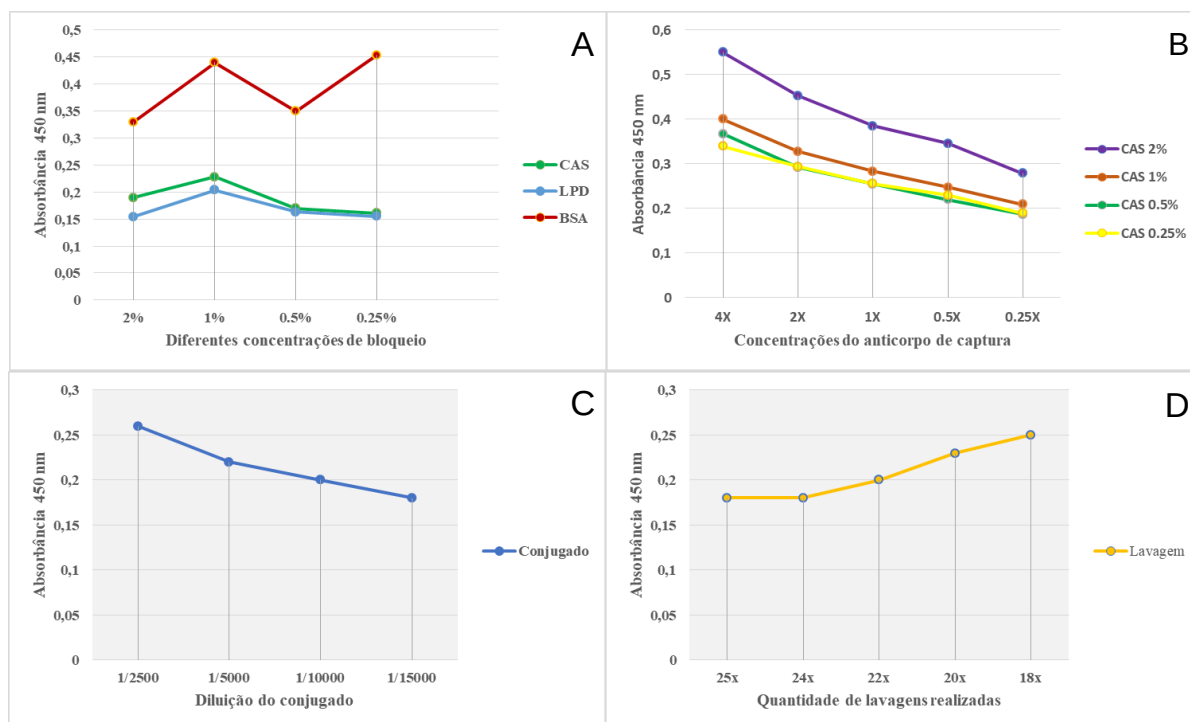


Fig. 3. Gráfico contendo concentrações de diferentes tipos de bloqueios, diluições seriadas do conjugado e número de lavagens das placas. Os gráficos mostram os valores de absorbância para diferentes tipos e concentrações de bloqueio (A). Em (B) é mostrado diferentes concentrações da CAS seguida por variadas diluições do anticorpo de teste. O eixo x do gráfico contém as seguintes concentrações do anticorpo de captura: 4X, 60 µg/mL; 2X, 30 µg/mL; 1X, 15 µg/mL, 0,5X, 7,5 µg/mL, 0,25X, 3,75 µg/mL. Em (C) verifica-se a influência da diluição do conjugado nos valores de absorbância. Para o gráfico (D) é mostrada a quantidade de lavagem influenciando nos valores de absorbância. A partir dos resultados, optou-se por usar CAS 0,5%, diluição do conjugado 1/10000 e uma quantidade de lavagem da placa de 24 vezes. CAS: caseína. LPD: leite em pó desnatado. BSA: albumina sérica bovina.

