

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA ZANLUCA

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE
VÍRUS DOS GÊNEROS *FLAVIVIRUS* E *ALPHAVIRUS*

CURITIBA

2015

CAMILA ZANLUCA

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE
VÍRUS DOS GÊNEROS *FLAVIVIRUS* E *ALPHAVIRUS*

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do título de doutora em Biologia Celular e Molecular,
no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Zanluca, Camila

Padronização de ensaio imunoenzimático para diagnóstico de vírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*. / Camila Zanluca. – Curitiba, 2015.
195 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Claudia Nunes Duarte dos Santos

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Vírus Chikungunya 2. Vírus da dengue 3. Vírus da Encefalite de St. Louis 4. Vírus do Nilo Ocidental 4. Técnicas imunoenzimáticas I. Título II. Santos, Claudia Nunes Duarte dos III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 576.64
616.0756

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

[Handwritten signature]
Profa. Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos
Orientadora e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC

[Handwritten signature]
Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

[Handwritten signature]
Profa. Dra. Sônia Mara Raboni
Universidade Federal do Paraná - UFPR

[Handwritten signature]
Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

[Handwritten signature]
Prof. Dr. Luiz Felipe Caron
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin
Instituto Carlos Chaves - ICC

Profa. Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a candidata **Camila Zanluca**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Padronização de ensaio imunoenzimático para diagnóstico de vírus dos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus*", são de parecer favorável à *[Handwritten initials]* da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 09 de Fevereiro de 2015



[Handwritten signature]
Prof. Dr. Ciro A Oliveira Ribeiro
Depto. Biologia Celular / UFPR
Mat. Siape 0342961

Com todo amor,
a meus pais, Neuza e Gilberto,
e a meus irmãos, Izabela e Junior,
que são meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pelo apoio e acompanhamento do estudo e por toda confiança que tem depositado em mim.

Aos colegas do Laboratório de Virologia Molecular, pelo convívio cotidiano e pelas sugestões e colaborações no desenvolvimento dos trabalhos realizados. Em especial, agradeço à Ana, à Andrea, à Andreia, ao Giovanni, ao Juliano, ao Mateus e à Taissa pela ajuda em diferentes etapas durante a realização deste trabalho, principalmente nestes últimos meses.

Aos demais alunos e funcionários do Instituto Carlos Chagas, pela convivência e auxílio sempre que necessário, em especial ao pessoal do preparo de materiais pela grande ajuda concedida.

À Dra. Marta Contigiani por me receber de braços abertos e dar a oportunidade de realizar parte dos experimentos deste trabalho em seu laboratório. Aos demais membros do Instituto de Virología Dr. José María Vanella, em especial do Laboratório de Arbovírus, pela ajuda profissional e pela agradável convivência durante os quatro meses que estive em Córdoba. Um agradecimento especial aos amigos Sebastián, Maurício, Laura, Gonzalo e Agustín por todo o companheirismo e amizade, seja no laboratório ou no “bar de los miércoles”. À Laura e ao Seba agradeço ainda por toda a ajuda que deram durante minha adaptação à vida em Córdoba e com todos os problemas burocráticos que surgiram; sem essa ajuda tudo teria sido muito mais difícil.

À Dra. Marta Contigiani, à Dra. Lorena Spinsanti, ao LACEN/PR, ao Instituto Pasteur da Guiana e ao Instituto Pasteur de Paris por disponibilizarem amostras preciosas para o desenvolvimento deste trabalho. E ao Dr. Pablo Vásquez e à Dra. Monica Mathor do IPEN pelo auxílio na inativação dos vírus da dengue.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Carlos R. Zanetti, Dra. Sonia M. Raboni, Dr. Luiz Felipe Caron, Dra. Magda C. V. C. Ribeiro, Dr. Nilson I. T. Zanchin e Dra. Tatiana A. C. Brasil de Souza, pela disponibilidade e dedicação nas correções deste trabalho.

Aos servidores e professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR, pela oportunidade e pela ajuda nas questões burocráticas.

Ao CNPq, à CAPES, à Fiocruz e à Fundação Araucária pelo financiamento.

Um agradecimento mais que especial aos meus pais, Neuza e Gilberto, aos meus irmãos, Izabela e Junior, e à minha vó Maria, pelo amor incondicional que me conforta e por todo incentivo que me encoraja a não desistir de meus objetivos. Agradeço também ao Marcelo, pelo amor e companheirismo; por sua paciência, dedicação e carinho, que têm me trazido um pouco de paz diante da correria do dia a dia.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, a minha sincera gratidão.

Muito obrigada,

Camila Karluca

“Se você não erra,
provavelmente não está trabalhando
em problemas suficientemente desafiadores.
E isto sim é um grande erro”.
Frank Wilczek (Prêmio Nobel de Física – 2004)

RESUMO

Os flavivírus e alfavírus são vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) e representam um problema de saúde pública em vários países. A emergência e re-emergência dos arbovírus são fenômenos naturais relacionados à evolução e adaptação desses vírus. O Brasil, por ter grandes áreas recobertas por florestas tropicais, possui condições ideais para a ocorrência e manutenção do ciclo silvestre de diversas arbovirose. A crescente urbanização, o fluxo migratório, a destruição de *habitats* naturais e a presença de mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* favorecem a rápida disseminação desses vírus. Além disso, os sintomas iniciais das infecções causadas por esses vírus são semelhantes a outras infecções que ocorrem em diversas regiões do Brasil e não existe tratamento específico para essas viroses, nem vacina licenciada para uso humano. O diagnóstico laboratorial diferencial, portanto, é fundamental para o correto manejo clínico dos pacientes. Assim, este trabalho teve por objetivo padronizar ensaios imunoenzimáticos para o diagnóstico sorológico do vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente ao gênero *Alphavirus*, e dos vírus da dengue (DENV), da encefalite de Saint Louis (SLEV) e do oeste do Nilo (WNV), pertencentes ao gênero *Flavivirus*. Para tanto, as proteínas E1 e E2 do CHIKV foram expressas em células S2 de *Drosophila melanogaster* e purificadas por cromatografia de afinidade. A proteína E2 (denominada rE2-CHIKV) apresentou melhores resultados durante sua expressão e purificação e foi selecionada para dar prosseguimento ao trabalho. Foram então gerados três hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcM) contra esta proteína, os quais foram caracterizados como sendo do isotipo IgG1k. Nenhum dos AcM reconheceu os vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), SLEV, WNV e DENV sorotipos 1 a 4. Foi padronizado um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV como antígeno para a detecção de IgM anti-CHIKV, o qual apresentou sensibilidade de 70% e especificidade de 97% para o painel de amostras utilizado. Apesar da baixa sensibilidade, esses valores são comparáveis aos dos testes disponíveis comercialmente. O segundo vírus abordado nesse trabalho foi o vírus da dengue. Foram obtidos 22 AcM produzidos contra isolados brasileiros de DENV-1, -2 e -3. Os AcM são dos isotipos IgG2bk, IgG2ak e IgG1k, a maioria com especificidade para as proteínas de envelope ou pré-membrana do DENV. Quando testados contra os quatro sorotipos de DENV, diferentes padrões de reatividade foram identificados: grupo-específico, subcomplexo-específico (DENV-1, -3 e -4 ou DENV-2 e -3) e sorotipo-específico (DENV-2 ou -3). Além disso, alguns AcM apresentaram reatividade cruzada com vírus da febre amarela, WNV e SLEV, mas nenhum deles reconheceu o alfavírus VEEV. De acordo com nossos conhecimentos, esses são os primeiros AcM produzidos contra isolados brasileiros de DENV. O AcM denominado D3 424/8G, que apresentou reatividade com todos os flavivírus testados, foi conjugado com peroxidase e utilizado no desenvolvimento de um ensaio do tipo MAC-ELISA para detecção de IgM anti-DENV no soro de pacientes com infecção aguda por DENV. Como antígeno, foi utilizada uma mistura de DENV dos quatro sorotipos, produzidos em cultivo celular, purificados por colchão de sacarose e inativados por radiação gama. O ensaio apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 95% com as amostras testadas. No caso do SLEV, foram produzidas partículas-tipo vírus (VLP) em células HEK 293T. As SLEV_VLPs, juntamente com o AcM D3 424/8G-HRP, foram utilizadas em um ensaio do tipo MAC-ELISA para diagnóstico de infecção aguda causada por SLEV. O teste desenvolvido apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 98% com o painel de amostras utilizado. Por fim, foram produzidas

VLPs de WNV em células HEK 293T, as quais foram utilizadas na padronização de um ensaio do tipo MAC-ELISA para diagnóstico de infecção por WNV. Como conjugado, também foi utilizado o AcM D3 424/8G-HRP. No decorrer do trabalho, no entanto, foi obtida apenas uma amostra de soro de indivíduo com infecção aguda por WNV. Por isso, não foi possível calcular os valores de sensibilidade e especificidade do teste desenvolvido. Os insumos produzidos neste trabalho e os testes padronizados mostraram-se importantes ferramentas para serem utilizadas no diagnóstico dos vírus CHIKV, DENV, SLEV e WNV, além de poderem ser utilizados em pesquisa básica.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya. Vírus da dengue. Vírus da encefalite de Saint Louis. Vírus do oeste do Nilo. Proteínas recombinantes. Partículas-tipo vírus. Anticorpos monoclonais. Ensaio imunoenzimático. Diagnóstico.

ABSTRACT

The flavivirus and alphavirus are viruses transmitted by arthropods (arboviruses), which constitute a public health problem in many countries. The emergence and reemergence of arboviruses are natural phenomena related to species evolution and adaptation. Brazil has large areas covered by tropical forests, which provide ideal conditions for the existence and maintenance of the sylvatic cycle of many arboviruses. Increasing urbanization, migration, the destruction of natural habitats and the wide distribution of *Culex* and *Aedes* mosquitoes favor the rapid spread of these viruses. Furthermore, the initial symptoms of infections caused by these viruses are similar to other infections that occur in different regions of Brazil and there is no specific treatment for these viruses, nor licensed vaccine for human use. Laboratory differential diagnosis is therefore essential for the correct clinical management of patients. Therefore, this study aimed to develop enzyme immunoassays for the diagnosis of Chikungunya virus (CHIKV), belonging to the genus *Alphavirus*, and for the diagnosis of dengue virus (DENV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) and West Nile virus (WNV), belonging to the genus *Flavivirus*. For this, CHIKV E1 and E2 proteins were expressed in *Drosophila melanogaster* S2 cells and were purified by affinity chromatography. The E2 protein (named rE2-CHIKV) showed better results of expression and purification and was selected to continue the work. Three hybridomas secreting monoclonal antibodies (MAbs) against rE2-CHIKV were obtained. The MAbs were characterized as IgG1k isotype. None of the MAbs recognized the Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), SLEV, WNV and DENV serotypes 1 to 4. It was standardized an indirect ELISA for the detection of IgM anti-CHIKV using rE2-CHIKV as antigen, which had a sensitivity of 70% and specificity of 97%. Despite the low sensitivity, these values are comparable to those of commercially available tests. The second virus in this work was the dengue virus. Twenty two MAbs against Brazilian isolates of DENV-1, -2 and -3 were obtained. The MAbs include IgG2bk, IgG2ak and IgG1k isotypes, and most were raised against the envelope or the pre-membrane proteins of DENV. When the antibodies were tested against the four DENV serotypes, different reactivity patterns were identified: group-specific, subcomplex specific (DENV-1, -3 and -4 and DENV-2 and -3) and dengue serotype-specific (DENV-2 or -3). Additionally, some MAbs cross-reacted with yellow fever virus, WNV and SLEV. None of the MAbs recognized the alphavirus VEEV. To our knowledge, these are the first MAbs raised against Brazilian DENV isolates. The MAb D3 424/8G, which cross-reacted with all the flaviviruses tested, was conjugated to peroxidase and used to the development of a MAC-ELISA for detection of anti-DENV IgM in sera from patients with acute dengue. As antigen, we used a mixture of DENV particles serotypes 1 to 4, produced in cell culture, purified by sucrose cushion and inactivated by gamma radiation. The test had a sensitivity of 91% and a specificity of 95%. For SLEV, virus-like particles (VLPs) were produced in HEK 293T cells. The SLE_VLP together with the MAb D3 424/8G-HRP were used in the development of a MAC-ELISA for the diagnosis of acute infection caused by SLEV. The assay showed sensitivity of 95% and specificity of 98%. Finally, WNV VLP were produced in HEK 293T cells, and were used for standardizing a MAC-ELISA for the diagnosis of WNV infection. As conjugate it was also used MAb D3 424/8G-HRP. During the study, however, only one serum sample from patient with acute WNV infection was obtained. Therefore, it was not possible to calculate the sensitivity and the specificity of the test developed. The reagents produced and the diagnostic assays developed here have proved to be

important tools to be used in the diagnosis of CHIKV, DENV, SLEV and WNV, and can be used for basic research.

Keywords: Chikungunya virus. Dengue virus. Saint Louis encephalitis virus. West Nile virus. Recombinant proteins. Virus like particles. Monoclonal antibodies. Enzyme immunoassays. Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do genoma de um alfavírus, com seus quatro genes não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco genes estruturais (C, E3, E2, 6K e E1).	29
Figura 2 – Estrutura de uma partícula madura de alfavírus.	29
Figura 3 – Representação esquemática das principais etapas do ciclo de infecção e replicação de um alfavírus.....	32
Figura 4 – Distribuição do vírus Chikungunya no mundo.	35
Figura 5 – Países da América com transmissão autóctone (em roxo) ou com casos importados (com estrela) de chikungunya em 20 de março de 2015.	36
Figura 6 – Ciclos de transmissão do vírus Chikungunya demonstrando os principais vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos.	37
Figura 7 – Representação esquemática da patogênese do vírus Chikungunya.....	40
Figura 8 – Organização do genoma dos Flavivirus e seu transcrito proteico.	44
Figura 9 – Estrutura de uma partícula madura de um flavivírus.	45
Figura 10 – Representação esquemática das principais etapas do ciclo de infecção e replicação de um flavivírus.	47
Figura 11 – Países e áreas com risco de transmissão de dengue.	48
Figura 12 – Número de casos de dengue (barras azuis) e de óbitos por febre hemorrágica da dengue (linha vermelha) no Brasil nos anos de 1990 a 2013.	51
Figura 13 – Ciclos de transmissão do vírus da dengue demonstrando os principais vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos.	52
Figura 14 – Progressão da dengue.	53
Figura 15 – Janela de detecção aproximada dos testes para diagnóstico de dengue.	57
Figura 16 – Distribuição do vírus do oeste do Nilo (verde), do vírus da encefalite de Saint Louis (amarelo) e do vírus da encefalite japonesa (JEV – vermelho) no mundo.	60
Figura 17 – Distribuição do vírus do oeste do Nilo no continente americano desde sua introdução nos Estados Unidos em 1999.	63

Figura 18 – Ciclo de transmissão do vírus do oeste do Nilo (WNV) e do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV).....	64
Figura 19 – Cinética de viremia e produção de anticorpos em uma infecção pelo vírus do oeste do Nilo.....	68
Figura 20 – Mapa dos plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV, gerados por meio da clonagem dos genes sintéticos E1 e E2 do CHIKV, respectivamente, no vetor pMt/Bip/V5-His A.	82
Figura 21 – Segmento do plasmídeo pMt/Bip/V5-His A destacando (em vermelho) os sítios de ligação dos iniciadores MT <i>Forward</i> e BGH <i>Reverse</i>	83
Figura 22 – Esquema da construção do gene codificante para partículas-tipo-vírus de SLEV (SLE_VLP).	102
Figura 23 – Mapa do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP, gerado por meio da clonagem do gene sintético SLE_VLP no vetor pcDNA TM 3.1/V5-His TOPO [®]	103
Figura 24 – Segmento do plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO [®] destacando (em vermelho) os sítios de ligação dos iniciadores T7 <i>Promoter</i> e BGH <i>Reverse</i>	104
Figura 25 – Esquema da construção do gene codificante para partículas-tipo-vírus de WNV (WN_VLP).....	108
Figura 26 – Mapa do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP, gerado por meio da clonagem do gene sintético WN_VLP no vetor pcDNA TM 3.1/V5-His TOPO [®]	108
Figura 27 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pMt/Bip/V5-His A (1-3) e dos fragmentos de DNA codificantes para o ectodomínio das proteínas E1 (4-6) e E2 (7-9) do CHIKV em pUC57 e após digestão com as enzimas de restrição BglII e XhoI.	111
Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pMt/Bip/V5-His A (1) e dos fragmentos de DNA codificantes para o ectodomínio das proteínas E1 (2) e E2 (3) do CHIKV purificados após digestão com as enzimas de restrição BglII e XhoI.	111
Figura 29 – Triagem dos potenciais clones contendo os plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV pela técnica de palitagem.	112

Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio dos plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV digeridos com as enzimas BgIII e XhoI para confirmar a presença dos insertos de interesse.....	113
Figura 31 – Análise da expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV em diferentes tempos de indução e de recolhimento após a transfecção.	114
Figura 32 – Análise da expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV após indução da expressão proteica com diferentes concentrações de CuSO ₄	114
Figura 33 – Análise da purificação de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV a partir do lisado celular e do meio de cultivo (sobrenadante).....	116
Figura 34 – Análise da purificação de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV a partir do lisado celular e do meio de cultivo de células cultivadas em meio SF-900II.....	117
Figura 35 – Reatividade dos anticorpos monoclonais com a proteína rE2-CHIKV por imunofluorescência indireta em células S2/E2-CHIKV.....	119
Figura 36 – Reatividade dos AcM com a proteína rE2-CHIKV por <i>western blot</i>	119
Figura 37 – Reatividade dos anticorpos monoclonais 1G1, 3A12 e 12A6 com VEEV, WNV, SLEV e DENV 1-4.....	121
Figura 38 – Reatividade da proteína CHIK.sE2-SNAP pelos AcM anti-rE2-CHIKV por <i>western blot</i>	121
Figura 39 – Resultado dos soros negativos para CHIKV no ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV (A) e a CHIK.sE2-SNAP (B) como antígeno.	122
Figura 40 – Resultado do ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV (A) e a CHIK.sE2-SNAP (B) como antígeno.	123
Figura 41 – Resultado do ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV como antígeno para os soros de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas (negativos) e com infecções agudas não causadas por CHIKV.....	124
Figura 42 – <i>Western blot</i> dos AcM contra o sorotipo de DENV homólogo.	127
Figura 43 – <i>Western blot</i> dos AcM D2 332/2D, D2 658/9A e D2 646/9G contra o peptídeo correspondente ao domínio III da proteína E de DENV-2 produzida em <i>E. coli</i>	128
Figura 44 – Representação dos principais grupos de reatividade dos anticorpos monoclonais contra os quatro sorotipos de DENV.	130
Figura 45 – Reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais D3 424/8G e D3 863/G7/H7 com WNV, YFV e SLEV.	131

Figura 46 – Aplicação de anticorpos monoclonais no desenvolvimento de MAC-ELISA.	133
Figura 47 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-DENV.	134
Figura 48 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed (Biotium) do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO e do fragmento de DNA codificante para VLP de SLEV em pUC57 antes e após digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstBI.	135
Figura 49 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed (Biotium) do fragmento de DNA codificante para VLP de SLEV (1) e do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO (2) purificados após digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstBI.	136
Figura 50 – Triagem dos potenciais clones contendo o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP por PCR de colônia.	137
Figura 51 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio dos plasmídeos obtidos a partir dos clones 5 e 8 digeridos com as enzimas BamHI e BstBI para verificar a presença do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP.	137
Figura 52 – Expressão de SLE_VLP por células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP.	138
Figura 53 – Análise da obtenção de SLE_VLP após concentração por precipitação com PEG 8000 e NaCl.	138
Figura 54 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-SLEV.	139
Figura 55 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO e do fragmento de DNA codificante para VLP de WNV em pUC57 antes e após digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI.	140
Figura 56 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do fragmento de DNA codificante para VLP de WNV (1) e do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO (2) purificados após digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI.	141
Figura 57 – Triagem dos potenciais clones contendo o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP pela técnica de palitagem.	141
Figura 58 – Expressão de WN_VLP por células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP.	142

Figura 59 – Análise da obtenção de WN_VLP após concentração por precipitação com PEG 8000 e NaCl.	142
Figura 60 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-WNV	143

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-DENV	101
TABELA 2 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-SLEV	107
TABELA 3 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-WNV.....	109
TABELA 5 – QUANTIDADE DE PROTEÍNA PRESENTE NAS AMOSTRAS DE VÍRUS DA DENGUE INATIVADAS POR RADIAÇÃO GAMA.	125
TABELA 6 – DESIGNAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL (ACM) E CARACTERIZAÇÃO DE SEU ISOTIPO, REATIVIDADE CONTRA OS QUATRO SOROTIPOS DE DENV E ESPECIFICIDADE CONTRA A PROTEÍNA VIRAL.....	126
TABELA 7 – REATIVIDADE POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA DENV-3 COM A PROTEÍNA E Δ_{101} DE DENV-3 EXPRESSA POR CÉLULAS S2	129
TABELA 8 – REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-DENV CONTRA YFV, SLEV, WNV E VEEV	132

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – aminoácidos

AcM – anticorpos monoclonais

ADE – anticorpos potencializadores da infecção (do inglês *antibody-dependent enhancement*)

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*

BCIP – *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*

BSA – soro albumina bovina

C – proteína de capsídeo

CHIKV – vírus chikungunya (do inglês *Chikungunya virus*). Em português pode também ser referido como vírus chicungunha ou catolotolo (na Angola).