Dentre os bloqueios testados, BSA apresentou reatividade inespecífica elevada e LPD, embora tenha mostrado baixa reatividade, não foi capaz de indicar discrepância entre as absorbâncias dos controles positivos e dos brancos. Com as melhores condições do tipo e concentração de bloqueio, diluição do conjugado, ou seja, CAS a 0,5% e conjugado diluído a 1/10000, foi realizado a titulação em bloco, conforme mapa de trabalho e resultados especificados abaixo (Fig. 4). Essa parte do experimento consistiu em determinar a concentração do anticorpo policlonal teste e do anticorpo monoclonal anti-NS1 ZIKV (2F2). Em experiência envolvendo outros

ensaios ELISA, foram analisadas as condições que gerasse absorbância com os valores variando de 0,08 a 0,12.

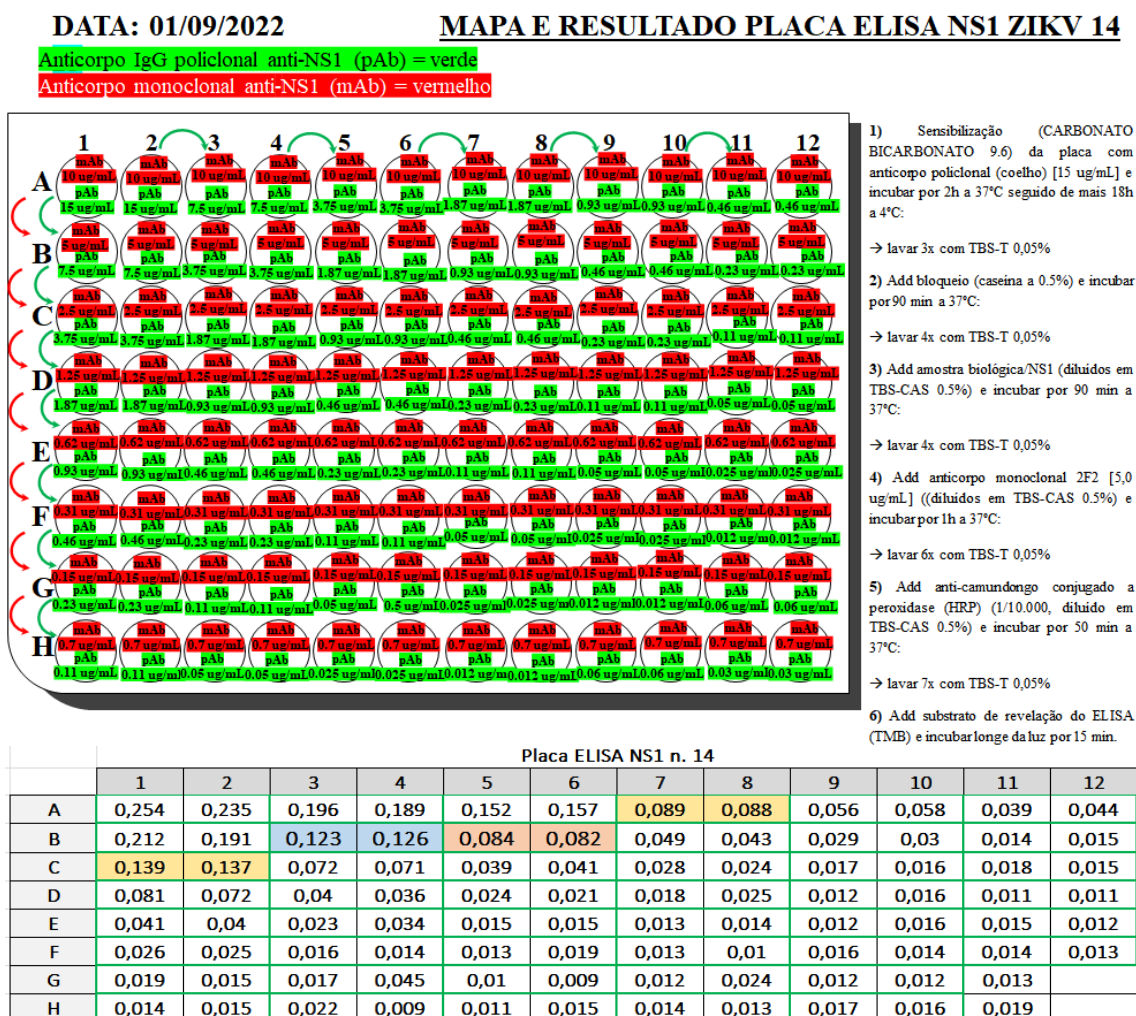


Fig. 4. Imagem esquematizada da titulação em bloco, envolvendo diluições seriadas dos anticorpos teste e anticorpo monoclonal anti-NS1 ZIKV. Na parte inferior da figura é mostrada uma tabela contendo os valores de absorbância, com destaque para as faixas de valores esperados.

Ao se utilizar o NS1-ZIKV recombinante (controle positivo), notou-se que a melhor concentração do anticorpo de captura foi de cerca de 4,0 µg/ml, enquanto optamos por utilizar 5,0 µg/ml do anticorpo monoclonal (2F2).

6.2. Análise da reatividade cruzada do ensaio ELISA

A fim de verificar uma possível reatividade cruzada no ensaio, a proteína NS1 do DENV foi testada em concentrações próximas as do NS1 do ZIKV. Conforme o

esperado, obtivemos absorvância reduzida (0,064 para concentração 1/400 e 0,091 para 1/12800) (Fig. 5).

Já os controles positivos (proteína NS1 purificada do ZIKV) obtiveram valores elevados de absorvância em todas as concentrações testadas, variando entre 1,0 (concentração 1/25600) e 1,824 (concentração 1/400) (Fig. 5).

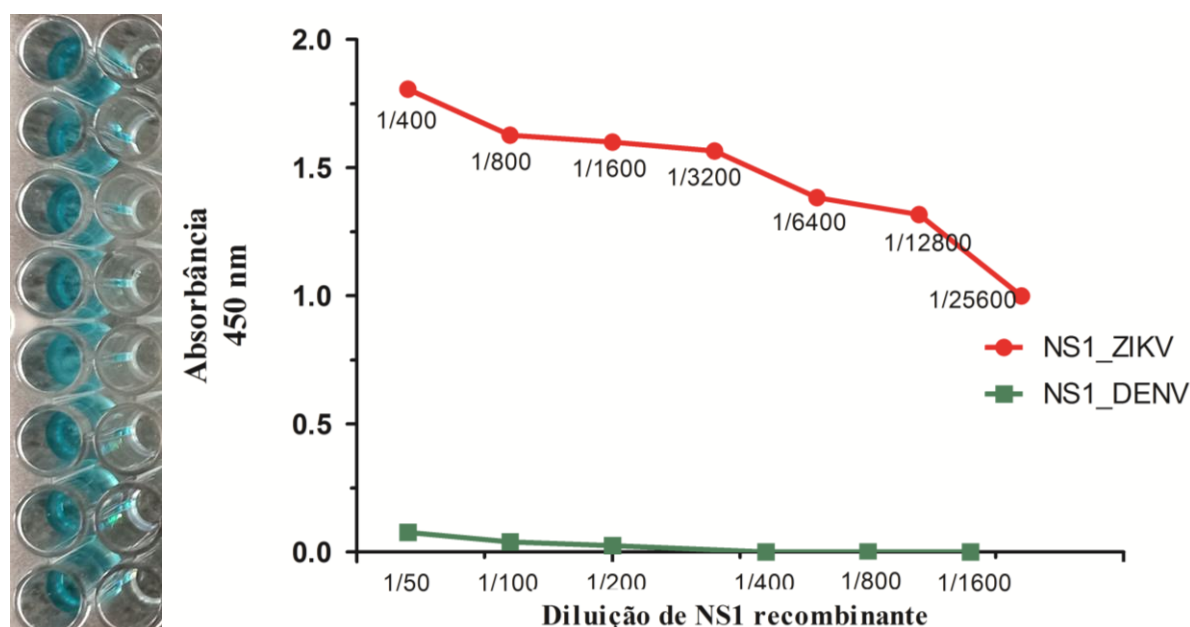


Fig. 5. Medições de absorvância de NS1 do ZIKV e DENV em diferentes diluições. As concentrações de NS1 ZIKV variaram de 2,14 $\mu\text{g/mL}$ a 30 ng/mL , enquanto para o DENV variaram de 5,32 $\mu\text{g/mL}$ a 160 ng/mL . À esquerda, os poços com maior absorvância (cor azul) receberam NS1 do ZIKV, enquanto os da direita, com menor absorvância (cor transparente), têm NS1 de DENV.

6.3 Acurácia do ELISA para detecção do ZIKV

Em relação ao painel de soros negativos, de um total de 34 amostras sabidamente negativas por qPCR, 30 apresentaram valores de absorvância abaixo do *cut off* e foram diagnosticadas corretamente, indicando especificidade de 88.2%.

De um total de 27 amostras consideradas positivas por meio de diagnóstico padrão ouro (PRNT), 15 foram observadas como verdadeiras positivas, apresentando valores de absorvância superiores ao soro de referência negativo, indicando sensibilidade do ensaio em 55,5% (Fig. 6).

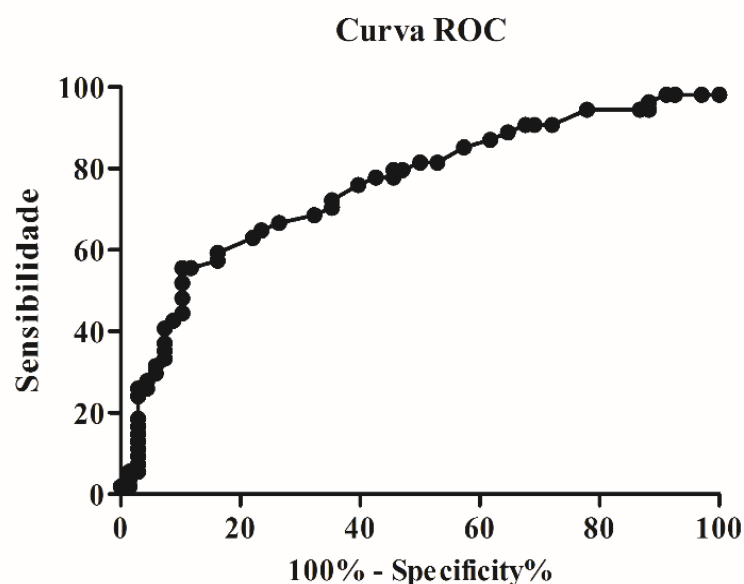


Fig. 6. Gráfico contendo curva ROC. No gráfico estão plotadas as taxas das amostras consideradas verdadeiras positivas (eixo y) e falsas positivas (eixo x). A área sob a curva foi de 0.75 (95% IC: 0.66-0.08), indicando que a precisão do teste em determinar os verdadeiros positivos e negativos foi considerada boa.

7. DISCUSSÕES

Baseado em protocolos pré-estabelecidos do laboratório, optou-se por trabalhar com concentração inicial de 15 µg/ml para o anticorpo primário (anticorpo teste) e 5 µg/ml para o anticorpo secundário (2F2) seguindo uma diluição seriada para ambos. Concentrações maiores dos anticorpos resultaram em aumento de reação inespecífica na placa. Com isso, as concentrações escolhidas foram 4 µg/ml para o anticorpo IgG policlonal anti-NS1 e 5 µg/ml para o anticorpo monoclonal anti-NS1 do ZIKV (2F2). Adicionalmente, dentre as concentrações do anticorpo conjugado a peroxidase, as maiores concentrações testadas, 1:2500 e 1:5000, apresentou absorvância maior nos brancos, sendo descartadas. A menor concentração, 1:10000, resultou melhores condições na placa, resultado esse que está em conformidade com as instruções de uso do fabricante, o qual recomenda 1:10,000-1:25,000 para ELISA (GOAT anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, 2022)

Quanto aos diferentes tipos de bloqueios, a CAS apresentou menor reação inespecífica. Curiosamente, a BSA apresentou maior reação de fundo.