CMV – citomegalovírus

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DENV – vírus da dengue (do inglês *Dengue virus*)

DMEM F12 – meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F12

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

E, E1 e E2 – proteínas de envelope

EBV – vírus Epstein-Barr (do inglês *Epstein-Barr virus*)

ECSA – linhagem Leste/Central/Sul Africana do vírus Chikungunya

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio enzimático por imunoabsorção (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FD – febre da dengue

ffu – unidade formadora de foco

FHD – febre hemorrágica da dengue

g – força centrífuga

HAT – hipoxantina, aminopterina, timidina

HGPRT – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

HRP – *horseradish peroxidase*

HT – hipoxantina, timidina

ICTV – do inglês *International Committee on Taxonomy Viruses*

IFI – imunofluorescência indireta
IFN – interferon
IOL – linhagem do Oceano Índico do vírus Chikungunya (do inglês *Indian Ocean lineage*)
JEV – vírus da encefalite japonesa (do inglês *Japanese encephalitis virus*)
LB – meio Luria Bertani
m – massa
M – proteína de membrana
MAC-ELISA – ELISA de captura de IgM
MOCK – controle negativo de infecção
MOI – multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*)
NB3 – nível de biossegurança 3
NBT – *nitroblue tetrazolium*
NCR – regiões não codificantes
NS1 – proteína não estrutural 1
ORF – fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)
PBS – solução salina tamponada (do inglês *phosphate buffered saline*)
PBS-T – PBS contendo 0,05% de Tween 20
PEG – polietilenoglicol
prM – proteína pré-membrana
PRNT – teste de neutralização por unidades formadoras de placa (do inglês *plaque reduction neutralization test*)
qRT-PCR – RT-PCR quantitativa
RE – retículo endoplasmático
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
rpm – rotação por minuto
RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR – reação em cadeia de polimerase associada à transcrição reversa
SBF – soro bovino fetal
SCD – síndrome de choque da dengue
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
SLEV – vírus da encefalite de Saint Louis (do inglês *Saint Louis encephalitis virus*)

SNC – sistema nervoso central

SV40 – do inglês *Simian vacuolating virus 40*

TBS – tampão tris

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

v – volume

VDRL – do inglês *venereal disease research laboratory*

VEEV – vírus da encefalite equina venezuelana (do inglês *Venezuelan equine encephalitis virus*)

VLP – partículas-tipo-vírus (do inglês *virus like particles*)

WNV – vírus do oeste do Nilo (do inglês *West Nile virus*)

YFV – vírus da febre amarela (do inglês *Yellow fever virus*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	JUSTIFICATIVA	26
1.2	OBJETIVOS	27
1.2.1	Objetivo Geral	27
1.2.2	Objetivos Específicos	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1	<i>ALPHAVIRUS</i>	28
2.1.1	Classificação, Estrutura e Replicação	28
2.1.2	Vírus Chikungunya	33
2.1.2.1	Histórico	33
2.1.2.2	Ciclos de Transmissão	36
2.1.2.3	Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção	38
2.1.2.4	Diagnóstico	41
2.2	<i>FLAVIVIRUS</i>	42
2.2.1	Classificação, Estrutura e Replicação	42
2.2.2	Vírus da Dengue	48
2.2.2.1	Histórico	48
2.2.2.2	Ciclos de Transmissão	51
2.2.2.3	Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção	53
2.2.2.4	Diagnóstico	56
2.2.3	Vírus da Encefalite de Saint Louis e Vírus do Oeste do Nilo	59
2.2.3.1	Vírus da Encefalite de Saint Louis – Histórico	59
2.2.3.2	Vírus do Oeste do Nilo – Histórico	61
2.2.3.3	Ciclos de Transmissão	64
2.2.3.4	Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção	66
2.2.3.5	Diagnóstico	69
3	MATERIAL E MÉTODOS	72
3.1	SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIOS DE CULTURA	72
3.2	LINHAGENS CELULARES E BACTERIANAS	73
3.3	VÍRUS	75
3.4	TÉCNICAS GERAIS	76

3.4.1	Transformação de Bactérias Quimiocompetentes	76
3.4.2	Seleção de Clones Bacterianos	76
3.4.2.1	Técnica de Palitagem	77
3.4.2.2	PCR de Colônia.....	77
3.4.3	Estocagem e Purificação de Plasmídeos	78
3.4.4	Análise de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e <i>Western blot</i>	78
3.4.5	Criopreservação de Linhagens Celulares	79
3.4.6	Imunofluorescência Indireta.....	80
3.5	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	80
3.5.1	Expressão das Proteínas Recombinantes E1 e E2 de CHIKV em Células S2 de <i>Drosophila melanogaster</i>	80
3.5.1.1	Construção dos Vetores de Expressão	80
3.5.1.2	Transfecção Transitória de Células S2 com os Plasmídeos Recombinantes.....	84
3.5.1.3	Padronização da Expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV em Células S2.....	85
3.5.1.4	Geração de Linhagens Estáveis de Células S2 Transfectadas.....	85
3.5.1.5	Purificação das Proteínas Recombinantes.....	86
3.5.2	Imunização de Camundongos com a Proteína rE2-CHIKV	87
3.5.3	Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra a rE2-CHIKV	88
3.5.3.1	Obtenção dos Esplenócitos	88
3.5.3.2	Células de Mieloma	89
3.5.3.3	Fusão de Esplenócitos com Células de Mieloma para a Geração de Hibridomas	89
3.5.3.4	Seleção dos Hibridomas.....	90
3.5.3.5	Triagem dos Hibridomas Secretores de Anticorpos Anti-rE2-CHIKV	90
3.5.3.6	Clonagem dos Hibridomas por Diluição Limitante	91
3.5.3.7	Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais	92
3.5.3.8	Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com a Proteína rE2-CHIKV	92
3.5.3.9	Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com Alfavírus VEEV e com Diferentes Flavivírus.....	93

3.5.4	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-CHIKV	93
3.6	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA DENGUE	95
3.6.1	Produção do Antígeno Viral	95
3.6.2	Caracterização de Anticorpos Monoclonais Anti-DENV	96
3.6.2.1	Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais	97
3.6.2.2	Determinação da Especificidade dos Anticorpos Monoclonais para as Proteínas de DENV	97
3.6.2.3	Determinação da Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com os Quatro Sorotipos de DENV e Outros Flavivírus e Alfavírus.....	98
3.6.3	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-DENV	99
3.6.3.1	Purificação de Anticorpos Monoclonais e Conjugação com Peroxidase ..	99
3.6.3.2	Padronização de Ensaio Tipo ELISA para Detecção de IgM anti-DENV	100
3.7	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS.....	101
3.7.1	Produção de Partículas-Tipo-Vírus do SLEV (SLE_VLP) em Células HEK 293T.....	101
3.7.1.1	Transfecção de Células HEK 293T Mediada por Lipossomos	104
3.7.1.2	Obtenção de VLP de SLEV (SLE_VLP)	105
3.7.2	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-SLEV	105
3.8	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO.....	107
3.8.1	Produção de Partículas-Tipo-Vírus do WNV (WN_VLP) em Células HEK 293T.....	107
3.8.2	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-WNV	109
4	RESULTADOS.....	110
4.1	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	110

4.1.1	Expressão das Proteínas Recombinantes E1 e E2 de CHIKV em Células S2	110
4.1.2	Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra o CHIKV	118
4.1.3	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-CHIKV	121
4.2	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA DENGUE	124
4.2.1	Produção do Antígeno Viral	124
4.2.2	Caracterização de Anticorpos Monoclonais Anti-DENV	125
4.2.2.1	Determinação da Especificidade dos Anticorpos Monoclonais para as Proteínas de DENV	126
4.2.2.2	Determinação da Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com os Quatro Sorotipos de DENV e Outros Flavivirus e Alphavirus	129
4.2.3	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-DENV	132
4.3	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS	134
4.3.1	Produção de Partículas-Tipo-Vírus do SLEV (SLE_VLP) em Células HEK 293T.....	134
4.3.2	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-SLEV	139
4.4	PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO.....	140
4.4.1	Produção de Partículas-Tipo-Vírus do WNV (WN_VLP) em Células HEK 293T.....	140
4.4.2	Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-WNV	143
5	DISCUSSÃO	144
5.1	VÍRUS CHIKUNGUNYA	145
5.2	VÍRUS DA DENGUE	150
5.3	VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS E VÍRUS DO OESTE DO NILO	154

6	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	159
7	CONCLUSÕES	161
8	PERSPECTIVAS.....	162
	REFERÊNCIAS.....	163
	APÊNDICE.....	183

1 INTRODUÇÃO

Os vírus pertencentes aos gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* são arbovírus (*arthropod-borne viruses*), ou seja, são vírus transmitidos a vertebrados através da picada de artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos) infectados, produzindo doença em humanos e outros animais (HAMMON; REEVES; GRAY, 1943; WEAVER; REISEN, 2010). Normalmente, humanos e animais domésticos constituem hospedeiros finais, devido à baixa viremia que apresentam, com quantidade de vírus insuficiente para infectar um vetor artrópode e manter um ciclo de transmissão. Mutações em alguns arbovírus, no entanto, têm resultado em alta viremia em animais domésticos, como é o caso do vírus da encefalite equina venezuelana, e até em humanos, como no caso dos vírus da dengue (DENV), da febre amarela (YFV – do inglês *Yellow Fever virus*) e Chikungunya (CHIKV) (WEAVER; BARRETT, 2004).

Muitas infecções por arbovírus são assintomáticas ou apresentam sintomas semelhantes à gripe. Porém, alguns arbovírus pertencentes aos gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus* podem causar doenças graves, com artralgias prolongadas ou complicações neurológicas severas e até levar à morte (HOLLIDGE; GONZALEZ-SCARANO; SOLDAN, 2010).

A emergência e re-emergência dos arbovírus são fenômenos naturais relacionados à evolução e adaptação das espécies. Durante a infecção de distintos organismos, cepas mais virulentas e melhor adaptadas dos vírus podem ser selecionadas. Esses vírus, por possuírem genoma de RNA, apresentam uma frequência de mutação bastante alta, devido às altas taxas de erros da RNA-polimerase RNA dependente e à recombinação que pode ocorrer se o animal for infectado simultaneamente por mais de um vírus do mesmo gênero. Além disso, mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência do vetor, criar novos reservatórios e induzir os vírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. A existência de cidades populosas e infestadas por mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes* é um fator de risco para a emergência de novos arbovírus no Brasil (FIGUEIREDO, 2007).

O Brasil, por ser um país tropical de grande extensão territorial, com grandes áreas recobertas por florestas tropicais e outros ecossistemas naturais, tem condições ideais para a ocorrência de diversas arboviroses (FIGUEIREDO, 2007). Entre os

arbovírus de importância médica podemos destacar o vírus da dengue, o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV – do inglês *Saint Louis Encephalitis virus*) e o vírus do oeste do Nilo (WNV – do inglês *West Nile virus*), pertencentes ao gênero *Flavivirus*, e o vírus Chikungunya, pertencente ao gênero *Alphavirus*. O DENV tem causado grandes epidemias no Brasil, enquanto o SLEV e o WNV foram identificados em casos esporádicos (BRASIL, 2014a; FIGUEIREDO, 2000). O CHIKV foi introduzido no Brasil recentemente e vem se disseminando rapidamente pelo país (BRASIL, 2014b).

1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando-se a importância da dengue para a saúde pública no Brasil, a recente introdução com rápida disseminação do CHIKV e o potencial risco de emergência do SLEV e do WNV no Brasil, é fundamental que se tenham disponíveis testes diagnósticos rápidos, inequívocos e de baixo custo. Além disso, não existem fármacos antivirais específicos para tratamento destas viroses, há grande semelhança dos sintomas iniciais dessas doenças entre si e com uma série de outras infecções e, até o momento, não existe nenhuma vacina licenciada para uso humano disponível e as medidas preventivas consistem principalmente na proteção individual contra a picada de mosquitos e no controle dos vetores.

Assim sendo, a produção de antígenos dos vírus DENV, SLEV, WNV e CHIKV circulantes no Brasil e/ou nos demais países da América do Sul, a produção de anticorpos monoclonais contra estes vírus e a subsequente padronização de ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico destas viroses são de grande valia. Estes insumos podem contribuir para aumentar a habilidade de detectar e confirmar casos suspeitos, além de garantir uma maior independência tecnológica para o país. A rapidez no diagnóstico destas doenças poderá reduzir a mortalidade associada e ajudar no direcionamento de estratégias para controle da infecção durante eventuais surtos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver insumos e padronizar ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico sorológico dos vírus Chikungunya, da dengue, da encefalite de Saint Louis e do oeste do Nilo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Expressar as proteínas E1 e E2 do CHIKV em células S2 de *Drosophila melanogaster* e purificá-las por cromatografia de afinidade;
- Purificar partículas virais de DENV sorotipos 1 a 4 e estabelecer os parâmetros para sua inativação por radiação gama;
- Expressar partículas-tipo-vírus (VLP) do SLEV e do WNV em células de mamífero;
- Produzir e/ou caracterizar anticorpos monoclonais que reconheçam os vírus supracitados;
- Padronizar ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos do tipo IgM contra estes vírus em amostras de soro humano utilizando os insumos desenvolvidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALPHAVIRUS

2.1.1 Classificação, Estrutura e Replicação

O gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*) inclui 29 espécies de arbovírus, que podem ser divididas em oito complexos antigênicos: da encefalite equina do Leste, do Oeste e Venezuelana, Trocara, Middelburg, Ndumu, Semliki Forest e Barmah Forest; além de duas espécies que não são incluídas nesta classificação (GOULD et al., 2010; INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2014).

Os alfavírus classicamente têm sido descritos como vírus do “Velho Mundo” ou do “Novo Mundo”, dependendo da sua distribuição geográfica, embora algumas trocas, mediadas por aves, por exemplo, provavelmente tenham ocorrido. Mais frequentemente, os vírus do “Velho Mundo” causam sintomas clínicos como febre, *rash* e artrite, enquanto os do “Novo Mundo” podem culminar em encefalite (GRIFFIN, 2013; POWERS et al., 2001). Recentemente, no entanto, tem sido vivenciada a disseminação do vírus Chikungunya, originalmente do “Velho Mundo”, para as Américas (CASSADOU et al., 2014).

Os alfavírus são vírus envelopados com aparência esférica e 60-70 nm de diâmetro. Seu genoma é composto por RNA simples-fita de polaridade positiva, com 11 a 12 kb de comprimento. O genoma é dividido em duas fases abertas de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*), que codificam para quatro proteínas não estruturais, envolvidas na replicação e patogênese virais, e cinco proteínas estruturais que compõem o vírion (Figura 1) (GRIFFIN, 2013).

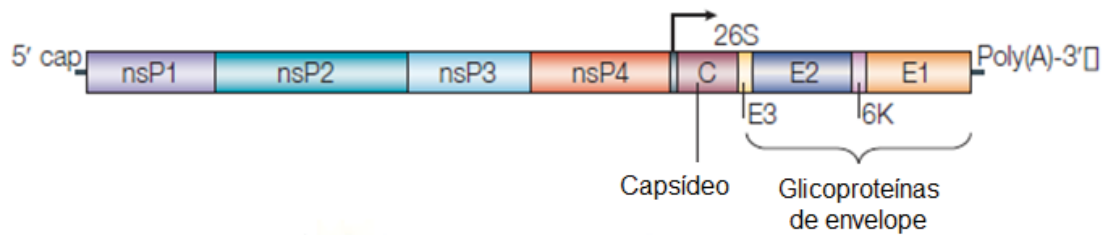


Figura 1 – Representação esquemática do genoma de um alfavírus, com seus quatro genes não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco genes estruturais (C, E3, E2, 6K e E1). As proteínas estruturais são traduzidas a partir do RNA mensageiro subgenômico 26S. FONTE: Adaptado de WEAVER e BARRETT (2004).

As partículas virais são organizadas estruturalmente em um nucleocapsídeo icosaédrico ($T=4$) envolto por um envelope lipoproteico. O nucleocapsídeo é formado por monômeros de proteína do capsídeo (C) associados ao RNA genômico, enquanto o envelope é composto por uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira associada às glicoproteínas de envelope E1 e E2 (Figura 2). Ambas E1 e E2 são proteínas com uma α -hélice que atravessa a bicamada lipídica e associadas formam heterodímeros que se agrupam em trímeros para formar 80 espículas projetadas na superfície do vírion (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

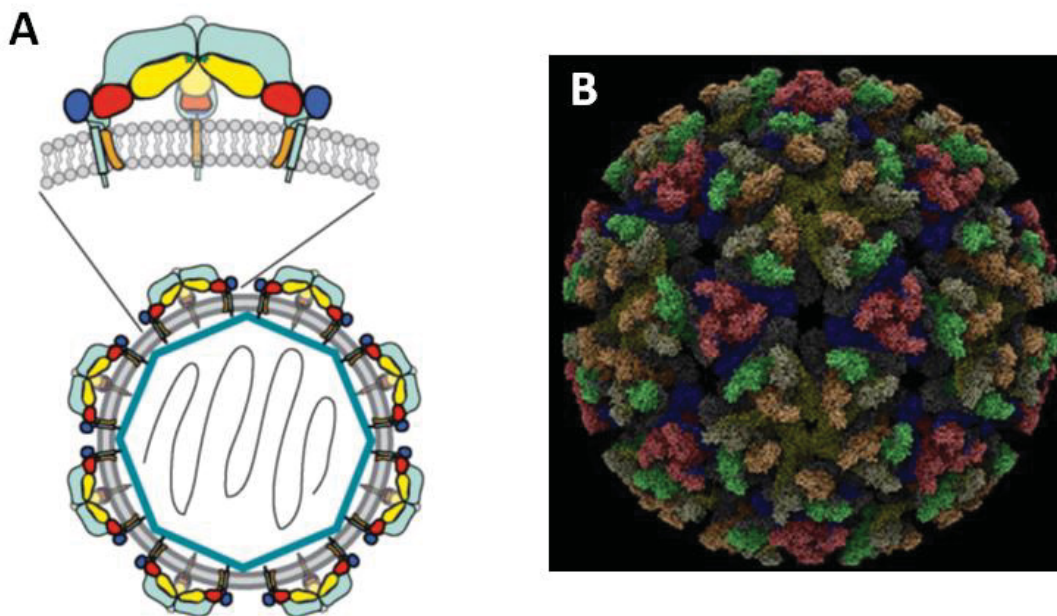


Figura 2 – Estrutura de uma partícula madura de alfavírus. A: Representação esquemática da partícula viral. O RNA está representado em preto. O capsídeo está mostrado como um polígono azul para representar a organização icosaédrica. A membrana está representada como uma bicamada cinza, com as glicoproteínas virais inseridas. A região amplificada mostra um trímero de heterodímeros formados por E1 (em azul escuro, vermelho e amarelo) e E2 (em azul claro), demonstrando a interação da E2 com a E1, protegendo o peptídeo de fusão (estrela verde). B: Representação esquemática do envelope viral, evidenciando a organização das proteínas de envelope, que formam espículas na superfície do vírion. FONTE: Adaptado de MARTIN, LIU e KIELIAN (2009) e METZ e PIJLMAN (2011).

A proteína E1 (439 aminoácidos – aa) é a mediadora da fusão entre a membrana viral e a endossomal. O ectodomínio da E1 consiste em três domínios ricos em barris β (I, II e III), com o peptídeo de fusão localizado na extremidade distal do domínio II. A região transmembrana abrange os resíduos de aa Trp409 a Met433 e os seis resíduos de aa C-terminais se estendem para o interior do partícula viral (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A proteína E2 (423 aa) é a que está mais exposta nas espículas na superfície do vírion e está envolvida na ligação com os receptores da célula hospedeira e na subsequente endocitose mediada por receptor (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009). A E2 é a proteína que contém os epítomos para anticorpos neutralizantes mais importantes. É organizada em três domínios tipo-imunoglobulina (A, B e C), sendo que o domínio A (resíduos de aa 1-132) é o que contém os sítios para ligação aos receptores e a anticorpos neutralizantes (GRIFFIN, 2013). O domínio intracitoplasmático interage com o nucleocapsídeo e contém uma segunda porção de aa hidrofóbicos e sítios de miristoilação pela qual se ancora à superfície externa da membrana (GRIFFIN, 2013; JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

Durante a maturação viral, há ainda liberação da proteína E3, uma glicoproteína pequena, rica em cisteína. A E3 atua como um peptídeo sinal para a pE2 (um precursor que contém E3 e E2), além de ser requerida para o correto dobramento e a ativação das espículas de E1/E2 que se projetam na superfície viral. Além disso, uma pequena quantidade de proteína 6K é incorporada no vírion. A proteína 6K serve como peptídeo sinal para a E1 e é importante para o brotamento e formação das partículas virais (GRIFFIN, 2013).

A infecção de uma célula por um alfavírus se inicia com a interação entre a proteína E2 do vírus e receptores de superfície celular e pela posterior endocitose mediada por vesículas de clatrina. Uma vez dentro da vesícula endocítica, a acidificação progressiva desta leva a uma desestabilização dos heterodímeros E1-E2 com separação das duas proteínas. Essa dissociação resulta na exposição do peptídeo de fusão da proteína E1, o qual se insere na membrana endossomal de uma maneira dependente de colesterol, seguindo-se com a trimerização da E1. Um conjunto de trímeros de E1 promove uma deformação da membrana e a fusão da membrana viral com a endossomal, com subsequente liberação do nucleocapsídeo viral para o citoplasma celular. O nucleocapsídeo é então desmontado, liberando o RNA viral no citoplasma (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; KUHN, 2013). O RNA

genômico serve então como um RNA mensageiro (RNAm) para a síntese das proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4). Estas são produzidas a partir de duas poliproteínas: a P123 (mais abundante) e a P1234 (com frequência de aproximadamente 10-20%), que são processadas por meio da ação da protease viral codificada na nsP2. As proteínas não estruturais formam então o complexo de transcrição/replicação, que catalisa a síntese de RNA viral de ambas as polaridades. A proteína nsP1 está implicada no capeamento do RNA viral e no início da síntese do RNA de polaridade negativa, além de ancorar o complexo replicativo a membranas. A nsP2 possui, em sua porção N-terminal, atividade de helicase, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase e, em sua porção C-terminal, um domínio cisteíno-protease, responsável pelo processamento da poliproteína não estrutural. A função da nsP3 ainda não está bem esclarecida, mas sabe-se que ela é necessária para a síntese da fita de RNA de polaridade negativa. Já a nsP4 é a RNA polimerase RNA-dependente.