Tradicionalmente, esse bloqueio tem resultados muito satisfatórios em ensaios de ELISA (BEDDINGFIELD *et al.*, 2021). Alguns estudos têm relatado a possibilidade de ocorrência de reatividade cruzada entre os anticorpos e BSA, como um estudo utilizando albumina sérica de cavalo, cães e gatos (BOTROS, 1996). Adicionalmente, KONISHI *et al.* (2010) também encontraram problemas de reação inespecífica ao utilizar BSA durante o desenvolvimento de um ensaio ELISA para outro flavivírus, JEV, e os minimizou trocando o bloqueio por CAS.

Além disso, fundamentado no perfil eletroforético da albumina e da CAS, observa-se que o *pool* proteico tende a apresentar pesos moleculares distintos: enquanto a BSA possui maior peso molecular, a CAS apresenta menor peso molecular (ESSER, 1988). Consequentemente, existe a probabilidade de que a CAS ocupe melhor os sítios não preenchidos pelo anticorpo de captura por se encaixar melhor entre os anticorpos primários. Em outras palavras, a reação inespecífica possivelmente foi melhor inibida pelo uso da CAS.

Dentre as concentrações testadas para a CAS, 0,5% foi escolhida para utilização no ensaio por gerar menor *background* nos experimentos. A CAS nessa concentração funciona de forma eficiente como agente bloqueador e, de acordo com Vogt *et al.* (1987), é capaz de inibir a ligação não específica por até 94% em baixas concentrações.

Baseado na literatura, a reatividade cruzada é um obstáculo comumente encontrado no diagnóstico de flavivírus, com destaque para DENV e ZIKV (BALMASEDA *et al.*, 2017). O presente trabalho obteve reatividade cruzada reduzida, uma vez que a absorbância entre rNS1 do ZIKV e do DENV são extremamente discrepantes: $1,00 < \text{Absorbância} < 1,824$ entre 1/400 e 1/25600 para ZIKV e $0,064 < \text{Absorbância} < 0,091$ entre 1/400 e 1/12800 para DENV. Outros estudos têm conseguido resultados igualmente interessantes, como Beddingfield *et al.* (2021), que usou mutagênese direcionada ao local para modificar epítomos putativos. No presente estudo, desde o início, o anticorpo teste não apresentou capacidade de captura do NS1 do DENV e etapas adicionais para evitar reatividade cruzada não foram necessárias.

Em relação à acurácia laboratorial, o presente estudo apresentou especificidade de 88,2%. Trata-se de um valor elevado e que está de acordo com outros ensaios, como três ensaios de ELISA para captura de NS1 do DENV analisados por Lima *et al.* (2018): 100%, 98.7% e 99.1% para o kit PanBio Early

ELISA (PanBio Diagnostics), Platelia™ NS1 (Biorad Laboratories) e para o NS1 Ag Strip (Biorad Laboratories), respectivamente. A ausência de estudos apresentando valores de especificidade para ensaios de ELISA voltados à captura de NS1 do ZIKV tornaram necessária a comparação com ensaios de detecção com outro flavivírus (DENV).

Ademais, ainda sobre a acurácia do ensaio, a sensibilidade do ensaio do presente trabalho foi de 55,5%. Interessantemente, esse resultado foi similar ao estudo de Beddingfield *et al.* (2021), o qual detectou positividade de 55,7% na captura do NS1 do ZIKV por meio de um ensaio de ELISA. A variação do limiar de detecção do NS1 do ZIKV utilizado no ensaio foi compreendida entre 2,14 µg/ml e 0,03 µg/ml. Similarmente, Beddingfield *et al.* (2021), também utilizaram valores próximos, com a concentração variando de 0,5 µg/mL a 0,03 µg/mL. Esses dados mostram que ambos os anticorpos de captura têm potencial de detectar NS1 em uma ampla variação de concentração da proteína alvo.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que a CAS na concentração de 0,5% acrescida do anticorpo policlonal (anti-NS1), a 4,0 µg/ml, e anticorpo monoclonal 2F2, a 5,0 µg/ml, tiveram menor reação inespecífica. Adicionalmente, em relação à acurácia do ensaio houve sensibilidade de 55.5% (95% IC: 41-69), enquanto o índice de especificidade foi de 88.2% (95% IC: 78-94). Em suma, os resultados apontam que o anticorpo teste de captura do NS1 constitui um alvo promissor quanto à detecção desta importante proteína arboviral, porém é preciso otimizar o ensaio com o propósito de aumentar a sua sensibilidade.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, Lucas Masiêro *et al.* Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253-255, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282x20160035>.

AYLLÓN, Tania *et al.* Early Evidence for Zika Virus Circulation among *Aedes aegypti* Mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1411-1412, ago. 2017. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2308.162007>.

AYRES, Constância F J *et al.* Identification of Zika virus vectors and implications for control. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 278-279, mar. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(16\)00073-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(16)00073-6).

BALMASEDA, Angel *et al.* Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 114, n. 31, p. 8384-8389, 17 jul. 2017. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1704984114>.

BASU, Rupsa *et al.* Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 6 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>.

BERTHET, Nicolas *et al.* Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 12, p. 862-865, dez. 2014. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1607>.

BEDDINGFIELD, Brandon J. *et al.* Zika Virus Non-Structural Protein 1 Antigen-Capture Immunoassay. **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1-17, 5 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v13091771>.

BOCCOLINI, Daniela *et al.* Experimental investigation of the susceptibility of Italian *Culex pipiens* mosquitoes to Zika virus infection. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 35, p. 1-3, 1 set. 2016. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.35.30328>.

BOTROS, H. Goubran *et al.* Cross- antigenicity of horse serum albumin with dog and cat albumins: study of three short peptides with significant inhibitory activity towards

specific human ige and igg antibodies. **Immunology**, v. 88, n. 3, p. 340-347, jul. 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-669.x>.

CABRAL-CASTRO, Mauro Jorge *et al.* Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal Of Clinical Virology**, v. 82, p. 108-111, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2016.07.017>.

CAMPOS, Gubio S. *et al.* Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885-1886, out. 2015. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2110.150847>.

CARPIO, Kassandra L. *et al.* Flavivirus NS1 and Its Potential in Vaccine Development. **Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 622, 9 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines9060622>.

CORDEIRO, Marli Tenório *et al.* Postnatal Imaging Findings of Congenital Zika Syndrome. **Topics In Magnetic Resonance Imaging**, v. 28, n. 2, p. 97, abr. 2019. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/rmr.0000000000000203>.

COSTA, Vivaldo G. da *et al.* A Meta-Analysis of the Diagnostic Accuracy of Two Commercial NS1 Antigen ELISA Tests for Early Dengue Virus Detection. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. 1-12, 11 abr. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094655>.

COSTA-DA-SILVA, André Luis *et al.* Laboratory strains of Aedes aegypti are competent to Brazilian Zika virus. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. 1-13, 10 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171951>.

DICK, G.W.A *et al.* Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

DIGOUTTE, J.P. *et al.* Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. **Research In Virology**, v. 143, p. 417-422, jan. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2516\(06\)80135-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0923-2516(06)80135-4).

DONALISIO, Maria Rita *et al.* Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, p. 1-6, 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006889>.

DUFFY, Mark R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal Of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 11 jun. 2009. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0805715>.

ENDALE, Aduugna *et al.* Magnitude of Antibody Cross-Reactivity in Medically Important Mosquito-Borne Flaviviruses: a systematic review. **Infection And Drug Resistance**, v. 14, p. 4291-4299, out. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/idr.s336351>.