A replicação do RNA viral se inicia com a síntese de uma fita complementar de RNA, com polaridade negativa, que serve de molde tanto para a síntese do RNA genômico, quanto do RNA subgenômico (RNA 26S). O RNA subgenômico é então traduzido em uma poliproteína que originará as proteínas estruturais. A ordem de tradução dessas proteínas é capsídeo-pE2(E3-E2)-6K-E1. A proteína de capsídeo é clivada da poliproteína ainda durante a tradução por sua atividade de autoprotease e se agrega com o RNA viral genômico para formar os nucleocapsídeos virais no citosol da célula hospedeira. Com a clivagem da proteína C, a nova região N-terminal da poliproteína contém uma sequência sinal de direcionamento para o retículo endoplasmático. A translocação das proteínas de envelope pelo retículo endoplasmático é regulada por várias sequências-sinal e posteriores modificações pós-traducionais. Durante o transporte dos complexos pE2-E1, após os heterodímeros atingirem a rede *trans* de Golgi, mas antes de chegarem à membrana plasmática, a pE2 é clivada por furinas, para formar as proteínas E3 e E2. A clivagem da pE2 é requerida para que sejam geradas novas partículas infecciosas. O estágio final envolve o deslocamento dos nucleocapsídeos formados no citoplasma até a membrana plasmática, onde eles interagem com o domínio citoplasmático das proteínas E2 (nos heterodímeros E2-E1). Esta ligação promove a energia necessária para impulsionar o capsídeo através da membrana plasmática, durante o qual ele adquire as espículas de glicoproteínas de envelope. Assim ocorre a liberação de

novas partículas virais por brotamento (Figura 3) (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; KUHN, 2013; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

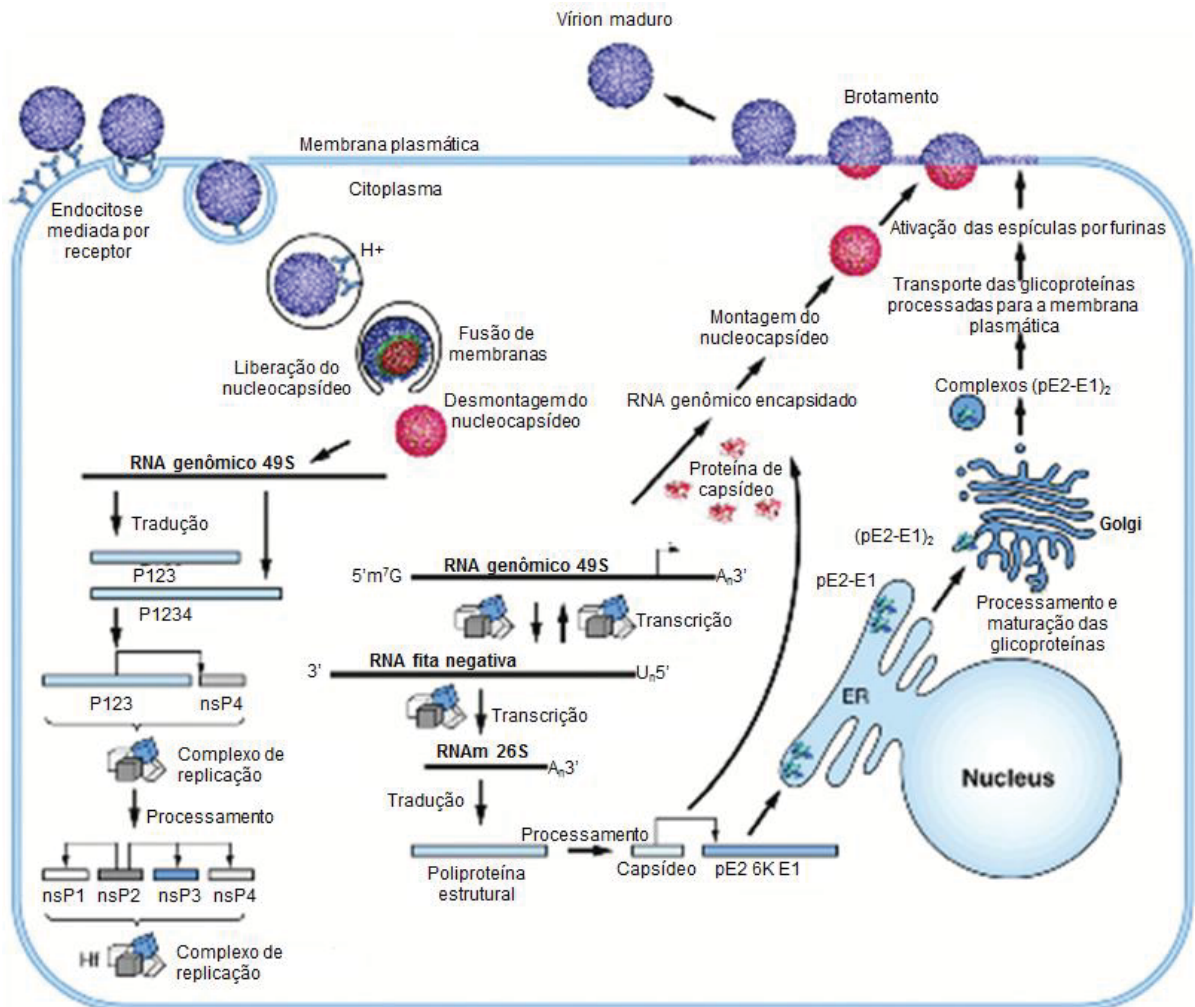


Figura 3 – Representação esquemática das principais etapas do ciclo de infecção e replicação de um alfavírus. O início do ciclo está mostrado à esquerda com a ligação de um vírion ao receptor da célula hospedeira. Após a fusão do envelope viral, desmontagem do capsídeo e liberação do RNA genômico, as proteínas não estruturais são traduzidas e processadas. Estas proteínas possibilitam a replicação do RNA genômico e a tradução do RNAm subgenômico nas proteínas estruturais. O nucleocapsídeo é montado no citoplasma e se associa com as glicoproteínas processadas na membrana plasmática, terminando com o brotamento (ilustrado à direita). FONTE: Adaptado de KUHN (2013).

2.1.2 Vírus Chikungunya

2.1.2.1 Histórico

O vírus Chikungunya (gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) foi isolado pela primeira vez em 1953, a partir do sangue periférico de um indivíduo febril da tribo Makonde, na Tanzânia, durante a epidemia de uma doença caracterizada por febre alta e dores articulares incapacitantes (ROSS, 1956). A doença era localmente referida como chikungunya, que na linguagem Makonde significa “aquele que se curva”, fazendo referência à postura contorcida assumida pelas pessoas devido às fortes dores nas articulações (ROBINSON, 1955).

Posteriormente, em 1958, o vírus foi isolado de um paciente em Bangkok, Tailândia (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960) e, desde então, surtos esporádicos vinham sendo reportados em diversos países da África e Ásia. A introdução do CHIKV na Ásia tem sido atribuída a uma linhagem africana, a linhagem enzoótica Leste/Central/Sul Africana (ECSA), que em algum momento antes ou durante a década de 50 evoluiu, resultando na linhagem Asiática (VOLK et al., 2010; WEAVER, 2014).

Uma nova emergência do CHIKV se iniciou em 2004 na costa do Quênia, primeiro em Lamu e depois em Mombasa. Estima-se que aproximadamente 75% da população da ilha de Lamu tenha sido afetada (SERGON et al., 2008). A partir de então, iniciou-se um período em que o vírus se disseminou para diversas ilhas do oceano Índico, Índia e sudeste asiático (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Novos casos foram surgindo em vários países, incluindo a ilha da Reunião, onde foram reportados mais de 40.000 casos por semana, no pico da epidemia (MORRISON, 2014; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). Na ilha da Reunião, diferentemente do que vinha sendo reportado anteriormente, foi especulado que o vírus estava sendo transmitido pelo vetor *Aedes albopictus*¹ e não pelo seu principal vetor, o *Aedes aegypti*¹ (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; VAZEILLE et al., 2007).

¹Na classificação atual o *Aedes aegypti* é chamado *Stegomyia aegypti* e o *Aedes albopictus*, *Stegomyia albopicta*. Neste trabalho, foram adotadas as nomenclaturas antigas devido à importância sanitária e à familiarização da população com estes nomes. FONTE: Mosquito taxonomy inventory. Disponível em <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list>. Acesso em 16 jan 2015.

O vírus continuou se disseminando, atingindo a Índia, onde mais de 1,3 milhão de casos suspeitos foram reportados apenas no primeiro ano (LAHARIYA; PRADHAN, 2006; POWERS, 2010). Em 2007, o CHIKV foi introduzido na Europa, quando ocorreram os primeiros casos de transmissão autóctone na Itália, sendo a transmissão mediada por *Ae. albopictus* (ANGELINI et al., 2007).

Essas epidemias que ocorreram em ilhas do oceano Índico e Índia parecem ter emergido independentemente do que ocorria na África oriental, sendo atribuídas a uma nova linhagem de CHIKV descendente do genótipo ECSA, a linhagem do Oceano Índico (IOL) (VOLK et al., 2010). Estudos genéticos com isolados virais obtidos a partir do surto na ilha da Reunião identificaram que o vírus circulante nesses países possui uma mutação na posição 226 do gene codificante para a proteína E1 de uma alanina para uma valina (E1-A226V). Essa mutação no domínio de fusão da proteína E1 demonstrou ser responsável por um aumento na capacidade do CHIKV de infectar e replicar em *Ae. albopictus*, sem interferir na replicação do vírus em *Ae. aegypti* (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007; VAZEILLE et al., 2007).

A primeira evidência de transmissão autóctone do CHIKV nas Américas foi documentada em outubro de 2013, na ilha de Saint Martin, no Caribe (CASSADOU et al., 2014). Desde então, o número de casos suspeitos e confirmados vem aumentando, com a transmissão autóctone já descrita em 44 países e territórios das Américas. Outros seis países relataram casos importados. Até 20 de março de 2015, a Organização Pan-Americana / Organização Mundial de Saúde (OPA/OMS) informaram um total de 1.307.344 casos (entre confirmados e suspeitos) autóctones nas Américas e 3.524 casos importados, sendo que 184 resultaram em morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2015). Surpreendentemente, estudos genéticos do vírus circulante no Caribe demonstraram que não se trata do genótipo pandêmico IOL, e sim do genótipo Asiático, que ainda não é adaptado à transmissão pelo *Ae. albopictus* (MORRISON, 2014).

No Brasil, até 15 de novembro de 2014, foram relatados 71 casos importados e 1.293 casos autóctones, sendo 125 confirmados em laboratório e 1.239 por critério clínico-epidemiológico. Dos casos de transmissão autóctone, 531 ocorreram no município de Oiapoque (AP), 563 em Feira de Santana (BA), 196 em Riachão do Jacuípe (BA), um em Matozinhos (MG), um em São Leopoldo (MG) e um Campo Grande (MS) (BRASIL, 2014b). Dados mais atualizados, de 20 de março de 2015, relatam 5.355 casos autóctones e 100 casos importados no Brasil, sendo que casos

autóctones foram reportados em Amapá, Roraima, Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal (WHO, 2015).

O sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética do vírus em um caso importado e em um caso autóctone em Oiapoque revelou que o CHIKV responsável por estes casos pertence ao genótipo Asiático, o mesmo que vem circulando na região do Caribe. Posteriormente, o sequenciamento nucleotídico do vírus em um caso autóctone em Feira de Santana revelou que o genótipo viral circulante nessa região é o ECSA (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Isso significa que já existem dois genótipos de CHIKV circulando no Brasil.

A distribuição do CHIKV no mundo e nas Américas está ilustrada nas Figuras 4 e 5.

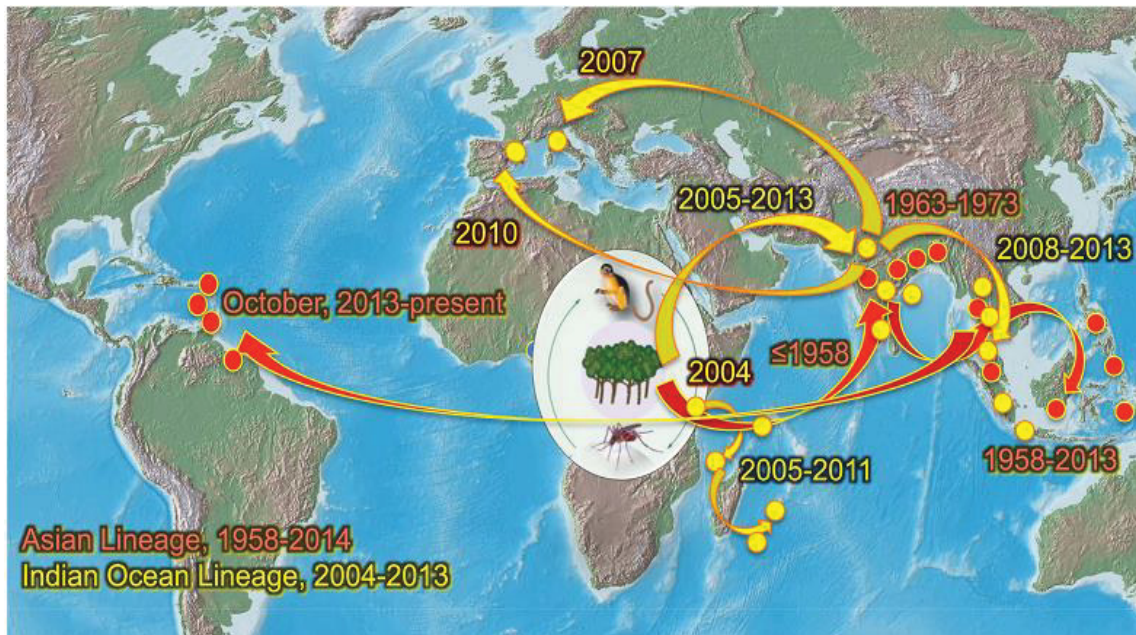


Figura 4 – Distribuição do vírus Chikungunya no mundo. Estão indicados o surgimento e a emergência das linhagens Asiática (setas e pontos vermelhos) e do Oceano Índico (setas e pontos amarelos). Fonte: WEAVER (2014).



Figura 5 – Países da América com transmissão autóctone (em roxo) ou com casos importados (com estrela) de chikungunya em 20 de março de 2015. Fonte: (WHO, 2015).

2.1.2.2 Ciclos de Transmissão

O CHIKV tem dois ciclos de transmissão bem documentados: um ciclo silvestre enzoótico e um ciclo urbano endêmico/epidêmico (Figura 6). Na África, o ciclo silvestre ocorre em florestas, onde mosquitos arbóreos atuam como vetores e primatas não humanos como principais reservatórios e hospedeiros amplificadores.

Os mosquitos envolvidos no ciclo silvestre mais descritos são: *Aedes furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus* e *Ae. africanus*¹.

Neste ciclo de transmissão enzoótico, infecções em humanos ocorrem principalmente em populações que vivem perto das selvas africanas e pode até causar pequenos surtos. Embora o ciclo silvestre tenha sido descrito apenas na África, alguns estudos sugerem que ele também ocorra na Ásia.

Já o ciclo epidêmico ocorria na África quando o CHIKV era introduzido em áreas urbanas onde mosquitos mais antropofílicos (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) podiam iniciar uma transmissão humano-mosquito-humano. O ciclo urbano também ocorria na Ásia desde a década de 50, quando o CHIKV foi introduzido no continente (CAGLIOTI et al., 2013; WEAVER et al., 2012).

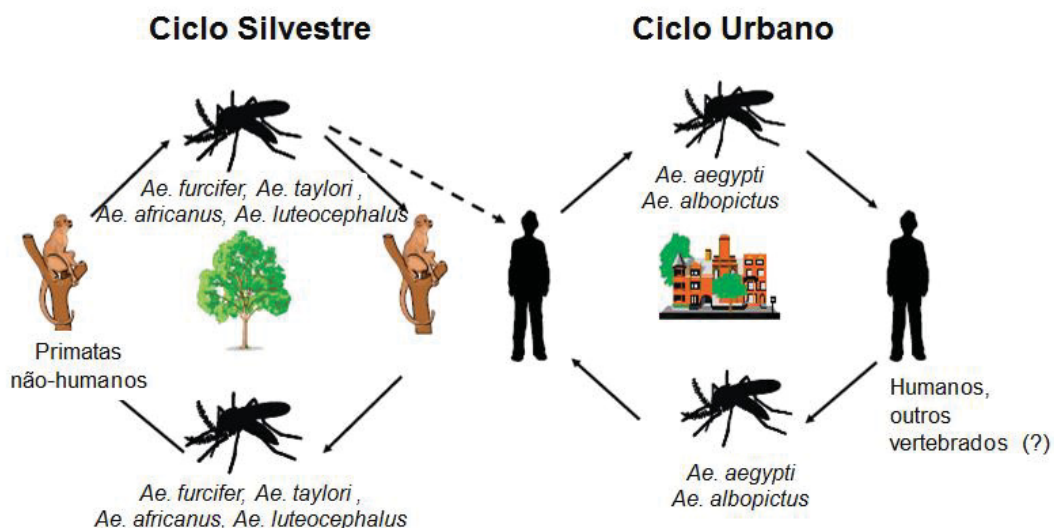


Figura 6 – Ciclos de transmissão do vírus Chikungunya demonstrando os principais vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos. FONTE: Adaptado de POWERS (2010).

Até 2004, os surtos em humanos estavam associados principalmente ao *Ae. aegypti* (GOULD et al., 2010). Desde 2004, no entanto, o CHIKV vem causando surtos e epidemias por várias partes do mundo, com o vírus se disseminando mais rapidamente. Isso tem sido atribuído, em parte, à mutação A226V na proteína E1 do CHIKV que possibilitou que o CHIKV fosse transmitido também pelo *Ae. albopictus* (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007). Diferentemente do *Ae. aegypti* que é predominantemente urbano e procria principalmente em locais

¹Na classificação atual, o *Aedes furcifer* é chamado *Diceromyia furcifer*, o *Ae. taylori* é chamado *Di. taylori*, o *Ae. luteocephalus* é *Stegomyia luteocephala* e o *Ae. africanus* é *St. africana*.

artificiais, o *Ae. albopictus* prefere áreas suburbanas e rurais, se reproduz tanto em ambientes artificiais, quanto naturais e pode infectar tanto humanos quanto animais. Essa adaptação do CHIKV ao *Ae. albopictus* aumenta o poder epidêmico do vírus, uma vez que ele passa a ser transmitido também em locais onde o *Ae. albopictus* é o mosquito predominante (NG; HAPUARACHCHI, 2010; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

O CHIKV, juntamente com os vírus da dengue e da febre amarela, é um arbovírus capaz de iniciar um ciclo urbano sustentável que se baseia apenas em mosquitos como vetores (neste caso, o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus*) e humanos como hospedeiros amplificadores. Este ciclo endêmico/epidêmico resulta em altos níveis de exposição de humanos aos mosquitos transmissores, em especial porque estes vetores vivem em estreita proximidade com as pessoas (WEAVER et al., 2012).

Além da transmissão a partir da picada de mosquito infectado, no surto ocorrido na ilha da Reunião em 2005, também foram relatados casos de transmissão materno-fetal (GÉRARDIN et al., 2008).

2.1.2.3 Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção

A doença causada pelo CHIKV em humanos, a febre chikungunya, é caracterizada por uma doença febril abrupta ($>38^{\circ}\text{C}$), poliartralgia e *rash* petequial ou maculopapular. Em alguns casos, os sintomas são indistinguíveis dos da dengue. O período de incubação varia de 3 a 7 dias e, diferentemente de outros arbovírus, apenas 5-25% das infecções por CHIKV são assintomáticas (MORRISON, 2014; WEAVER et al., 2012). Outros sintomas incluem calafrios, dor de cabeça, fotofobia e mialgia, particularmente nos músculos da parte inferior das costas e das pernas. A artralgia é simétrica e afeta principalmente as articulações periféricas, incluindo punhos, joelhos, tornozelos e pequenas articulações das mãos. A dor articular muitas vezes é incapacitante e pode persistir por semanas ou anos, levando a um grande impacto socioeconômico nas áreas atingidas (MORRISON, 2014; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Além disso, embora o CHIKV seja um alfavírus predominantemente causador de artrite, durante a epidemia atual no mundo, manifestações neurológicas e cardíacas graves e, em alguns casos morte, têm sido documentadas. Esses casos

mais graves ocorrem principalmente em neonatos, em pacientes com mais de 65 anos e em pacientes com outras doenças pré-existentes (GÉRARDIN et al., 2008; MORRISON, 2014). Diferentemente de outros alfavírus normalmente causadores de encefalite, as células-alvo do CHIKV não são células neuronais. Há indícios de que o CHIKV infecta células estromais do sistema nervoso central, em especial do plexo coroide (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Após a transmissão, o vírus replica em células da pele e então se dissemina para as articulações e fígado, provavelmente via corrente sanguínea (WEAVER et al., 2012). O CHIKV tem como principais alvos fibroblastos musculares, articulares e da pele, mas também foi encontrado em camadas epiteliais e endoteliais de vários órgãos, como fígado, baço e cérebro (COUDERC et al., 2008).

O início da doença coincide com o aumento do título viral, com alta viremia, o que desencadeia a ativação de uma resposta imune inata, marcada pela produção de interferon (IFN) tipo I (Figura 7) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Um efeito da infecção aguda por CHIKV é a linfopenia (BORGHERINI et al., 2007). Isso provavelmente não se deve a um efeito direto do vírus sobre os linfócitos, uma vez que linfócitos B e T não são infectados pelo CHIKV. A linfopenia pode ser resultado da morte de linfócitos ocasionada pela resposta mediada por IFN tipo I ou ainda por uma migração dos linfócitos para os tecidos, levando a uma redução destas células na corrente sanguínea. Na maioria dos indivíduos a quantidade de linfócitos na circulação é restabelecida logo após a resolução da infecção (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Outras alterações de marcadores laboratoriais incluem trombocitopenia, aumento nas concentrações sanguíneas de aspartato transaminase, alanina aminotransferase e creatinina quinase e hipocalcemia (BORGHERINI et al., 2007).

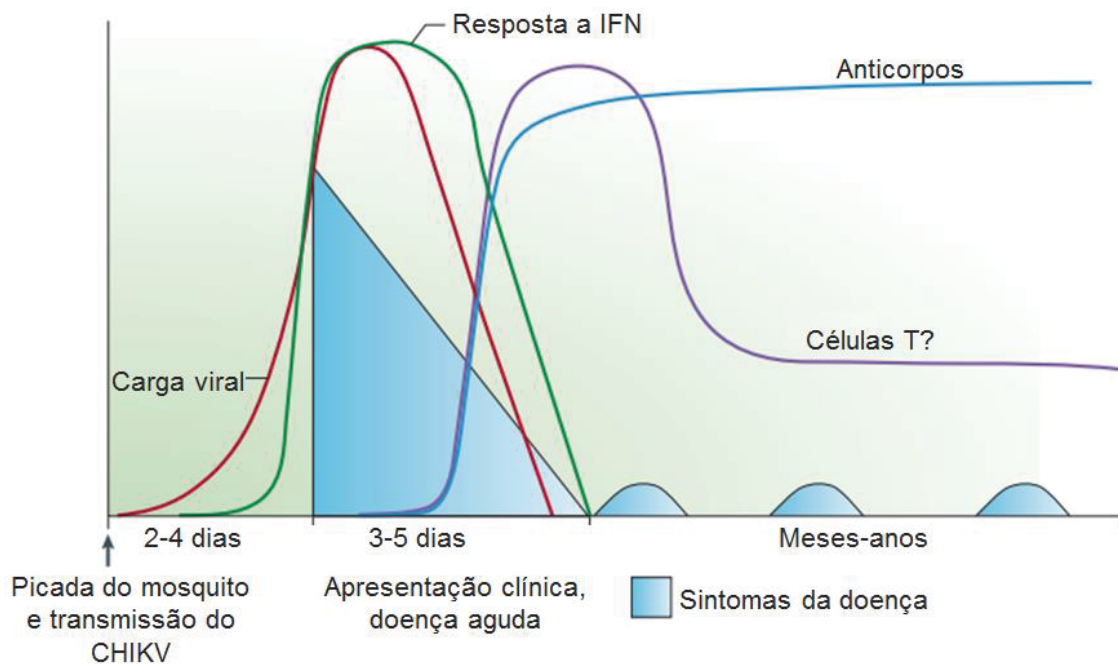


Figura 7 – Representação esquemática da patogênese do vírus Chikungunya. FONTE: Adaptado de SCHWARTZ e ALBERT (2010).