ESSER, Peter. **Principles in Adsorption to Polystyrene**. 1998. Disponível em: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/D19559.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2022.

FAGBAMI, A. H. *et al.* Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in oyo state. **Journal Of Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 213-219, out. 1979. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0022172400025997>.

FARIA, Nuno Rodrigues *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 15 abr. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf5036>.

FAYE, Oumar *et al.* One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **Journal Of Clinical Virology**, v. 43, n. 1, p. 96-101, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2008.05.005>.

FAYE, Oumar *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 9 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>.

FAYE, Oumar *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 22 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-10-311>.

GRISCHOTT, Franca *et al.* Non-vector-borne transmission of Zika virus: a systematic review. **Travel Medicine And Infectious Disease**, v. 14, n. 4, p. 313-330, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.07.002>.

GOAT anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP. (ThermoFisher Scientific. Disponível em: https://www.thermofisher.com/order/genome-database/dataSheetPdf?producttype=antibody&productsubtype=antibody_secondary&productId=31430&version=267. Acesso em: 16 nov. 2022.

HAMEL, Rodolphe *et al.* Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes And Infection**, v. 18, n. 7-8, p. 441-449, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.009>.

HENNESSEY, Morgan *et al.* Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55-58, 29 jan. 2016. Centers for Disease Control MMWR Office. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1>.

HERRERA, Bobby Brooke *et al.* Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992–2016. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 215, n. 10, p.

1546-1550, 8 abr. 2017. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix182>.

IMPERATO, Pascal James *et al.* The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. **Journal Of Community Health**, v. 41, n. 3, p. 674-679, 11 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10900-016-0177-7>.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302-307, jul. 2014. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>.

KONISHI, Eiji *et al.* Antibodies to Bovine Serum Albumin in Human Sera: problems and solutions with casein-based elisa in the detection of natural japanese encephalitis virus infections. **Japanese Journal Of Infectious Diseases**, v. 63, n. 4, p. 296-298, 30 jul. 2010. Editorial Committee of Japanese Journal of Infectious Diseases, National Institute of Infectious Dis. <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.63.296>.

KUNO, Goro *et al.* Serodiagnosis of Flaviviral Infections and Vaccinations in Humans. **Advances In Virus Research Volume 61**, p. 3-65, 2003. Elsevier.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61001-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61001-8).

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, ago. 2008. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>.

LINDENBACH, Brett D. *et al.* Molecular biology of flaviviruses. **Advances In Virus Research**, p. 23-61, 2003. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59002-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59002-9).

LIMA, Monique da Rocha Queiroz *et al.* Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in

Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7, p. 1-7, 6 jul. 2010. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000738>.

MACIEJEWSKI, Sonia *et al.* Cross-Reactive Flavivirus Antibody: friend and foe?. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 5, p. 622-624, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.016>.

MAGALHAES, Tereza *et al.* Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1-25, 6 nov. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055>.

MANORE, Carrie A. *et al.* Defining the Risk of Zika and Chikungunya Virus Transmission in Human Population Centers of the Eastern United States. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1-19, 17 jan. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005255>.

O'REILLY, Kathleen M. *et al.* Projecting the end of the Zika virus epidemic in Latin America: a modelling analysis. **Bmc Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 3 out. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-018-1158-8>.

OEHLER, E *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 1-3, 6 mar. 2014. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720>.

OLIVEIRA, Wanderson Kleber de *et al.* Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, v. 390, n. 10097, p. 861-870, ago. 2017. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31368-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31368-5).

OLSON, J.G. *et al.* Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 75, n.

3, p. 389-393, jan. 1981. Oxford University Press (OUP).
[http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90100-0](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(81)90100-0).

OMS - Organização Mundial da Saúde. Fifth meeting of the Emergency Committee under the International Health Regulations (2005) regarding microcephaly, other neurological disorders and Zika virus, Geneva, Switzerland, nov. 2016
<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/zika-fifth-ec/en/>

OMS - Organização Mundial da Saúde. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations, Geneva, Switzerland, fev. 2016b
<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1stemergency-committee-zika/en/>

OMS - Organização Mundial da Saúde. Zika virus outbreaks in the Americas. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, n. 45, p. 609-910, nov. 2015. PMID: 26552108 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254522/WER9045_609-610.pdf

PAHO - Pan American Health Organization. Epidemiological Update: Zika virus infection. Washington, D.C. out. 2015.
<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-oct-16-cha-zika-virus-epi-update.pdf>

PAHO. Pan American Health Organization. Zika virus infection. 2016.

PATTERSON, Jessica *et al.* Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal Of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671-679, 1 nov. 2016. Western Journal of Emergency Medicine.
<http://dx.doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>.

PERGOLIZZI, Joseph *et al.* The Zika virus: lurking behind the covid :19 pandemic?. **Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics**, v. 46, n. 2, p. 267-276, 20 nov. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/jcpt.13310>.

PESSÔA, Rodrigo *et al.* Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. 1-9, mar. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000003201>.

PETERSEN, Lyle R. *et al.* Zika Virus. **New England Journal Of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 21 abr. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1602113>.

PIELNAA, Paul *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34-42, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>.

RASMUSSEN, Sonja A. *et al.* Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal Of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 19 maio 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmsr1604338>.

ROIZ, David *et al.* Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1-21, 6 dez. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006845>.

SAKAMOTO, Seiichi *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, 21 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.

SANTIAGO, Gilberto A. *et al.* Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v.

9, n. 1, p. 1-10, 11 abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03772-1>.

SCHULER-FACCINI, Lavinia *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 29 jan. 2016. Centers for Disease Control MMWR Office. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e2>.

SHARMA, Anshika *et al.* Zika Virus: transmission, detection, control, and prevention. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, p. 1232-1239, 3 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>.

SILVA, Isaura Beatriz Borges *et al.* Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, p. 1-12, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0019>.

SILVA, Isaura Beatriz Borges *et al.* Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, p. 1-12, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0019>.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da. **DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS MOLECULARES RÁPIDAS E DE BAIXO CUSTO PARA O DIAGNÓSTICO DO VÍRUS ZIKA**. 2019. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2019. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/36125>. Acesso em: 16 nov. 2022.

SIMPSON, D. I. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 58, p. 335-338, Jul. 1964. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14175744/>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

SLAVOV, S.N. *et al.* Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 49,

n. 5, p. 1-11, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20165420>.

SONG, Byung-Hak *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50-64, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.03.001>.

VIVEIROS-ROSA, Sandro G. *et al.* Vector competence of Culex mosquitoes (Diptera: culicidae) in zika virus transmission. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. 1-40, 3 fev. 2020. Pan American Health Organization. <http://dx.doi.org/10.26633/rpsp.2020.7>.

VOGT, Robert V. *et al.* Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. **Journal Of Immunological Methods**, v. 101, n. 1, p. 43-50, jun. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90214-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(87)90214-6).

WEAVER, Scott C. *et al.* Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.

XU, Hua *et al.* Serotype 1-Specific Monoclonal Antibody-Based Antigen Capture Immunoassay for Detection of Circulating Nonstructural Protein NS1: implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2872-2878, ago. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00777-06>.

YAKOB, Laith *et al.* Zika Virus after the Public Health Emergency of International Concern Period, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 837-840, abr. 2022. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2804.211949>.

YUN, Sang-Im *et al.* Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: mr-766,

p6-740, and prvabc-59. **Genome Announcements**, v. 4, n. 4, p. 1-4, 25 ago. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00800-16>.

ZANLUCA, Camila *et al.* Zika virus – an overview. **Microbes And Infection**, v. 18, n. 5, p. 295-301, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.003>.

ZHAO, Ling-Zhai *et al.* Kinetics of antigen-specific IgM/IgG/IgA antibody responses during Zika virus natural infection in two patients. **Journal Of Medical Virology**, v. 91, n. 5, p. 872-876, 17 dez. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25366>.