Em geral, o vírus é eliminado do organismo entre 4 e 7 dias após a infecção, mas pode persistir por até 12 dias (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; WEAVER et al., 2012). É neste momento que também é evidenciada a resposta imune adaptativa contra o CHIKV, com a produção de anticorpos neutralizantes, além de ter sido também sugerida a indução de linfócitos T citotóxicos (Figura 7). O mecanismo pelo qual esses linfócitos participam na eliminação de células infectadas por CHIKV ainda não foi esclarecido (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Os sintomas da fase aguda da doença duram de alguns dias a poucas semanas, porém cerca de 30-40% dos pacientes evolui para um quadro crônico, com dores articulares recorrentes, que pode durar até vários anos (Figura 7). Embora a causa das dores articulares crônicas ainda não esteja bem estabelecida, recentemente, Hawman et al. (2013) demonstraram, em modelo murino, que a causa pode ser uma infecção persistente do CHIKV. Eles verificaram que o RNA viral pode ser detectado em vários tecidos no início da infecção, mas que persiste especificamente em tecidos associados a articulações por pelo menos 16 semanas. Além disso, sugerem que a persistência do CHIKV nos tecidos associados a articulações pode promover uma inflamação crônica das membranas sinoviais e que a resposta imune mediada por células T e/ou B protege contra doença músculo-esquelética crônica (HAWMAN et al., 2013). A doença crônica inclui sintomas como

artralgia e até artrite e pode ser altamente debilitante. Em função disso, as epidemias podem gerar grandes impactos socioeconômicos (MORRISON, 2014), uma vez que afeta a capacidade laboral da população, evidenciando o papel do CHIKV na saúde pública.

2.1.2.4 Diagnóstico

Segundo diretrizes da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), a confirmação de um diagnóstico de infecção por CHIKV é realizada por pelo menos um dos critérios abaixo:

- isolamento viral;
- detecção de RNA viral por RT-PCR;
- detecção de IgM anti-CHIKV em uma única amostra de soro (coletada durante a fase aguda ou convalescente);
- um aumento de quatro vezes no título de anticorpos anti-CHIKV, em amostras coletadas com pelo menos 2-3 semanas de intervalo.

O Ministério da Saúde também tem adotado esses critérios (BRASIL, 2014c). Além disso, a partir de 10 de outubro de 2014, ampliou a possibilidade de confirmação de casos de febre Chikungunya baseando-se apenas em critérios clínico-epidemiológicos nas localidades com registro de casos autóctones. Desta forma, para a confirmação dos casos serão considerados fatores como os sintomas apresentados e a proximidade com pessoas que já contraíram a doença. Nessas localidades, o exame laboratorial será realizado apenas em casos atípicos ou óbitos. Onde ainda não houver relato de transmissão autóctone do CHIKV, a comprovação continuará sendo por meio de exame laboratorial (BRASIL, 2014d).

O tipo de teste a ser realizado depende da disponibilidade, tempo de coleta e volume da amostra. Quando a amostra é coletada nos primeiros dias após o início dos sintomas, pode ser realizado o isolamento viral ou a detecção de ácido nucleico viral por RT-PCR (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009). O isolamento viral se baseia na inoculação da amostra biológica em culturas celulares, derivadas de mamíferos ou de mosquitos, ou em camundongos recém-nascidos (CAVRINI et al., 2009). Para a detecção de RNA viral por RT-PCR, diversos protocolos têm sido desenvolvidos.

Estes testes moleculares têm demonstrado que o CHIKV é capaz de gerar uma alta viremia em humanos, tendo sido detectadas cargas virais de até 10^9 cópias/mL e quantidade viral de até $1 \times 10^{6,8}$ unidades formadoras de placa por mL (LANCIOTTI et al., 2007; PANNING et al., 2008).

Quando as amostras forem coletadas na fase aguda ou convalescente da doença, podem ser utilizados testes para a detecção de imunoglobulinas tipo M e G (IgM e IgG). Anticorpos do tipo IgM normalmente já estão presentes cerca de sete dias após a infecção e podem persistir por vários meses. Na ausência de IgM, vírus ou ácido nucleico em uma amostra de infecção aguda, a infecção pode ser confirmada por meio de um aumento de quatro vezes no título de anticorpos anti-CHIKV entre amostras aguda e convalescente (POWERS, 2010; PRINCE et al., 2014). A detecção de IgM e IgG pode ser feita por métodos como imunofluorescência, ELISA e teste imunocromatográfico (KASHYAP et al., 2010; LITZBA et al., 2008; PRAT et al., 2014). Estes testes, porém, costumam ter problemas de especificidade, principalmente devido à reatividade antigênica cruzada entre CHIKV e outros arbovírus, como os vírus da dengue, o'nyong-nyong, Sindbis e Mayaro (BLACKBURN; BESSELAAR; GIBSON, 1995; CAVRINI et al., 2009). Em função disso, um teste bastante utilizado como teste confirmatório é o teste de neutralização por redução de unidade formadora de placa (PRNT), que tem maior especificidade e é considerado o padrão ouro para confirmação de testes sorológicos. A principal dificuldade da PRNT é o uso de vírus ativo, que requer a manipulação em laboratório com nível de biossegurança 3 (NB3), o que limita o número de laboratórios disponíveis para a realização deste teste (STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009).

2.2 FLAVIVIRUS

2.2.1 Classificação, Estrutura e Replicação

O gênero *Flavivirus* faz parte da família Flaviviridae, juntamente com os gêneros *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2014). O nome “Flaviviridae” faz referência ao

vírus da febre amarela (do latim “*flavus*”, que significa “amarelo”), o protótipo da família (CHAMBERS et al., 1990). Além do vírus da febre amarela, o gênero *Flavivirus* compreende outras 52 espécies virais, entre elas o vírus da dengue, o vírus da encefalite de Saint Louis e o vírus do oeste do Nilo (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2014), abordados neste trabalho.

Muitos dos flavivírus são arbovírus causadores de doença em humanos. Dependendo do modo de transmissão, podem ser divididos em flavivírus transmitidos por mosquitos, flavivírus transmitidos por carrapatos e flavivírus com vetor desconhecido. Os flavivírus transmitidos por mosquitos podem ainda ser agrupados em função de sua associação com vetores dos gêneros *Culex* ou *Aedes*. Enquanto a maioria dos vírus associados a *Culex* infecta hospedeiros aviários, vírus associados a *Aedes* geralmente não o fazem; por outro lado, os vírus associados a *Culex* não são mantidos na natureza em ciclos envolvendo primatas (PIERSON; DIAMOND, 2013).

Os flavivírus possuem estrutura esférica, com diâmetro de 40 a 60 nm. Seu material genético é composto por uma fita simples de RNA, não-segmentado, de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb de comprimento. O RNA genômico possui apenas uma ORF flanqueada por uma região 5' e uma 3' não codificantes. A poliproteína gerada por essa ORF é posteriormente clivada por enzimas virais e da célula hospedeira, resultando em três proteínas estruturais, que compõem o vírion (C, prM/M e E), e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), envolvidas principalmente na replicação e na patogênese. O genoma possui em sua extremidade 5' um capeamento tipo 1 (m⁷GpppAmN), o qual serve para estabilizar o RNA viral e para o início da tradução, além de estruturas secundárias comuns entre os flavivírus, que estão envolvidas na tradução e replicação do genoma. Na extremidade 3', apesar do RNA não possuir uma cauda de poliadenina, possui estruturas secundárias conservadas (Figura 8) (HERNANDEZ; BROWN; PAREDES, 2014; LINDENBACH et al., 2013).

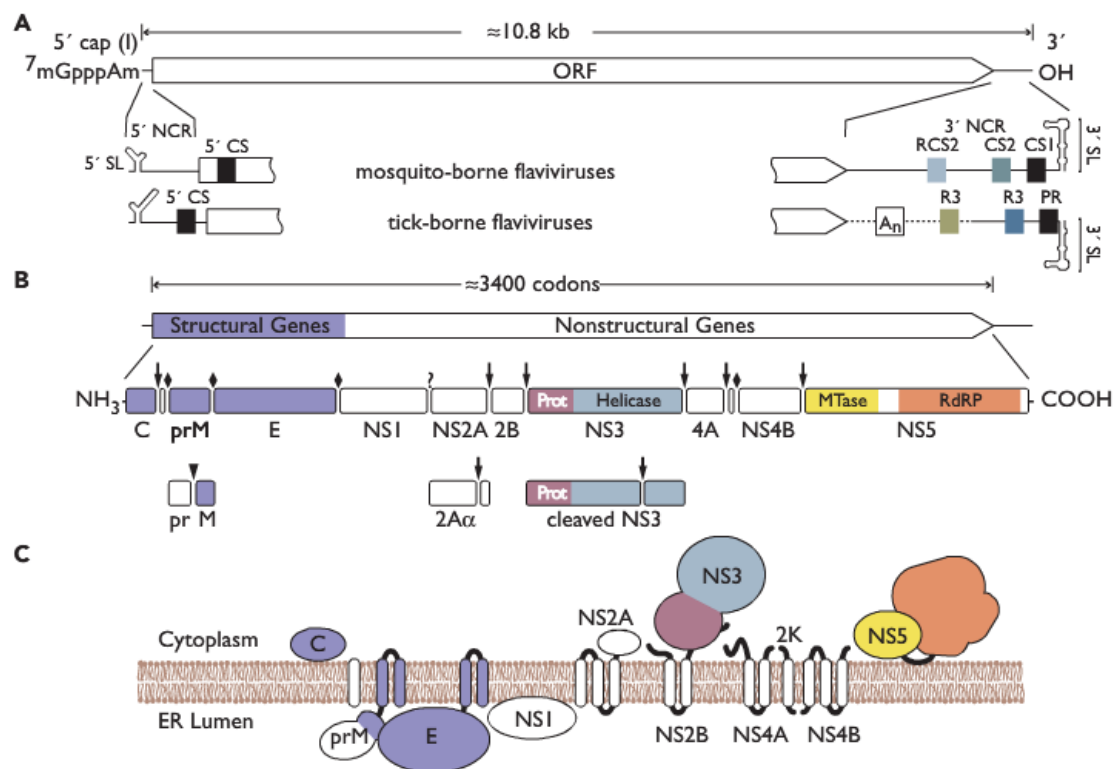


Figura 8 – Organização do genoma dos Flavivirus e seu transcrito proteico. A: estrutura do genoma e elementos do genoma, com indicação da única ORF, do cap 5' e das regiões não codificantes (NCR) 5' e 3'. B: esquema da poliproteína e produtos de processamento proteolítico. As proteínas estruturais estão ilustradas em roxo. Os sítios de clivagem por sinalase do hospedeiro (♦), por serino-protease viral (↓), por furina do hospedeiro (▼) e por proteases desconhecidas (?) estão indicados. C: topologia da poliproteína viral na membrana do retículo endoplasmático. FONTE: LINDENBACH et al. (2013).

O vírion é composto por um nucleocapsídeo com simetria icosaédrica envolvido por um envelope (Figura 9). O nucleocapsídeo é constituído pelo RNA genômico associado a múltiplas cópias da proteína de capsídeo (C). O envelope é formado por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira na qual estão inseridas a proteína de envelope (E) e a proteína de membrana (M). A M é gerada após a proteólise da proteína pré-membrana (prM), sua precursora, e está ancorada na membrana por duas hélices transmembrana (Figura 8 B e C) (CHAMBERS et al., 1990). A proteína E é o maior determinante antigênico da partícula viral e principal alvo para anticorpos neutralizantes, é responsável pela ligação do vírus a receptores da célula hospedeira e pela fusão de membranas, além de estar envolvida na montagem e brotamento do vírus. O ectodomínio da proteína E consiste em três domínios estruturalmente distintos (DI, DII e DIII) conectados por pequenas regiões de dobradiça. O domínio II é o que medeia a dimerização da E na partícula viral madura e que contém o peptídeo de fusão (Figura 9) (PIERSON; DIAMOND, 2013).

Na partícula viral madura, a proteína E está presente como 90 homodímeros, que formam um padrão de “espinha de peixe” e cobrem completamente a bicamada lipídica (Figura 9 B). As proteínas M e E não interagem com o nucleocapsídeo no vírion maduro (KUHN et al., 2002).

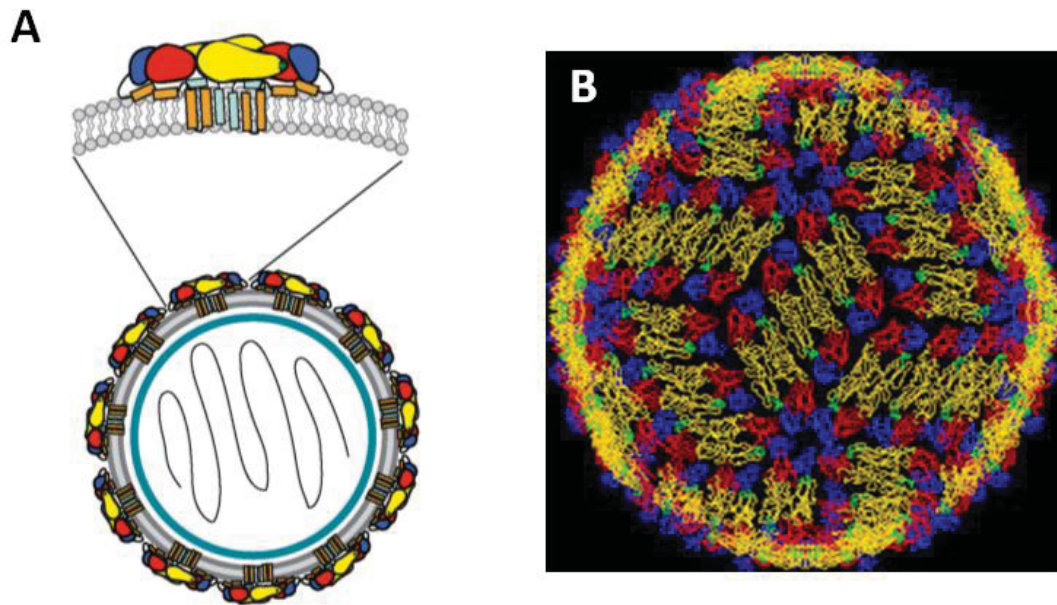


Figura 9 – Estrutura de uma partícula madura de um flavivírus. A: representação esquemática da partícula viral. O RNA está representado em preto e o capsídeo, como um círculo azul. A membrana está representada como uma bicamada cinza, com as glicoproteínas virais inseridas. A região ampliada mostra um homodímero de proteína E, com o domínio I em vermelho, o II em amarelo, o III em azul escuro e o peptídeo de fusão (verde) protegido. A proteína M está mostrada em azul claro. B: representação esquemática do envelope viral, evidenciando a organização da proteína de envelope. Três homodímeros de E quase paralelos formam uma estrutura parecida a uma “espinha de peixe”. FONTE: Adaptado de KUHN et al. (2002) e MARTIN; LIU; KIELIAN (2009).

A infecção por um flavivírus se inicia com a ligação da glicoproteína E a receptores da célula hospedeira e posterior endocitose mediada por vesículas de clatrina. Uma vez dentro da vesícula endocítica, a acidificação progressiva desta promove uma série de alterações conformacionais na proteína E levando à fusão da membrana viral com a endossomal e a subsequente liberação do nucleocapsídeo no interior da célula (Figura 10). A etapa inicial para a fusão das membranas envolve a dissociação dos homodímeros de E em monômeros. Essa dissociação resulta na exposição do peptídeo de fusão, na sua inserção na membrana endossomal e então na reassociação da proteína E em trímeros. As alterações conformacionais da E promovem uma aproximação das membranas endossomal e viral e a sua fusão (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; SMIT et al., 2011).

Uma vez que o genoma é liberado no citosol, o RNA viral é traduzido em uma única poliproteína. Essa tradução ocorre junto ao retículo endoplasmático (RE), onde várias sequências-sinal e domínios transmembrana possibilitam o endereçamento das proteínas voltadas para o citosol ou para o lúmen do RE (Figura 8 C). A poliproteína é processada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e da célula hospedeira, gerando as dez proteínas virais. As proteínas não estruturais provavelmente recrutam o genoma viral para um complexo replicativo. A replicação inicia com a síntese de uma fita complementar de RNA, de polaridade negativa, que serve como molde para a síntese de novas fitas positivas.

A montagem de novas partículas virais ocorre na superfície do RE, onde múltiplas cópias da proteína C se associam a uma única cópia do RNA genômico para formar o nucleocapsídeo, que brota para o interior do RE. No lúmen do RE, a prM e a E formam heterodímeros e três desses heterodímeros formam uma espícula viral. O nucleocapsídeo raramente é encontrado em uma célula infectada por um flavivírus, o que indica que a formação da partícula é um processo coordenado entre a proteína C associada à membrana e os heterodímeros de prM-E no RE. Após a montagem, os vírions são transportados pela via secretória e liberados por vesículas exocíticas (Figura 10). Durante a passagem pela rede *trans* de Golgi, o pH ácido induz uma série de alterações conformacionais, com dissociação dos 60 heterodímeros de prM-E projetados na superfície viral e formação de 90 homodímeros de proteína E. Isso permite a clivagem da prM em M e “pr” por uma furina celular. O peptídeo “pr” se dissocia da partícula após a sua liberação para o meio extracelular (CHAMBERS et al., 1990; LINDENBACH et al., 2013; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; SMIT et al., 2011).

Além das partículas virais maduras, em uma infecção por flavivírus costumam ser geradas partículas subvirais. Estas partículas contêm apenas o envelope viral (proteínas M e E associadas à bicamada lipídica). Essas partículas subvirais são montadas no RE, sofrem as mesmas modificações pós-traducionais das partículas infectivas e são liberadas por exocitose. Uma vez que não contêm o capsídeo e o genoma virais, estas partículas não são infectivas (ALLISON et al., 2003; LORENZ et al., 2003; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

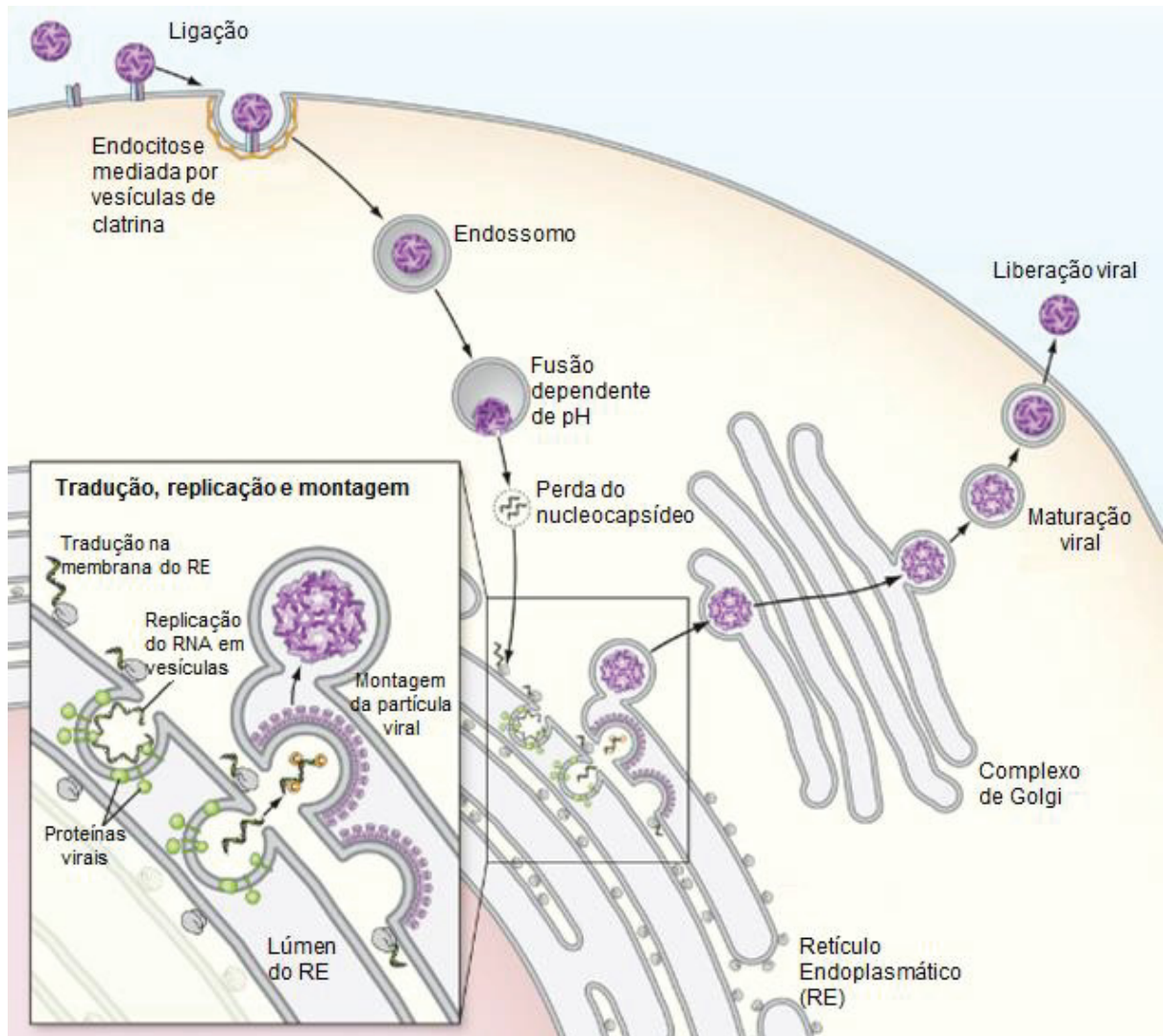


Figura 10 – Representação esquemática das principais etapas do ciclo de infecção e replicação de um flavivírus. O início do ciclo está mostrado à esquerda com a ligação de um vírion ao receptor da célula hospedeira e sua internalização mediada por vesículas de clatrina. Após a fusão do envelope viral, desmontagem do capsídeo e liberação do RNA genômico, o RNA é traduzido nas proteínas estruturais e não estruturais e a replicação do RNA genômico ocorre associado a membranas. A montagem das partículas virais ocorre no retículo endoplasmático (RE), onde são formadas partículas virais imaturas. Ao longo da via exocítica, ocorre a maturação das partículas virais e liberação de novos vírions por exocitose. FONTE: Adaptado de PIERSON e DIAMOND (2013).

2.2.2 Vírus da Dengue

2.2.2.1 Histórico

O vírus da dengue (gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) é classicamente classificado em quatro sorotipos antigenicamente distintos, mas estreitamente relacionados (DENV-1 a -4) (CALISHER, 1988). Recentemente, no entanto, foi descrito um quinto sorotipo do vírus. Até o momento esse novo sorotipo só foi detectado em florestas de Sarawak, na Malásia, mas o risco de transmissão a outros países não pode ser descartado (MUSTAFA et al., 2015).

Atualmente, a dengue é uma das arboviroses mais importantes em termos de distribuição geográfica e incidência de infecção em humanos, sendo endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 11). Mais de 40% da população mundial vive em áreas de risco de transmissão e estima-se que ocorram aproximadamente 390 milhões de infecções pelo vírus da dengue cada ano, dos quais 96 milhões manifestam sintomas da doença (BHATT et al., 2013; GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010).

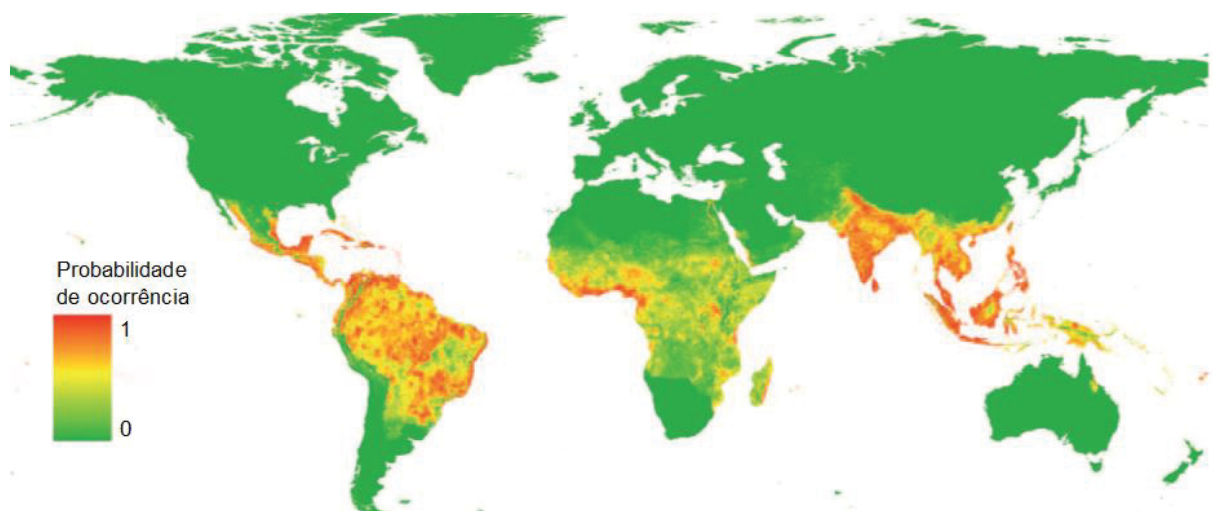


Figura 11 – Países e áreas com risco de transmissão de dengue. Áreas com maior probabilidade de ocorrência estão ilustradas em vermelho e com menor probabilidade, em verde. FONTE: Adaptado de BHATT et al. (2013).

Os registros mais antigos sugerindo potenciais casos de dengue constam na enciclopédia médica chinesa da dinastia Jin (265-420 d.C.). A doença foi chamada de

“veneno da água” pelos chineses, que, de algum modo, entenderam que o quadro estava correlacionado com insetos voadores e água. Mas o relato do primeiro caso definitivo de dengue foi atribuído a Benjamin Rush em 1789, quando a doença foi chamada de “febre quebra ossos” (GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010) e, em 1907, o agente etiológico foi identificado como um “agente filtrável” (ASHBURN; CRAIG, 1907).

O vírus da dengue foi isolado pela primeira vez em 1943 no Japão (HOTTA, 1952) e logo foi reconhecida a existência de diferentes sorotipos (SABIN, 1952; SNOW et al., 2014).

Com a segunda guerra mundial (1939-1945), as alterações nos ecossistemas e o deslocamento de grandes contingentes de pessoas e material levaram à disseminação do vírus da dengue e de mosquitos vetores para várias regiões da Ásia e do Pacífico. No pós-guerra, a urbanização desordenada na região asiática, com aumento da população nas áreas urbanas, criou ótimas condições para a expansão dos vetores. Isso levou ao surgimento de infecções sucessivas por dengue e ao surgimento de um novo padrão da doença, com epidemias das formas graves da doença (GUBLER, 1998). Os primeiros casos de dengue hemorrágica (FHD) foram relatados nas Filipinas (1953-1954) (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960). Em meados da década de 70, a FHD já havia se tornado uma das principais causas de hospitalização e morte entre crianças em vários países do sudeste asiático. Durante as décadas de 80 e 90, a transmissão da dengue epidêmica se intensificou, havendo um ressurgimento global da febre da dengue, com expansão geográfica tanto do mosquito vetor quanto do vírus, aumento da incidência da doença e a emergência da FHD em vários países (GUBLER, 1998, 2011).

Nas Américas, a história da dengue pode ser dividida em quatro fases (DICK et al., 2012):

- 1) Introdução da dengue nas Américas (1600 – 1946): inicialmente com epidemias e surtos de uma doença semelhante a dengue, sendo o diagnóstico determinado apenas pelas características clínicas e epidemiológicas. Apenas após 1943, com o primeiro isolamento do vírus e a disponibilidade de testes diagnósticos, iniciou-se a era moderna de pesquisa com o vírus da dengue.

- 2) Plano continental para erradicação do *Ae. aegypti* (1947 – 1970): o programa foi, na realidade, executado com o objetivo de eliminar a febre amarela e, com exceção de poucos países, como a Venezuela, Cuba, o sul dos EUA e alguns países do Caribe, o vetor desapareceu do continente americano.

3) Reinfestação pelo *Ae. aegypti* (1971 – 1999): com a deterioração dos programas de controle de mosquitos na década de 60, o *Ae. aegypti* foi rapidamente reintroduzido a partir das áreas onde não havia sido erradicado, levando a surtos de dengue causados pelos diferentes sorotipos do vírus.

4) Aumento na dispersão do *Ae. aegypti* e da circulação do vírus da dengue (2000 – atual): a partir do ano 2000 houve um aumento sem precedentes do número de casos nas Américas, com circulação dos quatro sorotipos do vírus e atingindo o maior registro de casos, inclusive de casos graves, já relatados.

Além disso, na década de 80, foi introduzido no continente americano, inclusive no Brasil, o *Ae. albopictus*, um mosquito natural da Ásia oriental que também é um vetor competente para o DENV (FIGUEIREDO, 2000).

Essas mudanças epidemiológicas da dengue nas Américas reproduzem o mesmo que ocorreu na Ásia nas décadas de 50 e 60, com as infecções passando de um quadro endêmico de baixa letalidade para formas epidêmicas com casos graves e fatais (SCHATZMAYR, 2008).

No Brasil, após o plano de erradicação do *Ae. aegypti*, a circulação do vírus da dengue foi confirmada em 1982, quando foram isolados vírus da dengue dos sorotipos 1 (DENV-1) e 4 (DENV-4) em Boa Vista, Roraima (OSANAI et al., 1983). Este surto foi contido por medidas locais de controle do vetor e durante os quatro anos seguintes não foram notificados casos de dengue.

Foi após 1986, quando o DENV-1 foi introduzido no estado do Rio de Janeiro (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986), que a dengue se tornou um problema de saúde pública no país. A dispersão deste sorotipo foi responsável por várias epidemias em diversas regiões do Brasil. A situação se agravou em 1990 com a introdução do vírus da dengue do sorotipo 2 (DENV-2), também no Rio de Janeiro, e sua subsequente disseminação para outras regiões do país. Houve, a partir de então, uma mudança na epidemiologia da dengue no Brasil com a notificação de casos de dengue hemorrágica e óbitos anualmente (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007).

Após a introdução do vírus da dengue do sorotipo 3 (DENV-3) nas Américas em 1994 e sua rápida disseminação para ilhas do Caribe, foram intensificados os programas de vigilância virológica no estado do Rio de Janeiro. Como resultado, em dezembro de 2000, DENV-3 foi isolado a partir de um caso de febre da dengue e também de mosquitos *Ae. aegypti* coletados no município de Nova Iguaçu, Rio de

Janeiro (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2001). A introdução do DENV-3 levou a uma grave epidemia no Rio de Janeiro em 2002, com mais de 280.000 casos notificados, quase 2.000 do tipo hemorrágico e 91 óbitos. Em todo o Brasil, foram notificados cerca de 700.000 casos de dengue (Figura 12), a maioria nas regiões sudeste e nordeste. Este número correspondeu a 80% dos casos de dengue reportados nas Américas (NOGUEIRA et al., 2005).

Em 2010, foi isolado DENV-4 em Boa Vista, após 28 anos de ausência (NUNES et al., 2012; TEMPORÃO et al., 2011), levando a uma nova epidemia de dengue no país. A última epidemia, iniciada em 2013, teve um registro recorde de mais de um 1.400.000 casos (Figura 12), com casos notificados em todas as 27 unidades federativas do país (BRASIL, 2014e).

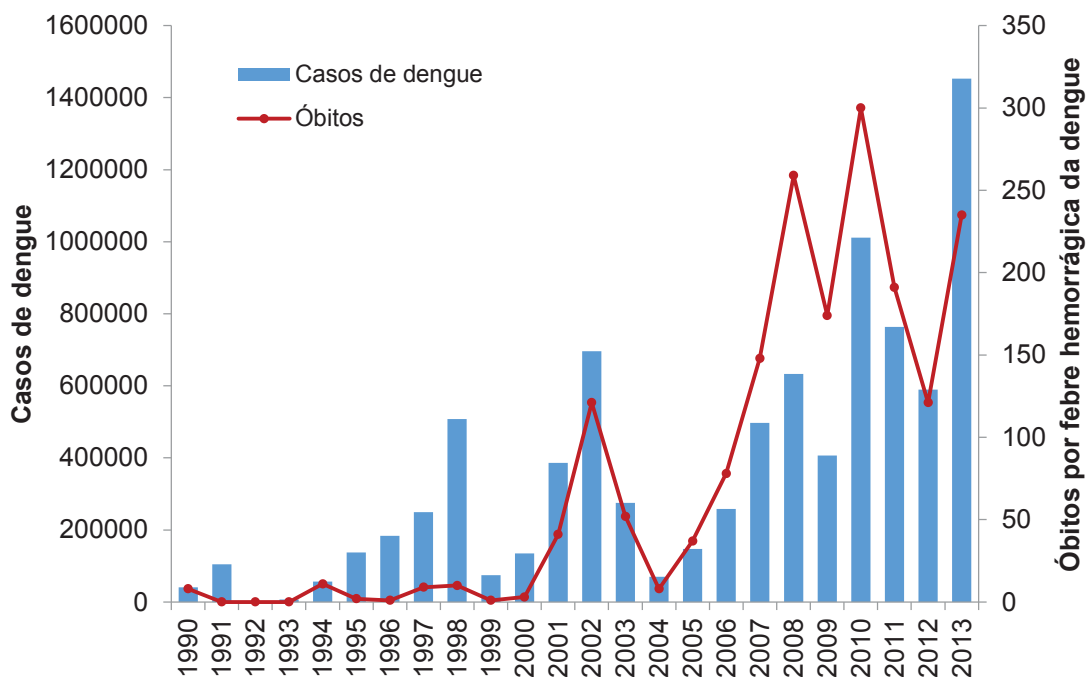


Figura 12 – Número de casos de dengue (barras azuis) e de óbitos por febre hemorrágica da dengue (linha vermelha) no Brasil nos anos de 1990 a 2013. FONTE: BRASIL (2014e).

2.2.2.2 Ciclos de Transmissão

Embora hoje a maioria das infecções em humanos é causada por cepas de DENV que dependem apenas de humanos como reservatórios e hospedeiros amplificadores, acredita-se que as formas ancestrais do vírus são as que circulam em

habitats florestais e estão envolvidas no ciclo silvestre da dengue (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

O ciclo silvestre tem sido demonstrado no sudeste da Ásia e na África (DIALLO et al., 2003; RUDNICK, 1966; VASILAKIS et al., 2011) e envolve primatas não humanos como hospedeiros e mosquitos arbóreos da tribo Aedini como vetores. Em áreas rurais da África e Ásia (também chamadas de “zonas de emergência”), onde vetores enzoóticos frequentemente atingem altas densidades e a população humana é pequena, o DENV pode ser transferido entre primatas não humanos e seres humanos. Mas o ciclo de transmissão mais importante do ponto de vista de saúde pública é o urbano endêmico/epidêmico, que ocorre em ambientes urbanos e periurbanos dos trópicos. Neste ciclo, o DENV é transmitido entre humanos pelo mosquito peridoméstico *Ae. aegypti*. Outras espécies como o *Ae. albopictus* e o *Ae. polynesiensis* podem servir como vetores secundários (Figura 13) (GUBLER, 1998; VASILAKIS; WEAVER, 2008).

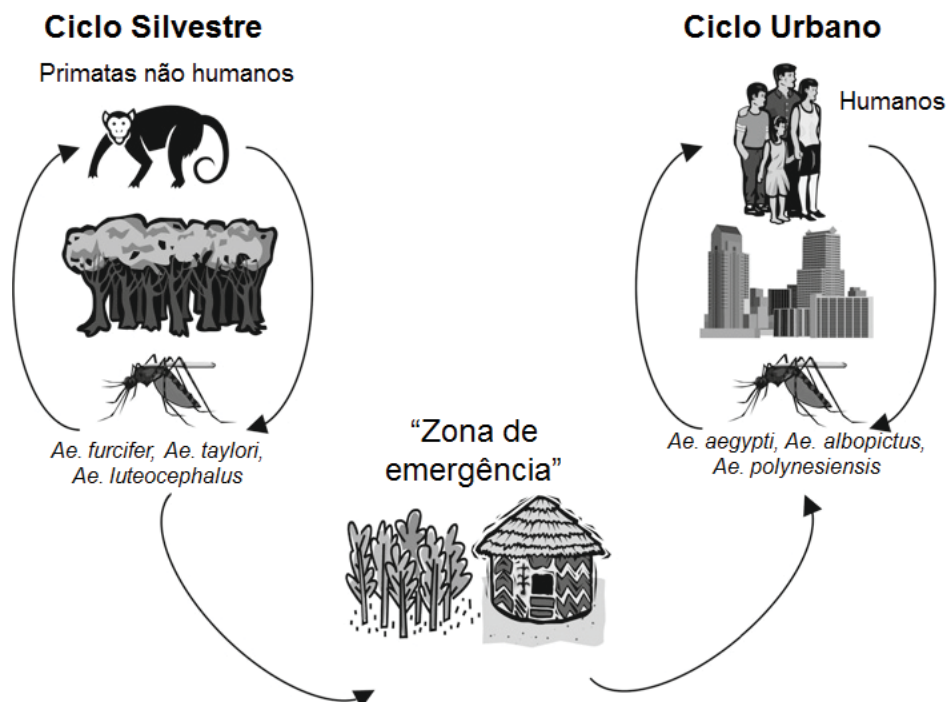


Figura 13 – Ciclos de transmissão do vírus da dengue demonstrando os principais vetores e hospedeiros vertebrados envolvidos. FONTE: Adaptado de VASILAKIS e WEAVER (2008).

A infecção pelo vírus da dengue ocorre através da picada de fêmeas de mosquitos das espécies citadas acima. Uma vez que um indivíduo foi picado por um mosquito infectado, o vírus inicia um período de incubação de 3 a 14 dias, após o qual pode causar febre e outros sintomas e sinais não específicos. Durante este período

febril agudo, que pode durar de 2 a 10 dias, o DENV pode circular no sangue periférico. Caso outro mosquito se alimente do sangue de um indivíduo durante este período, o mosquito poderá se infectar e, após um período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias, estará apto a transmitir o vírus para outras pessoas, completando assim o ciclo de transmissão (GUBLER, 1998).

2.2.2.3 Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção

A dengue é uma doença sistêmica e dinâmica, que, após o período de incubação, é seguida por três fases: febril, crítica e de recuperação (Figura 14) (WHO, 2009a). Os quatro sorotipos de DENV causam manifestações clínicas semelhantes e apresentam padrões de disseminação sistêmica similares, com tropismo principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas (ROTHMAN, 2011).

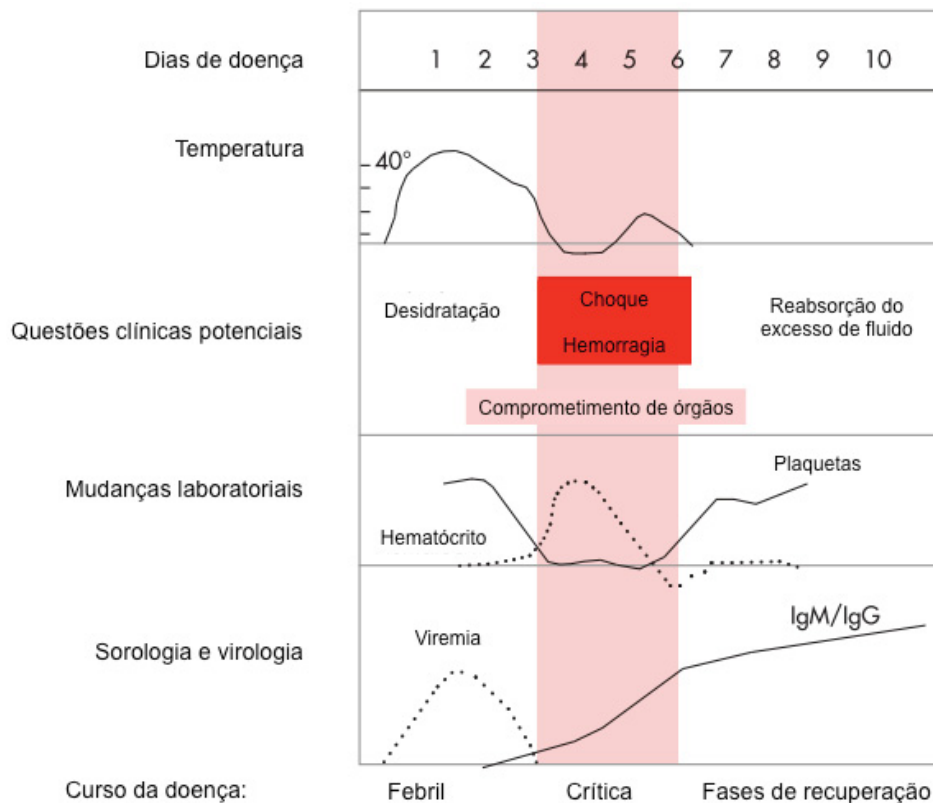


Figura 14 – Progressão da dengue. Doença clínica, temperatura corporal, alterações hematológicas, sorologia e viremia ao longo dos dias após a infecção. FONTE: Adaptado de WHO (2009a).

A maioria das infecções por DENV apresenta-se como uma infecção inaparente e a apresentação clínica mais comum é a febre da dengue (FD), uma febre indiferenciada. Os sinais e sintomas da infecção se resolvem sem complicação na grande maioria dos casos. Hemorragias espontâneas ou derrames de plasma, no entanto, podem aparecer no final da doença, resultando em formas mais severas e algumas vezes fatais, a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD) (ROTHMAN, 2011; WHO, 2009a).

De acordo com os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, os casos de dengue são classificados como (1) caso suspeito de dengue; (2) caso suspeito de dengue com sinais de alarme ou (3) caso suspeito de dengue grave. Um caso é considerado confirmado apenas quando houver confirmação laboratorial (WHO, 2009a).

A FD é caracterizada por febre alta (39° a 40°C), de início abrupto, acompanhado por náusea, vômitos, cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia e/ou exantema. Outras características comuns incluem leucopenia e trombocitopenia (com petéquias ou prova do laço positiva). Todos os casos em que o paciente resida ou tenha viajado nos últimos 14 dias para locais onde esteja ocorrendo a transmissão de dengue ou que tenha a presença do vetor *Ae. aegypti*, que apresente febre, usualmente entre 2 e 7 dias, e duas ou mais dessas manifestações de FD são considerados “casos suspeitos de dengue” (BRASIL, 2005; WHO, 2009a). A doença raramente é fatal e a fase aguda tem duração de 3 a 7 dias, mas pode ser acompanhada por um período de convalescência prolongado por várias semanas, com grande debilidade física (BRASIL, 2005; GUBLER, 1998; ROTHMAN, 2011).

Os casos em que, no período de defervescência, o paciente apresenta um ou mais dos sinais de alarme: dor abdominal intensa e contínua ou dor a palpação do abdômen, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascites, derrame pleural, pericárdico), sangramento de mucosas, letargia ou irritabilidade, hipotensão postural, hepatomegalia maior que 2 cm, aumento progressivo do hematócrito, são considerados “casos suspeitos de dengue com sinais de alarme” (WHO, 2009a).

Já os “casos suspeitos de dengue grave” são os casos com FHD, SCD e/ou com comprometimento grave de órgãos, tais como dano hepático importante (AST ou ALT > 1000), alteração de consciência, miocardite ou comprometimento de outros órgãos. Na FHD, os sintomas iniciais são semelhantes aos da FD, porém há um

agravamento do quadro entre o terceiro e o sétimo dia da doença. Esta é a fase crítica, quando a temperatura corporal cai para 37,5°C ou menos e o quadro evolui rapidamente, com aumento na permeabilidade vascular e as consequentes manifestações hemorrágicas, como petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia e hemorragia em diversos órgãos. A fragilidade capilar é evidenciada pela positividade da prova do laço. Nos casos graves de FHD, pode haver evolução para choque hipovolêmico, denominado de síndrome do choque da dengue (SCD), que ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido. A SCD é de curta duração e pode levar a óbito em 12 a 24 h ou à rápida recuperação, após terapia apropriada. Caracteriza-se por pulso rápido e fraco, com diminuição da pressão de pulso e arterial, extremidades frias, pele pegajosa e agitação, às vezes com manifestações neurológicas, como convulsões e irritabilidade (BRASIL, 2005; GUBLER, 1998; WHO, 2009a). Na fase de recuperação, ocorre uma reabsorção gradual do fluido do compartimento extravascular (WHO, 2009a).

Estudos indicam que a resposta imune adaptativa ao DENV tem aspecto protetor, mas em determinadas circunstâncias pode ser prejudicial. Após a infecção por um sorotipo de DENV (infecção primária), uma imunidade protetora de longa duração é gerada contra este sorotipo. Também há uma resistência transiente à infecção pelos demais sorotipos do vírus, porém esta imunidade heterotípica dura poucos meses. Após este período, os indivíduos estão susceptíveis à infecção pelos outros sorotipos (infecção secundária) (ROTHMAN, 2011).

Os casos de FHD/SCD ocorrem com maior frequência nas infecções secundárias. Um fenômeno bem conhecido na imunopatogênese da dengue envolve anticorpos potencializadores da infecção (*antibody-dependent enhancement* – ADE), que ocorre quando anticorpos heterotípicos não neutralizantes, provenientes de uma infecção por um dos sorotipos de DENV, opsonizam a partícula viral durante uma infecção subsequente por outro sorotipo de DENV. O complexo vírus-anticorpos subneutralizantes facilitaria a entrada do vírus em células fagocíticas que possuem receptores $Fc\gamma$, exacerbando a infecção e levando ao desenvolvimento de uma doença mais severa (HALSTEAD; O'ROURKE, 1977). Estudos sugerem que algo similar também ocorre com a resposta celular, onde a expansão predominante de células T com baixa avidéz para o sorotipo viral infectante (e com alta avidéz para o sorotipo da infecção primária) seria responsável por um atraso e uma diminuição no

controle da viremia e por um aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (MONGKOLSAPAYA et al., 2003).

A ocorrência de FHD/SCD e de óbitos em infecções primárias por DENV sugere que outros mecanismos também devem estar envolvidos, como diferenças na virulência entre variantes virais e fatores genéticos e o estado imunológico do paciente (GUZMAN; KOURI, 2008; LEITMEYER et al., 1999; ROSEN, 1977).

2.2.2.4 Diagnóstico

O Ministério da Saúde preconiza que sejam considerados casos suspeitos de dengue todos os casos de doença febril aguda, com duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, associados ou não à presença de hemorragias, e cujo paciente esteve, nos últimos quinze dias, em área onde esteja ocorrendo a transmissão de dengue ou tenha a presença de *Ae. aegypti*. Durante uma epidemia, o diagnóstico pode ser feito baseado apenas nos critérios clínico-epidemiológicos, exceto nos primeiros casos da área, nos casos em que haja alguma manifestação hemorrágica ou outro sinal de agravo e em gestantes (diagnóstico diferencial de rubéola), os quais deverão ter confirmação laboratorial. É importante ressaltar, no entanto, que a dengue é uma doença dinâmica, cujos sintomas podem facilmente ser confundidos com outras doenças febris e que pode evoluir rapidamente de um estágio a outro. O manejo adequado dos pacientes depende do reconhecimento precoce dos sinais de alerta, do contínuo monitoramento dos casos e da pronta reposição hídrica (BRASIL, 2005).

O diagnóstico laboratorial da dengue pode ser realizado por detecção do vírus, do ácido nucleico viral, de antígenos ou de anticorpos ou com uma combinação destas técnicas (Figura 15). A escolha do método depende do propósito para o qual o teste é realizado (diagnóstico clínico, estudo epidemiológico, desenvolvimento de vacina), do tipo de instalações laboratoriais e conhecimentos técnicos disponíveis e do curso da doença e tempo de coleta da amostra. Em geral, os testes para isolamento viral e detecção do ácido nucleico são mais laboriosos e possuem maior custo, porém

também são mais específicos que a detecção de anticorpos por métodos sorológicos (WHO, 2009a).

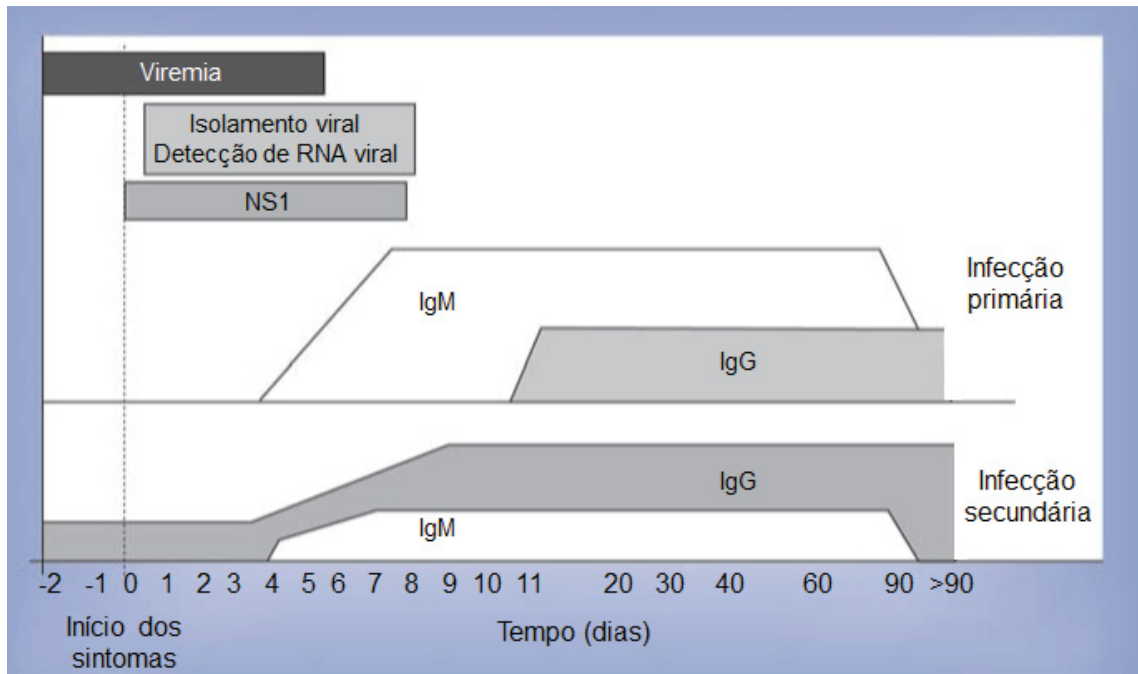


Figura 15 – Janela de detecção aproximada dos testes para diagnóstico de dengue. FONTE: Adaptado de TANG e OOI (2012).

A detecção direta do vírus ou de seus componentes (ácido nucleico ou antígenos) pode ser utilizada para um diagnóstico precoce, definitivo e sorotipo-específico de uma infecção por DENV (PEELING et al., 2010). A detecção do vírus é baseada no seu isolamento em cultura de células (usando linhagens de células de mosquitos ou de mamíferos), diretamente em mosquitos ou em cérebro de camundongos recém-nascidos, associado a imunofluorescência com anticorpos específicos. O vírus pode ser detectado a partir de soro, plasma, células sanguíneas e outros tecidos obtidos de autópsia (como fígado, baço, linfonodos, pulmão e timo) até aproximadamente cinco dias após o início dos sintomas (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Já a detecção do ácido nucleico viral pode ser realizada por RT-PCR (LANCIOTTI et al., 1992) ou por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) (DROSTEN et al., 2002) e também permite a identificação do sorotipo viral.

Um método mais simples para diagnóstico precoce consiste na detecção do antígeno NS1 por ELISA ou por teste imunocromatográfico. Os níveis de NS1 no soro ou plasma têm sido correlacionados com os títulos de viremia e com a gravidade da doença e puderam ser detectados até nove dias após o início dos sintomas

(DUSSART et al., 2006; HANG et al., 2009; LIBRATY et al., 2000). Em casos fatais, a detecção de antígenos virais pode ainda ser realizada por imunohistoquímica em secções de tecido, utilizando anticorpos monoclonais e um marcador para visualização, como marcadores fluorescentes, enzimáticos ou ouro coloidal (PEELING et al., 2010).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos (IgM e IgG) anti-DENV, juntamente com a detecção de NS1, são os mais amplamente utilizados devido a maior facilidade de execução, quando comparados com os métodos de isolamento e de detecção de RNA viral (PEELING et al., 2010). Entre os testes sorológicos, o ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) tornou-se o método mais utilizado. Em uma infecção primária, em 50% dos casos os níveis de IgM podem ser detectados precocemente, antes do quinto dia após o início dos sintomas. Esse percentual aumenta para 99% dez dias após o início dos sintomas. O pico ocorre cerca de duas semanas após o início dos sintomas e declina geralmente para níveis indetectáveis após 60 a 90 dias. Por outro lado, em infecções secundárias, os níveis de IgM são baixos e, em alguns casos, até indetectáveis dependendo do teste utilizado (Figura 15) (WHO, 2009a). Por isso, diante de um caso em que critérios clínico-epidemiológicos são compatíveis com dengue, mesmo com um resultado negativo no MAC-ELISA, é recomendado a pesquisa de IgG anti-DENV, preferencialmente com coleta de amostras pareadas (NOGUEIRA, 2008).

Os níveis de IgG anti-DENV normalmente são mais altos nas infecções secundárias, com detecção mesmo durante a fase aguda da doença e persistindo por mais de dez meses ou até por toda a vida. Os títulos de anticorpos aumentam rapidamente e, em geral, possuem reatividade cruzada com outros flavivírus. Em infecções primárias, os níveis de IgG séricos são detectáveis em baixos títulos ao final da primeira semana da doença, aumentando lentamente a partir de então e podendo ser detectado por vários meses ou até por toda a vida (Figura 15) (WHO, 2009a). No caso de diagnóstico por meio da detecção de IgG, é considerada infecção recente quando há um aumento de pelo menos quatro vezes nos níveis séricos de IgG em amostras pareadas. Esse diagnóstico pode ser realizado por ELISA, inibição de hemaglutinação, fixação do complemento e PRNT (GUZMÁN; KOURÍ, 2004). Além disso, a detecção de IgM e de IgG em amostras pareadas possibilita a distinção entre uma infecção primária e uma secundária por DENV (SCHILLING et al., 2004).

Diversos imunoenaios para diagnóstico de dengue, como ensaios do tipo ELISA, imunocromatográficos e *dot-blot*, estão disponíveis comercialmente (GROEN et al., 2000; VAUGHN et al., 1998; WHO, 2009b; WU et al., 1997). Porém, não existe nenhum teste validado no Brasil utilizando antígenos de vírus circulantes no país.

2.2.3 Vírus da Encefalite de Saint Louis e Vírus do Oeste do Nilo

2.2.3.1 Vírus da Encefalite de Saint Louis – Histórico

O SLEV foi identificado pela primeira vez em 1933 como a causa de doença em humanos durante uma epidemia urbana em Saint Louis, Missouri, Estados Unidos (LUMSDEN, 1958). Casos também ocorreram em Kansas, em outras regiões de Missouri, Illinois e Kentucky. O vírus responsável por esta epidemia, posteriormente chamado SLEV, foi isolado por inoculação intracerebral de suspensões de sistema nervoso central de humanos de casos fatais em camundongos e em macacos *Rhesus* (WEBSTER; FITE, 1933). Em retrospecto, em 1932, uma epidemia de encefalite em Paris, Illinois, provavelmente também foi causada pelo SLEV (LUBY, 1979). As características epidemiológicas desta epidemia, incluindo a correlação entre os casos de encefalite por SLEV, um verão cálido e alta abundância de mosquitos do gênero *Culex*, permanecem como uma marca das epidemias causadas por este vírus (REISEN, 2003).

A distribuição do SLEV é restrita ao continente americano, mas com ampla disseminação desde o sul do Canadá até a Argentina (Figura 16). Nos Estados Unidos, mais de 1.000.000 de infecções, com cerca de 10.000 casos graves da doença e 1.000 mortes já foram registrados desde 1933 (PIERSON; DIAMOND, 2013; REISEN, 2003). Apesar disso, o primeiro surto de SLEV fora da América do Norte ocorreu na Argentina em 2005 (DIAZ et al., 2006; SPINSANTI et al., 2008). As epidemias causadas por SLEV são relativamente raras, porém, quando há condições ambientais favoráveis à amplificação viral, podem ser extensivas, tanto no número de casos, quanto na extensão territorial de transmissão da doença (DAY, 2001; SOLOMON, 2004).

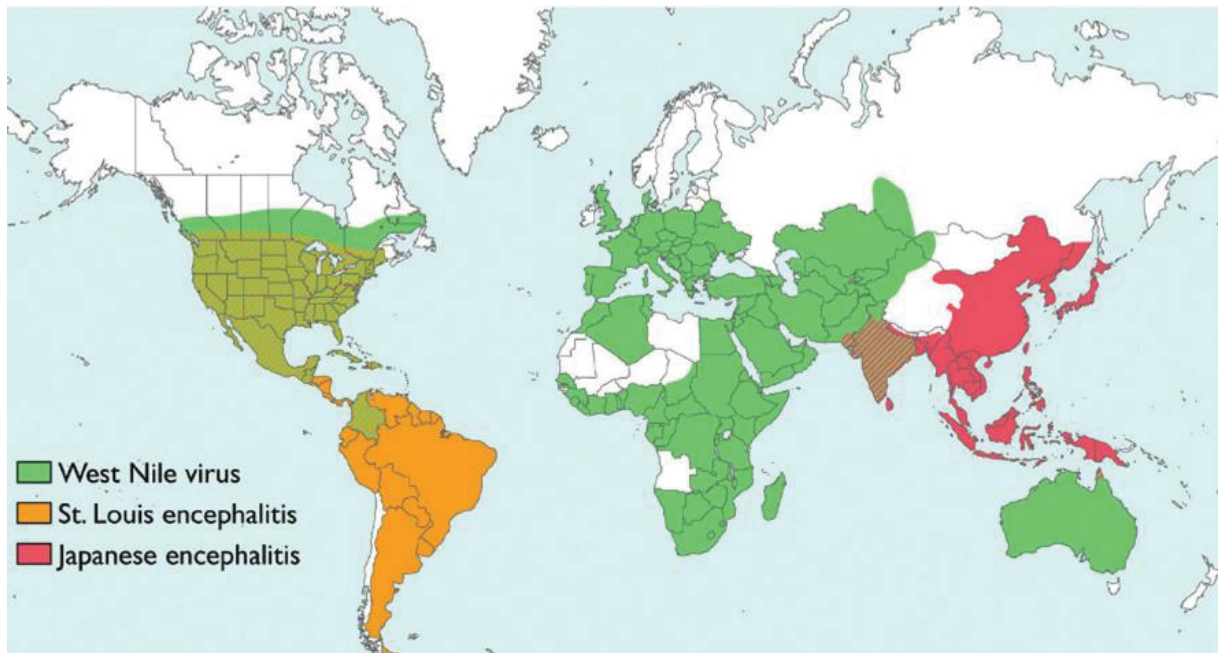


Figura 16 – Distribuição do vírus do oeste do Nilo (verde), do vírus da encefalite de Saint Louis (amarelo) e do vírus da encefalite japonesa (JEV – vermelho) no mundo. O JEV é um flavivírus antigenicamente relacionado ao WNV e ao SLEV. FONTE: PIERSON e DIAMOND (2013).

No Brasil, o SLEV foi isolado pela primeira vez em 1960 a partir de um *pool* de mosquitos *Sabethes belisarioi* capturados ao longo da rodovia Belém-Brasília (CAUSEY; SHOPE; THEILER, 1964) e, posteriormente, na região sudeste, de animais sentinelas, roedores e aves (LOPES et al., 1979). Uma ampla distribuição do SLEV nas regiões amazônica, sul e sudeste foi verificada por evidências sorológicas em aves, animais sentinela e humanos (IVERSSON, 1994; LOPES et al., 1979; LUBY; SULKIN; SANFORD, 1969; SVOBODA et al., 2014), porém o isolamento do vírus a partir de amostras humanas é raro. Antes de 2004, o SLEV foi isolado de dois pacientes da região amazônica que apresentavam doença febril com icterícia, mas sem sintomas neurológicos (MONDINI et al., 2007a). Em 2004, foi isolado de um paciente com doença febril, inicialmente com suspeita de dengue, da cidade de São Pedro (SP) (ROCCO et al., 2005). Em 2006, um surto de SLEV ocorreu concomitantemente com uma epidemia generalizada causada por DENV-3 e envolveu pelo menos 14 casos em São José do Rio Preto (SP) (MONDINI et al., 2007a; TERZIAN et al., 2011). Neste surto, um caso de infecção simultânea por SLEV e DENV-3 foi observado (MONDINI et al., 2007b). Em abril de 2008, mais um caso de doença febril aguda, inicialmente diagnosticado como dengue, foi reportado em Ribeirão Preto (MAIA et al., 2014).

O SLEV provavelmente se dispersou pelas Américas por aves migratórias de longa distância. Isso pode ser evidenciado pelo isolado brasileiro SLEV 68, por ex., que apesar de isolado no Brasil, pode ser agrupado filogeneticamente com cepas dos Estados Unidos (TWIDDY; HOLMES, 2003). Já o vírus isolado de paciente em 2004 se apresentou filogeneticamente distinto dos demais isolados brasileiros de SLEV previamente caracterizados, apresentando maior similaridade com o isolado argentino 79V-2533, isolado de mosquitos *Culex* sp. em 1979 (SANTOS et al., 2006). Além disso, junto com a disseminação do vírus pelas Américas, mutações causadas por infecções simultâneas por duas cepas distintas têm ocorrido, como é o caso do isolado Guatemala 69, que mostrou uma combinação de sequências nucleotídicas de isolados da Argentina e dos Estados Unidos no gene da proteína E (TWIDDY; HOLMES, 2003).

2.2.3.2 Vírus do Oeste do Nilo – Histórico

O WNV foi isolado pela primeira vez em 1937 a partir do sangue de uma paciente com quadro febril no distrito de West Nile em Uganda, na África (SMITHBURN et al., 1940). Diversas epidemias foram documentadas antes da década de 90, algumas envolvendo centenas a milhares de casos, em populações majoritariamente rurais, mas raramente levando a complicações neurológicas. A partir da década de 90, no entanto, a infecção por WNV vem causando epidemias associadas a doença humana atipicamente grave, com complicações neurológicas e morte, em vários países da América, Europa, Ásia, África e Oceania. Epidemias ocorreram na Argélia, Romênia, Tunísia, Rússia e Israel (FEKI et al., 2005; LE GUENNO et al., 1996; PLATONOV et al., 2001; TRIKI et al., 2001; TSAI et al., 1998; WEINBERGER et al., 2001). A epidemia na Romênia, em 1996, representou a primeira grande epidemia por WNV em área urbana (TSAI et al., 1998). Também foram descritas epizootias em cavalos em Marrocos, na Itália, na França e em Israel (AUTORINO et al., 2002; MURGUE et al., 2001; STEINMAN et al., 2002; TBER, 1996). Em 1998, em Israel, uma mortalidade anormal relacionada a infecção por WNV foi observada em cegonhas migratórias e gansos domésticos (MALKINSON et al., 2002). Na última década, outros casos ocorreram na Rússia, África do Sul, Hungria, Romênia

e Itália (KRISZTALOVICS et al., 2008; PLATONOV et al., 2008; POPOVICI et al., 2008; ROSSINI et al., 2008; VENTER et al., 2009).

No verão de 1999, um surto de meningite e encefalite na cidade de Nova Iorque sinalizou que o vírus havia sido introduzido na América do Norte (NASH et al., 2001). A sequência da cepa New York 1999 (NY99), isolada a partir de um flamingo morto no zoológico do Bronx, mostrou maior identidade com um isolado viral de Israel (LANCIOTTI et al., 1999). Isso sugere que o WNV foi introduzido a partir do Oriente Médio, mas como o vírus atravessou o oceano Atlântico ainda é um mistério. Desde então, é considerado endêmico nos EUA e já causou dezenas de milhares de casos, com mais de 1.000 mortes (ROSSI; ROSS; EVANS, 2010). A partir dos EUA, em 2001, o WNV se disseminou para o Canadá e ilhas do Caribe (DREBOT et al., 2003; KOMAR; CLARK, 2006). Em 2002, foram registrados cavalos e galinhas infectados por WNV em Guadalupe, aves na República Dominicana e cavalos no México (KOMAR; CLARK, 2006). Em 2003, se disseminou para El Salvador, Guatemala, Belize, Cuba, Porto Rico e Bahamas e, em 2004, para o Haiti, Trinidad, Colômbia e Venezuela. Esses foram os primeiros registros de WNV na América do Sul (BEATTY et al., 2007; BOSCH et al., 2007; KOMAR; CLARK, 2006). Finalmente, aves (em 2005) e cavalos (em 2006) infectados com WNV foram identificados na Argentina (DIAZ et al., 2008; MORALES et al., 2006).

No Brasil, a primeira evidência da circulação de WNV foi pela detecção de anticorpos neutralizantes em cavalos da Nhecolândia, no Pantanal (MS), em 2009 (PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011). Outros estudos verificaram a presença de anticorpos neutralizantes para WNV em cavalos e/ou em aves no Pantanal, em outras regiões do Mato Grosso do Sul, no Mato Grosso e no Paraíba (MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2014; SILVA et al., 2013). Recentemente, em novembro de 2014, o Ministério da Saúde confirmou o primeiro caso de febre do oeste do Nilo em humano no Brasil. Trata-se de um trabalhador rural do Piauí, que apresentava encefalite e cujo caso estava sob investigação desde agosto. A doença foi confirmada após a realização de exames sorológicos (inibição de hemaglutinação, ELISA e PRNT) (BRASIL, 2014a).

Um mapa com a distribuição do WNV pelo mundo está ilustrado na Figura 16. Uma ilustração mais completa sobre a distribuição do WNV nas Américas está demonstrada na Figura 17.

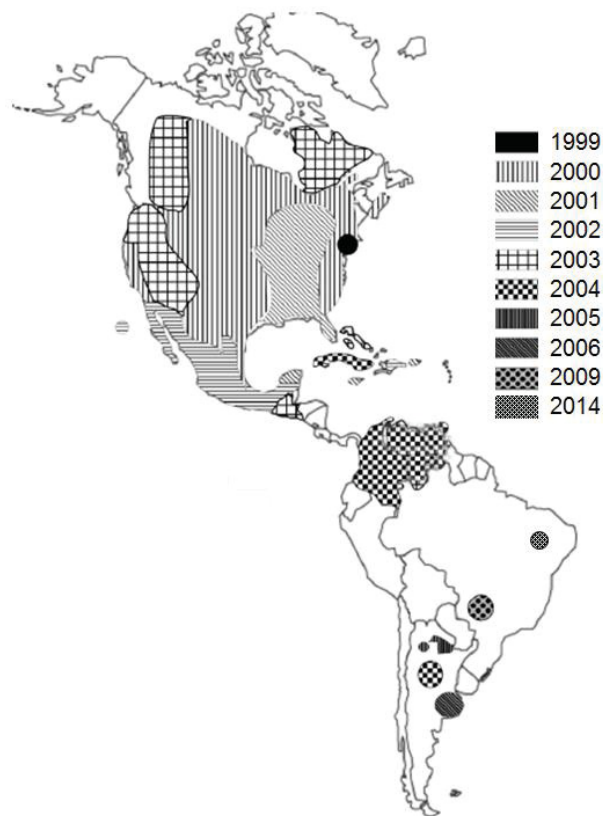


Figura 17 – Distribuição do vírus do oeste do Nilo no continente americano desde sua introdução nos Estados Unidos em 1999. FONTE: Adaptado de DÍAZ et al. (2011).

Entre os reservatórios para o WNV, fazem parte algumas aves migratórias de longas distâncias, o que explica a rápida disseminação deste vírus para os demais países da América do Norte (FIGUEIREDO, 2007). Surpreendentemente, porém, um pequeno número de casos tem sido reportado na América Latina e no Caribe. Algumas hipóteses foram levantadas para tentar explicar a ausência de epidemias nos países ao sul dos Estados Unidos: (1) a propagação do WNV através de aves migratórias poderia selecionar cepas virais atenuadas, se cepas mais virulentas prejudicarem a migração das aves; (2) a infecção prévia por outros flavivírus, como o vírus da dengue, poderia gerar proteção cruzada contra a doença severa causada pelo WNV; (3) condições ecológicas nas regiões tropicais poderiam selecionar as cepas menos virulentas; ou (4) a ausência de vigilância epidemiológica ou de testes laboratoriais específicos poderia prejudicar a detecção da doença causada pelo WNV (PETERSEN; HAYES, 2008), o que ressalta a importância de testes diagnósticos sensíveis e inequívocos para diagnóstico deste vírus no Brasil. Ainda não se sabe se alguma dessas hipóteses, individualmente ou em combinação, é a responsável pela baixa incidência da doença causada pelo WNV na América Latina.

2.2.3.3 Ciclos de Transmissão

O SLEV e o WNV são mantidos na natureza em ciclos mosquito-ave-mosquito, com mosquitos do gênero *Culex* como principais vetores e aves como hospedeiros amplificadores (Figura 18). O homem e animais domésticos constituem hospedeiros finais, uma vez que a viremia é transiente e em baixos títulos, sendo insuficiente para infectar o mosquito vetor (PIERSON; DIAMOND, 2013). A ecologia do ciclo básico, no entanto, varia regionalmente, dependendo da biologia e competência vetorial das espécies de mosquito regionais, da virulência da cepa viral e da susceptibilidade dos hospedeiros vertebrados da região (REISEN, 2003).

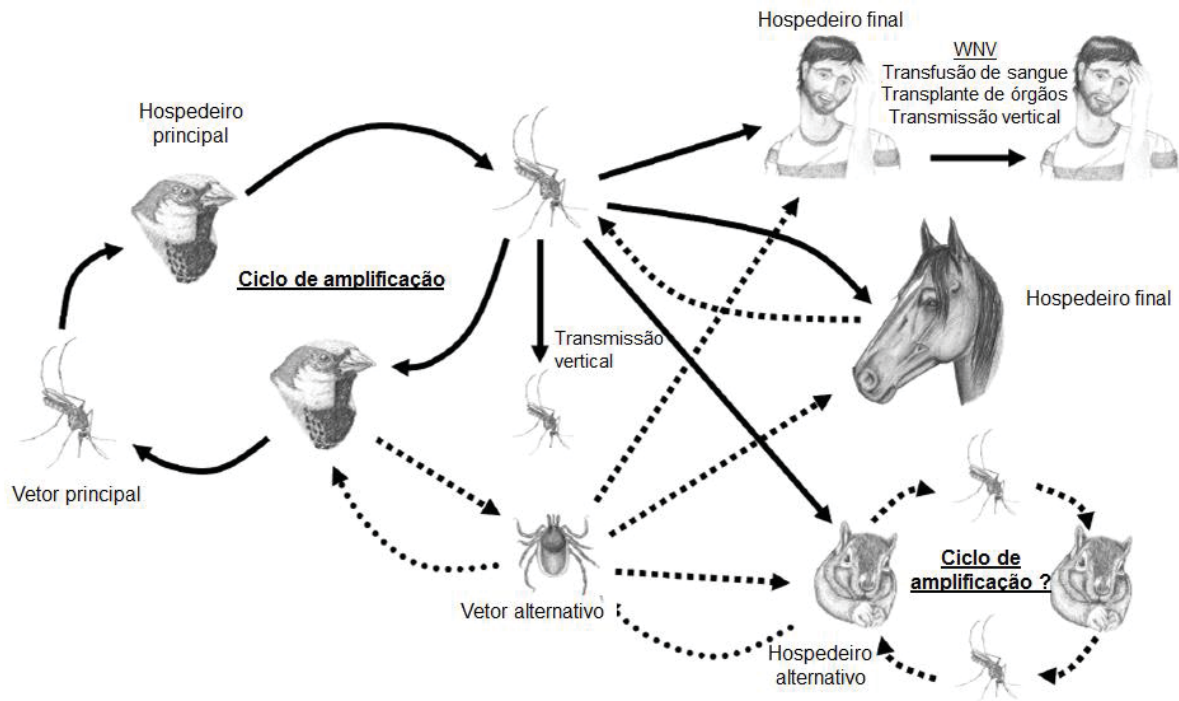


Figura 18 – Ciclo de transmissão do vírus do oeste do Nilo (WNV) e do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV). O ciclo principal e de amplificação envolve mosquitos do gênero *Culex* e aves. O homem e outros animais domésticos são hospedeiros finais. Ciclos alternativos podem envolver mamíferos como hospedeiros ou carrapatos como vetores. Com linhas cheias estão ilustradas as vias tradicionais de transmissão e com linhas pontilhadas, as vias alternativas. A transmissão entre humanos foi demonstrada apenas para o WNV. FONTE: Adaptado de DÍAZ et al. (2011).

Nas regiões tropicais, os ciclos do SLEV e do WNV se mantêm por todo o ano, devido à presença permanente do vetor e de fatores ambientais que permitem o desenvolvimento dos mesmos. Em regiões temperadas, por outro lado, onde o inverno se caracteriza por ser frio e seco, o ciclo destes vírus se caracteriza por diferentes

fases durante o ano: uma fase de amplificação na primavera, seguida por uma de atividade durante o verão, um descenso durante o outono e *overwintering* (“hibernação”) no inverno. Ainda é desconhecido como é o mecanismo de *overwinter*, mas algumas hipóteses têm sido postuladas, como a persistência viral em artrópodes hematófagos hibernantes, a transmissão vertical, infecção crônica de hospedeiros vertebrados, a reintrodução periódica a partir de outras áreas endêmicas e a participação de outros artrópodes hematófagos (como carrapatos) como vetores alternativos (MITCHELL; FRANCY; MONATH, 1980).

O ciclo do SLEV tem as aves das ordens Passeriformes e Columbiformes como os principais hospedeiros vertebrados e mosquitos do gênero *Culex* como principais vetores. As aves sustentam uma infecção inaparente, mas desenvolvem viremia suficiente para infectar os mosquitos vetores (HAMMON; REEVES; GRAY, 1943; REISEN, 2003). O SLEV já foi isolado de 11 gêneros diferentes de mosquitos e uma variedade de mamíferos foi encontrada infectada. Ciclos alternativos de transmissão envolvendo mamíferos ao invés de aves, bem como mosquitos atípicos, pertencentes a outros gêneros que não o *Culex* têm sido reportados (Figura 18). Ainda não se sabe, porém, se esses hospedeiros alternativos são hospedeiros finais ou se podem manter eficientes ciclos alternativos de transmissão (KOPP et al., 2013; PIERSON; DIAMOND, 2013).

No caso do WNV, mosquitos do gênero *Culex* são os principais vetores e aves da ordem Passeriformes os principais hospedeiros do ciclo de transmissão. Apesar disso, o WNV pode infectar pelo menos 12 gêneros de mosquitos, além de diferentes espécies de carrapatos, e pelo menos 225 espécies de aves e 29 de animais vertebrados (WEAVER; BARRETT, 2004; ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004). A infecção em aves pode variar desde uma infecção inaparente até causar a morte. Algumas espécies de aves, principalmente da família Corvidae (ordem Passeriformes), são altamente susceptíveis a infecção fatal (KOMAR, 2003). Os pássaros que sucumbem à infecção, em geral, morrem nas primeiras 24 h após o início dos sinais clínicos, ainda durante o período de viremia, o que tem sido uma forma de facilitar a transmissão do vírus. Com notável exceção de aves e cavalos, não é comum o WNV causar doença em outros vertebrados (BLITVICH, 2008).

Além da transmissão por meio da picada de mosquito infectado, também tem sido demonstrada a transmissão de WNV por transfusão de sangue, doação de órgãos, por via intrauterina e pela amamentação (Figura 18) (CENTERS FOR

DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2002; ERTILAV et al., 2014; HARRINGTON et al., 2003; IWAMOTO et al., 2003).

Ainda não é totalmente conhecido como a introdução do WNV na América do Norte impactou a epidemiologia do SLEV. Estudos em tentilhões-comuns (*Carpodacus mexicanus*) demonstraram que a infecção prévia por WNV leva a proteção cruzada contra SLEV. Por outro lado, a infecção prévia por SLEV previne a morte por WNV, mas não impede a infecção e a ocorrência de viremia suficiente para transmissão do WNV (FANG; REISEN, 2006). Resultado semelhante foi obtido em um estudo em hamsters (TESH et al., 2002).

2.2.3.4 Patogênese e Aspectos Clínicos da Infecção

Estudos de soroprevalência indicam que aproximadamente 80% dos casos de infecção por WNV em humanos são assintomáticos, enquanto 20-30% apresentam os sinais clássicos da febre do oeste do Nilo. Apenas 1% das infecções sintomáticas evolui para uma doença neuroinvasiva, caracterizada por meningite e/ou encefalite (MURRAY; WALKER; GOULD, 2011).

Os sinais da febre do oeste do Nilo se iniciam após um período de incubação que varia entre 2 e 14 dias (em geral, 3 a 6 dias) e a doença se apresenta clinicamente com sintomas como febre, fadiga, mal-estar, linfadenopatia, dor periocular, sintomas gastrointestinais, como vômitos, náuseas e dor abdominal, dores de cabeça e musculares e, ocasionalmente, erupção cutânea maculopapular (MURRAY; WALKER; GOULD, 2011). Outras manifestações clínicas mais graves incluem hepatite, pancreatite, miocardite, rabdomiólise, manifestações oculares e disritmias cardíacas (HAYES et al., 2005). Além disso, embora a maioria dos sintomas se resolva após uma semana, alguns podem persistir por mais de 30 dias, como fadiga e dor muscular (MURRAY; WALKER; GOULD, 2011).

Pacientes com mais de 50 anos de idade têm maior risco de desenvolver doença neuroinvasiva (LINDSEY et al., 2010). Clinicamente, pode se apresentar como meningite e/ou encefalite. Nos casos de encefalite, são observadas alterações mentais, como confusão, desorientação e coma, com mortalidade em 15% dos casos (MURRAY; WALKER; GOULD, 2011). Nos casos de encefalite e meningoencefalite,

o aspecto macroscópico do cérebro é normal. Microscopicamente, os achados histológicos incluem inflamação perivascular, nódulos microgliais, necrose e morte neuronal (HAYES et al., 2005).

Em aproximadamente 5-15% dos pacientes com doença neuroinvasiva, o WNV ocasiona uma paralisia flácida assimétrica semelhante à poliomielite, quando há injúria de neurônios motores, ou semelhante à síndrome de Guillain-Barré, quando há polineuropatia inflamatória desmielinizante, levando a sintomas que variam desde uma simples fraqueza das extremidades até quadriplegia incluindo paralisia dos músculos respiratórios (MURRAY; WALKER; GOULD, 2011).

Assim como os demais vírus abordados neste trabalho, o WNV é inoculado por meio da picada de um mosquito infectado. O vírus replica inicialmente na pele, nas células de Langerhans, e então se dissemina para os linfonodos e para a corrente sanguínea (DIAMOND et al., 2003). Essa viremia (3 a 4 dias após a infecção – Figura 19) contribui para a disseminação inicial do vírus e resulta na infecção de tecidos periféricos, como baço, fígado e rins (DONADIEU et al., 2013). A ação de anticorpos do tipo IgM (produzidos a partir do quarto dia após a infecção – Figura 19), de interferon e do sistema complemento resultam na eliminação do vírus do sangue e dos órgãos periféricos cerca de uma semana após a infecção, embora sequelas a longo prazo, como fadiga, fraqueza muscular, tremores, anormalidades na coordenação motora e dificuldade de concentração tenham sido relatadas (DIAMOND et al., 2003; DONADIEU et al., 2013; OYER; BECKHAM; TYLER, 2014). A infecção do sistema nervoso central (SNC) pode ser observada a partir do quinto dia, desde que a replicação periférica do vírus tenha sido suficiente (Figura 19).

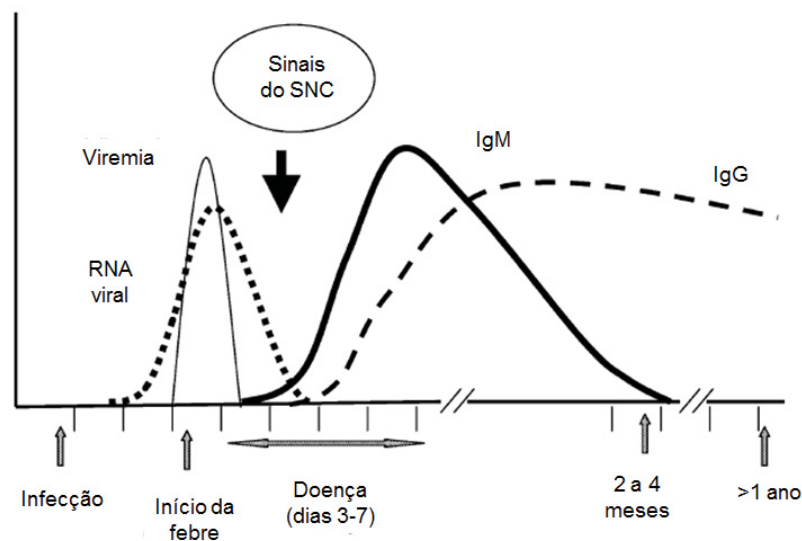


Figura 19 – Cinética de viremia e produção de anticorpos em uma infecção pelo vírus do oeste do Nilo. Uma cinética semelhante é verificada para o SLEV. FONTE: Adaptado de ZELLER e SCHUFFENECKER (2004).

O mecanismo pelo qual o WNV entra no SNC ainda não é bem compreendido e pode depender da via de infecção e da patogenicidade da cepa viral (BEASLEY; SUDERMAN; BARRET, 2002). Três principais mecanismos têm sido propostos: (1) entrada através da barreira hematoencefálica diretamente via leucócitos infectados; (2) leucócitos infectados atuando como apresentadores de antígeno estimulariam receptores do tipo Toll (TLR-3), levando a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α , e ao consequente aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica; (3) entrada via transporte axonal retrógrado após infecção de células do sistema nervoso periférico. No SNC, células da micróglia e astrócitos infectados liberam mediadores pró-inflamatórios, que causam morte neuronal (DONADIEU et al., 2013).

O WNV pode causar encefalite severa em diferentes espécies de vertebrados, incluindo humanos, cavalos e aves. Isso ocorre devido à sua capacidade de infectar e causar danos e perdas neuronais em diversas regiões do SNC, por mecanismos diretos (induzidos pelo próprio vírus) e indiretos (induzidos pela resposta imune), resultando assim em encefalite. Em casos não fatais, o vírus parece ser eliminado pela resposta imune do hospedeiro (DONADIEU et al., 2013; PIERSON; DIAMOND, 2013).

Menos estudos têm sido realizados sobre a patogênese da infecção por SLEV. Assim como para o WNV, a maioria das infecções por SLEV são assintomáticas ou subclínicas e a maior parte das infecções sintomáticas são caracterizadas como

uma doença febril (PIERSON; DIAMOND, 2013). Em adultos, as infecções sintomáticas ocorrem em cerca de 1:300 indivíduos expostos ao vírus, mas, dependendo da virulência da cepa viral e da história de infecção na população, essa razão pode ser de 1:16 a 1:425 (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014; PIERSON; DIAMOND, 2013).

A doença clínica resultante da infecção por SLEV pode ser dividida em três síndromes: (1) doença febril, cujos sintomas são muito parecidos aos da febre do oeste do Nilo; (2) meningite asséptica, com febre alta e rigidez na nuca; (3) encefalite (incluindo meningoencefalite e encefalomielite), com febre alta, alterações da consciência e/ou disfunção neurológica. Os sintomas da doença febril se iniciam após um período de incubação de 5-15 dias e podem rapidamente evoluir para encefalite ou progredir gradualmente passando pelas três síndromes (REISEN, 2003). Em pacientes com menos de 20 anos, 40% desenvolvem meningite e 50%, encefalite. Em pacientes com idade superior a 60 anos, esses percentuais aumentam para 90%. A taxa de mortalidade em humanos varia de 4-27%. Além disso, 47% dos pacientes apresentam convulsões e 6% dos casos de encefalite têm sido associados a polineuropatia inflamatória desmielinizante (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014). Embora a maioria dos casos se resolva espontaneamente sem sequelas, 30-50% dos pacientes passam por um período de convalescência prolongado que pode durar até três anos. Essa fase é caracterizada por dor de cabeça, depressão, perda de memória e fraqueza (PIERSON; DIAMOND, 2013; REISEN, 2003).

2.2.3.5 Diagnóstico

Atualmente, vários testes para diagnósticos de infecção por SLEV ou WNV estão disponíveis e eles podem ser divididos em isolamento viral, testes sorológicos, detecção de antígenos virais e amplificação de ácido nucleico viral. Os diagnósticos por imagem, eletroencefalograma e eletromiograma também podem auxiliar no diagnóstico, mas eles não são específicos para essas infecções. Em geral, os testes sorológicos a partir de amostras de sangue e/ou líquido são os de escolha para um diagnóstico definitivo (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014; REISEN, 2003).

O isolamento viral a partir do soro de pacientes com encefalite causada por flavivírus raramente é bem sucedido, uma vez que a viremia costuma ser transiente e em baixos títulos (SOLOMON, 2004). Alguns isolamentos foram realizados a partir do líquido de pacientes que ainda não tinham anticorpos e de tecido cerebral *post-mortem* (HUANG et al., 2002; IWAMOTO et al., 2003). Testes para detecção do RNA viral (como RT-PCR ou qRT-PCR) ou de antígenos virais (como imuno-histoquímica e imunofluorescência utilizando anticorpos monoclonais) também podem ser realizados a partir de soro, líquido ou amostras de tecidos, desde que as amostras sejam coletadas logo no início do curso da doença. Eles são particularmente úteis no caso de indivíduos imunocomprometidos com viremia prolongada (DREBOT et al., 2003; ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004). Métodos para detecção de RNA viral bastante específicos e capazes de detectar quantidades muito pequenas de RNA têm sido desenvolvidos, mas o fato da viremia normalmente acabar quando surgem os sintomas clínicos, reduz a sua utilidade e um resultado negativo deve ser complementado com um ensaio sorológico (DREBOT et al., 2003; HOWE et al., 1992; LANCIOTTI et al., 2000).

O teste mais amplamente utilizado para diagnóstico dessas viroses é o ELISA de captura de IgM a partir de amostras de soro ou de líquido (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014). Anticorpos do tipo IgM normalmente são detectados quando os sintomas neurológicos aparecem (Figura 19) e a presença de IgM no líquido sugere doença neuroinvasiva (ZELLER; SCHUFFENECKER, 2004). Em alguns pacientes, porém, as IgM podem persistir por mais de um ano e pode ser necessário mais estudos para distinguir uma infecção aguda de uma infecção passada (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014; ROEHRIG et al., 2003). Além do MAC-ELISA, recentemente foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration* – USA) um teste imunocromatográfico para detecção de IgM anti-WNV em amostras de soro e plasma. Esse teste apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA para detecção de IgM e demora apenas alguns minutos para ser realizado (SAMBOL; HINRICHS, 2009).

Anticorpos do tipo IgG normalmente são detectados logo após as IgM e persistem por vários anos (Figura 19). Por isso, a presença de IgG evidencia apenas que houve uma infecção prévia. Um diagnóstico definitivo de infecção recente se baseia na detecção de um aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos entre uma amostra aguda (1-7 dias após o início dos sintomas) e

convalescente (2-3 semanas após os sintomas). Isso pode ser demonstrado por ELISA para detecção de IgG, teste de inibição de hemaglutinação e teste de neutralização (PRNT) (DREBOT et al., 2003; REISEN, 2003).

Uma grande limitação dos testes sorológicos como ELISA e teste de inibição de hemaglutinação é a alta reatividade cruzada dos anticorpos entre diferentes flavivírus. Por isso, em alguns casos pode ser necessária a confirmação do resultado por PRNT (OYER; BECKHAM; TYLER, 2014; REISEN, 2003). Os testes de neutralização ainda são o “padrão ouro” para detecção de anticorpos anti-SLEV e anti-WNV, sendo que a PRNT costuma ser o teste de escolha. Anticorpos neutralizantes aparecem um pouco mais tarde no curso da infecção, frequentemente 2 a 3 semanas após o início dos sintomas, mas os anticorpos específicos para o vírus causador da infecção atual costumam ser mais altos que os anticorpos com reatividade cruzada. A PRNT não é muito utilizada como teste de rotina, pois pode demorar mais de uma semana para ser realizado e requer instalações laboratoriais com nível de biossegurança 3 (NB-3) (DREBOT et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES, TAMPÕES E MEIOS DE CULTURA

- Meio LB: 1% (m/v) de bactotripton, 0,5% (m/v) de extrato de levedura e 86 mM de NaCl em água bidestilada.

- Meio LB ágar: 1% (m/v) de bactotripton, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 86 mM de NaCl e 1,5% (m/v) de ágar em água bidestilada.

- Meio SOC: 2% (m/v) de bactotripton, 0,5% (m/v) de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose em água bidestilada; pH 6,8-7,0.

- Solução de azul de Coomassie: 0,1% (m/v) de *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich), 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) ácido acético em água bidestilada.

- Solução de descoloração de geis: 30% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético em água bidestilada.

- Solução de lise bacteriana: 5 mM de NaOH, 5% (v/v) de glicerol, 0,5% (m/v) de dodecil-sulfato de sódio, 5 mM de EDTA, azul de bromofenol em água bidestilada.

- Solução de lise celular (para transfecção com cloreto de cálcio): 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 1% (v/v) de Nonidet P-40 em água ultrapura; pH 7,8.

- Solução de lise de hemácias: 166,4 mM de cloreto de amônio, 9,5 mM de bicarbonato de potássio, 1,16 mM de EDTA em água bidestilada; pH 7,4.

- Solução de Ponceau: 0,5% (m/v) de corante Ponceau S (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) de ácido acético em água bidestilada.

- Tampão carbonato: 21,7 mM de Na₂CO₃ e 28,3 mM de NaHCO₃ em água bidestilada; pH 9,6.

- Tampão da fosfatase alcalina: 100 mM de Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂ em água bidestilada.

- Tampão de amostra 4X: 160 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 4% (m/v) de dodecil-sulfato de sódio, 10% (v/v) de β-mercaptoetanol, 24% (v/v) de glicerol, 0,02% (m/v) de azul de bromofenol em água bidestilada.

- Tampão de eletroforese SDS-PAGE: 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina, 0,1% (m/v) de dodecil-sulfato de sódio em água bidestilada; pH 8,3.
- Tampão de eluição (para purificação de proteínas): 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 300 mM de NaCl, 500 mM de Imidazol em água bidestilada; pH 8,0.
- Tampão de lavagem (para purificação de proteínas): 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 300 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol em água bidestilada; pH 8,0.
- Tampão de ligação à resina (para purificação de proteínas): 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mM de NaCl em água bidestilada; pH 8,0.
- Tampão de transferência para *western blot*: 25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol em água bidestilada; pH 8,3.
- Tampão fosfato (PBS): 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 4,3 mM de Na_2HPO_4 e 1,5 mM de KH_2PO_4 em água bidestilada; pH 7,2-7,4.
- Tampão PBS-T: PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20.
- Tampão fosfato (para purificação de AcM): 0,61 mM de Na_2HPO_4 e 0,51 mM de NaH_2PO_4 ; pH 7,0.
- Tampão glicina: 0,1 mM de glicina em água ultrapura; pH ajustado para 2,7 com HCl.
- Tampão HBS 2X (para transfecção com cloreto de cálcio): 50 mM de HEPES, 1,5 mM de Na_2HPO_4 , 280 mM de NaCl em água ultrapura; pH 7,1.
- Tampão TNE: 20 mM de tris (pH 8,0), 150 mM de NaCl e 2 mM de EDTA em água bidestilada.
- Tampão tris (TBS): 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl em água bidestilada; pH 7,6.
- Tampão tris-NaCl: 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl em água bidestilada; pH 9,6.

3.2 LINHAGENS CELULARES E BACTERIANAS

- Células P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL-1580) e hibridomas: foram mantidos em meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF – Gibco), 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL

de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich), a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. As células P3X63Ag8.653 são uma linhagem de mieloma murino e foram utilizadas para a geração dos hibridomas, por meio da fusão com linfócitos B de camundongo. Esta linhagem foi selecionada por se tratar de um tumor de linfócito B não secretor de imunoglobulinas e deficiente na enzima HGPRT (YOO et al., 2002).

- Células C6/36 (ATCC® CRL-1660): linhagem celular derivada de células de larvas de *Ae. albopictus*. Foram cultivadas em meio Leibovitz's L15 suplementado com 5% de SBF inativado, 25 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 0,27% (m/v) de triptose e mantidas a 28°C.

- Células Huh7.5: clone da linhagem celular derivada de hepatócitos humanos Huh7 (BLIGHT; MCKEATING; RICE, 2002). Foram cultivadas em meio DMEM F12 (meio Dulbecco modificado por Eagle/Nutriente HAM F12 – Gibco) contendo 14,0 mM de bicarbonato de sódio, 10% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sendo mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

- Células Vero E6 (Sigma, 85020206): subclone da linhagem de células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) Vero 76. Foram cultivadas nas mesmas condições descritas para a célula Huh7.5.

- Células *Drosophila* Schneider 2 (S2) (Invitrogen, R690-07): linhagem celular derivada de cultura primária de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágio tardio (20-24 horas de idade) (SCHNEIDER, 1972). Foram cultivadas em meio Schneider (Schneider's *Drosophila* Medium – Gibco) suplementado com 10% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sendo mantidas a 28°C. Estas células também foram adaptadas ao meio SF-900 II (Gibco) suplementado com 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

- Células HEK 293T: linhagem celular derivada de rim de embrião humano, na qual foi inserido o antígeno T de SV40 (*Simian vacuolating virus 40*). Foram cultivadas em meio DMEM F12 suplementado com 14,0 mM de bicarbonato de sódio, 7% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

- Linhagem bacteriana TOP10 (Invitrogen): linhagem bacteriana de *Escherichia coli*, genótipo F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZ*ΔM15 Δ/*lacX74*

recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG, quimicamente competente.

3.3 VÍRUS

- Vírus da dengue: neste trabalho, foram utilizados os vírus da dengue sorotipos 1 (BR/01-MR e BR/90), 2 (BR/01-01 e ICC 266), 3 (290-02) e 4 (TVP 360). O DENV-4 TVP 360 é uma cepa referência da Organização Mundial de Saúde (OMS), gentilmente cedida pelo Dr. Ricardo Galler da Fiocruz/RJ. Os DENV-1 BR/01-MR (GenBank AF513110.1) e BR/90 (GenBank AF226685.2); DENV-2 BR/01-01 (GenBank JX073928) e ICC 266 (não sequenciado); DENV3 290-02 (GenBank EF629369.1) são isolados clínicos de febre de dengue obtidos no Brasil entre 1990 e 2004.

- Vírus da febre amarela: foi utilizada a cepa vacinal 17DD (Biomanguinhos, Fiocruz), obtida após três passagens e titulação em células Vero (POST et al., 2001).

- Vírus da encefalite de Saint Louis: foi utilizada a cepa 78V6507, isolada de mosquitos *Culex pipiens quinquefasciatus* da província de Santa Fé, Argentina (MITCHELL et al., 1985).

- Vírus do oeste do Nilo: foi utilizada a cepa E/7229/06, isolada de um cavalo morto na província de Buenos Aires, Argentina (MORALES et al., 2006).

- Vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV – *Venezuelan equine encephalitis virus*): foi utilizada a cepa vacinal TC38 (BERGE; BANKS; TIGERTT, 1961).

Os vírus SLEV, WNV e VEEV foram gentilmente cedidos pela Dra. Marta S. Contiginani, do Instituto de Virología Dr. J.M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

3.4 TÉCNICAS GERAIS

3.4.1 Transformação de Bactérias Quimiocompetentes

As transformações de bactérias com plasmídeos foram realizadas utilizando-se bactérias *E. coli* da linhagem TOP10 quimiocompetentes (em glicerol a 10% (v/v), CaCl₂ a 100 mM e HEPES a 10 mM) por meio de choque térmico (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). No momento da transformação, uma alíquota de 100 µL de bactérias competentes (armazenada a -80°C) foi descongelada em banho de gelo. O plasmídeo de interesse foi adicionado à suspensão bacteriana e misturado gentilmente com auxílio de uma ponteira. Essa mistura foi mantida por 30 min em banho de gelo, seguidos por 45 s a 42°C e 1-2 min em banho de gelo. Após o choque térmico, foram adicionados 500 µL de meio SOC e a mistura foi mantida por 1 h a 37°C sob agitação orbital a 200 rpm (New Brunswick Scientific, modelo Innova 4080), para recuperação celular. Alíquotas das células transformadas foram inoculadas em placas com meio LB ágar contendo 100 µg/mL de ampicilina, e as placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 16 h. Após este período, 15 a 30 colônias isoladas, selecionadas aleatoriamente, foram transferidas com auxílio de palitos de dente estéreis para uma nova placa com meio LB ágar contendo ampicilina, onde cada clone bacteriano foi identificado com um número. Esta placa foi incubada a 37°C por aproximadamente 16 h e então armazenada a 4°C.

3.4.2 Seleção de Clones Bacterianos

A seleção dos clones bacterianos que potencialmente contêm o plasmídeo recombinante (plasmídeo contendo o inserto de interesse) foi realizada pela técnica de palitagem (BARNES, 1977) ou pela técnica de PCR de colônia.

3.4.2.1 Técnica de Palitagem

As colônias bacterianas a serem triadas foram transferidas para microtubos com auxílio de palitos de dente estéreis. A cada tubo foram adicionados 20 μL de solução de lise bacteriana, seguida por aquecimento a 65°C durante 10 min. Estas amostras, bem como o plasmídeo nativo sem inserto (utilizado como controle), foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As prováveis colônias contendo o plasmídeo recombinante foram assim identificadas pela diferença de tamanho molecular quando comparadas com o controle.

3.4.2.2 PCR de Colônia

As colônias a serem triadas foram transferidas com auxílio de palitos de dente estéreis a microtubos contendo 15 μL de água ultrapura. Como controle positivo, foi adicionado o vetor utilizado na ligação, e como controle negativo, água ultrapura. Os tubos foram aquecidos a 98°C por 10 min e, em seguida, centrifugados por 1 min a 12.000 $\times g$. 1 μL do sobrenadante de cada tubo foi transferido a um microtubo de 200 μL contendo 1,5 μL de tampão comercial para reação de PCR (Invitrogen); 1,2 μL de dNTPs a 2,5 mM; 0,45 μL de MgCl_2 a 50 mM; 0,075 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL – IBMP); 1,5 μL dos oligonucleotídeos apropriados (a 5 pmol/ μL) e água ultrapura para volume final de 15 μL . Os tubos foram submetidos a 1 ciclo de 95°C por 3 min e a 30 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 30 s e 72°C por 2 min e 30 s. Para visualização, 10 μL dos produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. Os clones bacterianos contendo o plasmídeo recombinante foram detectados por amplificação positiva de um fragmento de DNA de tamanho esperado.

3.4.3 Estocagem e Purificação de Plasmídeos

Uma vez selecionados os clones bacterianos que possivelmente contêm o plasmídeo recombinante, estes foram inoculados em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após crescimento por aproximadamente 16 h a 37°C sob agitação (200 rpm), 2 mL da suspensão bacteriana foram armazenados a -80°C em glicerol 25% (v/v). O volume restante foi utilizado para purificação do DNA plasmidial, utilizando-se o kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Quando necessária maior quantidade de DNA plasmidial, 10 mL de suspensão bacteriana foram adicionados a 100 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubados por 16 h a 37°C sob agitação. O DNA plasmidial foi então purificado utilizando-se o kit *Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.4 Análise de Proteínas por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot*

A análise da expressão de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada sob condições desnaturantes (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema *Electrophoresis cell* (BioAmerica, modelo D7C2-24DNBA). As amostras foram misturadas com tampão de amostra 4X, na proporção de três partes de amostra para uma parte de tampão, aquecidas por 3 min a 95°C, aplicadas em gel de poliacrilamida a 13% e submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 100 V, durante aproximadamente 2 h. As bandas proteicas foram visualizadas por coloração do gel com solução de azul de *Coomassie*, seguida de descoloração com solução de descoloração de geis. A massa molecular aparente da proteína foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos (WEBER; OSBORN, 1969), na faixa de 10 a 220 kDa (*BenchMark™ Protein Ladder*, Invitrogen) ou 10 a 260 kDa (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific).

Para análise por *western blot*, as proteínas submetidas a SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), utilizando-se uma corrente elétrica de 100 V por 1 h a 4°C. Após a transferência, as bandas proteicas foram visualizadas por coloração da membrana com solução de Ponceau. Em seguida, a membrana foi descorada utilizando-se água deionizada e incubada com TBS contendo 5% (m/v) de leite desnatado (Molico[®], Nestlé), para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após três lavagens (5 min cada, sob agitação) com TBS, a membrana foi incubada com anticorpos específicos para a proteína analisada, seguido por um anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina diluído em TBS contendo 5% de leite desnatado. Todas as etapas de incubação foram realizadas por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com TBS. A reação foi revelada com NBT (nitroblue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Promega) em tampão de fosfatase alcalina, seguindo as instruções do fabricante. A revelação foi interrompida por lavagem da membrana com água corrente.

3.4.5 Criopreservação de Linhagens Celulares

As células geradas neste trabalho foram regularmente estocadas em nitrogênio líquido para criopreservação, sendo congeladas em múltiplos criotubos, em diferentes dias e com diferentes alíquotas do meio de congelamento.

Para o congelamento, quando a cultura celular atingiu a concentração desejada, as células foram centrifugadas por 10 min a 400 xg e, então, recuperadas em meio de congelamento (90% SBF e 10% DMSO) em volume suficiente para obter-se uma concentração de 2×10^6 a 1×10^7 células/mL. As células foram distribuídas em criotubos (1 mL por criotubo), mantidas por 2-3 h a -20°C, seguido por 4-16 h a -80°C e, após, transferidas para nitrogênio líquido.

Cada lote de células congeladas foi verificado pelo descongelamento de um criotubo. Para o descongelamento, o criotubo foi retirado do nitrogênio líquido e imediatamente aquecido a 37°C até que a suspensão celular descongelasse. O volume total do criotubo foi diluído em 10 mL de meio de cultura e centrifugado por 10 min a 400 xg . Ao precipitado celular, foram adicionados 10 mL de meio de cultura e

as células foram transferidas para uma garrafa de 25 cm² e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ (LAFON, 1996).

3.4.6 Imunofluorescência Indireta

Para a realização de imunofluorescência indireta (IFI), células de interesse foram cultivadas em placas de 96 poços e, então, fixadas e permeabilizadas com metanol:acetona (1:1) por no mínimo 20 min a -20°C. No momento de sua utilização, o metanol:acetona foi descartado e as placas foram secas a temperatura ambiente. As células foram incubadas com o anticorpo primário de interesse (100 µL/poço) durante 30 min a 37°C, seguido de anticorpo secundário conjugado com um fluoróforo diluído em PBS contendo 0,2 µg/µL de azul de Evans (50 µL/poço, 1 h a 37°C ao abrigo da luz). Os núcleos celulares foram corados com 300 nM de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) por 5 min a 37°C ao abrigo da luz. Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com PBS. Por fim, os focos fluorescentes foram observados em microscópio de fluorescência (Nikon, modelo Eclipse TE300). Quando as imagens foram fotografadas, foi utilizado um microscópio Leica AF6000 Modular System.

3.5 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

3.5.1 Expressão das Proteínas Recombinantes E1 e E2 de CHIKV em Células S2 de *Drosophila melanogaster*

3.5.1.1 Construção dos Vetores de Expressão

Para a obtenção de proteínas recombinantes do vírus CHIKV, primeiramente foi feito um alinhamento das sequências completas do genoma deste vírus disponíveis

no *GenBank*. A partir da sequência consenso e com base nos iniciadores descritos por Cho et al. (2008), foram selecionadas as regiões codificantes para o ectodomínio das proteínas de envelope E1 e E2 do CHIKV. A essas sequências, foram adicionados sítios para as enzimas de restrição BglIII e XhoI, nas extremidades 5' e 3', respectivamente. As sequências finais dos genes tiveram seus códons alterados de forma a haver uma expressão ótima em células de *D. melanogaster*, foram sintetizados pela GenScript (Piscataway, USA) e fornecidos sob a forma de um inserto no plasmídeo pUC57.

Esses plasmídeos, adquiridos na forma liofilizada, foram diluídos em 20 µL de água nuclease *free* e armazenados a -20°C. 200 ng de cada plasmídeo foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* da linhagem TOP10 quimiocompetentes. Três colônias isoladas foram selecionadas e amplificadas em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Este mesmo procedimento foi realizado, em paralelo, para o plasmídeo pMt/Bip/V5-His A (Invitrogen), escolhido como vetor de expressão. Os clones bacterianos selecionados foram estocados em glicerol a 25% e o DNA plasmidial foi purificado.

Um volume correspondente a aproximadamente 1 µg de cada DNA plasmidial foi submetido à digestão com as enzimas de restrição BglIII e XhoI (New England Biolabs), em um volume final de 30 µL, por 16 h a 37°C, seguindo as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA de interesse foram purificados a partir da banda em gel de agarose a 0,8% utilizando-se o kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) e, então, cada produto de digestão de inserto purificado (genes E1 e E2 de CHIKV) foi ligado com o produto de digestão purificado do vetor (pMt/Bip/V5-His A), utilizando a enzima *T4 DNA ligase* (Promega). A reação feita por 18 h a 4°C, com a proporção molar inserto:vetor de 3:1, de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos resultantes foram denominados pE1-CHIKV e pE2-CHIKV (Figura 20).

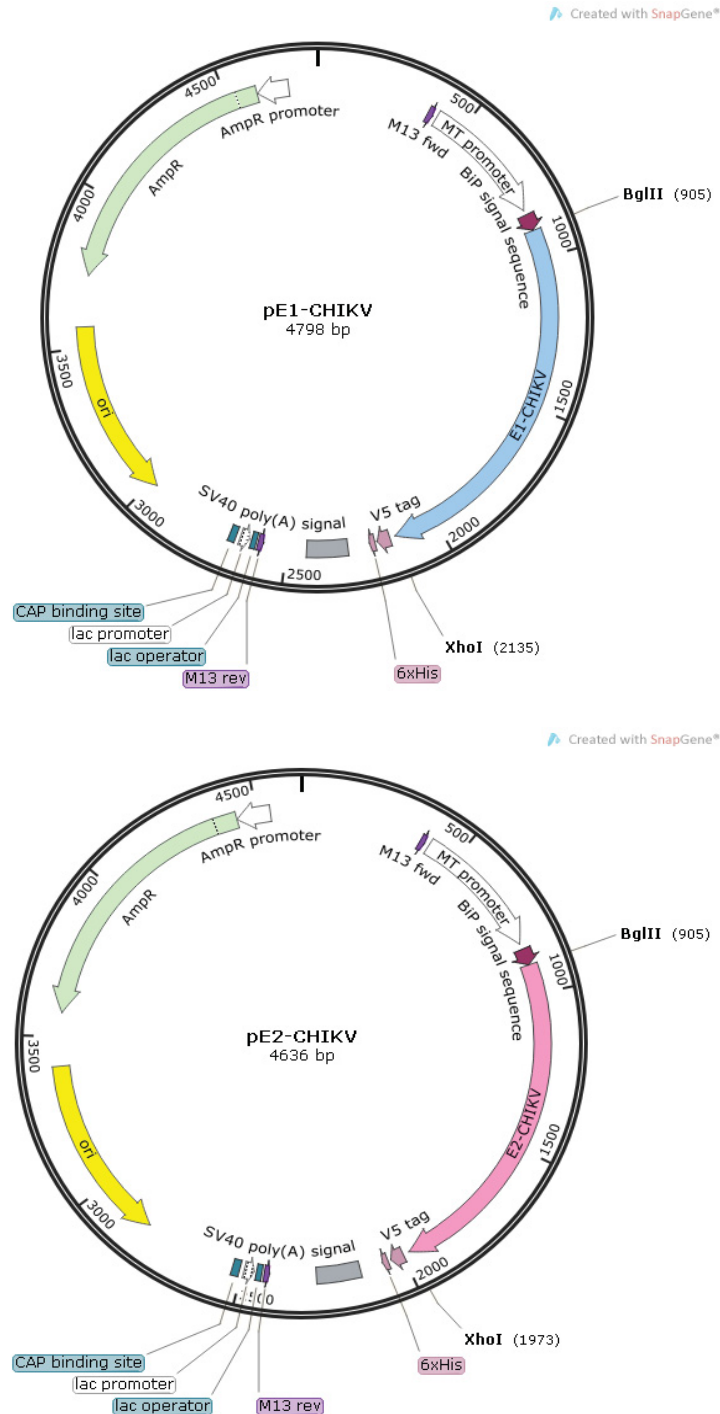


Figura 20 – Mapa dos plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV, gerados por meio da clonagem dos genes sintéticos E1 e E2 do CHIKV, respectivamente, no vetor pMt/Bip/V5-His A.

Com o intuito de obter um elevado número de cópias plasmidiais, o volume total da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Clones contendo o inserto foram identificados pela técnica de palitagem e, entre as colônias positivas, uma foi selecionada para estocagem e purificação do DNA plasmidial.

Para confirmar a presença do inserto de interesse, os DNA plasmidiais purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição BglII e XhoI e o resultado visualizado em gel de agarose a 0,8%. Além disso, os plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV foram sequenciados utilizando os iniciadores *MT Forward* e *BGH Reverse* (Invitrogen), específicos para regiões do plasmídeo pMT/BiP/V5-His que flanqueiam os sítios de clonagem (Figura 21). Este sequenciamento de DNA foi realizado para confirmar se o gene de interesse estava na orientação correta para expressão e se seria transcrito na mesma fase de leitura que as sequências nucleotídicas do vetor codificantes para o peptídeo sinal BiP, localizado na porção N-terminal, e para o epítipo V5 e o peptídeo correspondente à cauda de poli-histidina, localizados na região C-terminal. O peptídeo sinal BiP auxilia na obtenção de proteínas solúveis, o epítipo V5 permite a identificação das proteínas recombinantes utilizando-se anticorpos anti-V5 e a cauda de poli-histidina (*His-tag*) é necessária para a posterior purificação das proteínas recombinantes. O sequenciamento foi realizado pela Macrogen (Coreia do Sul).

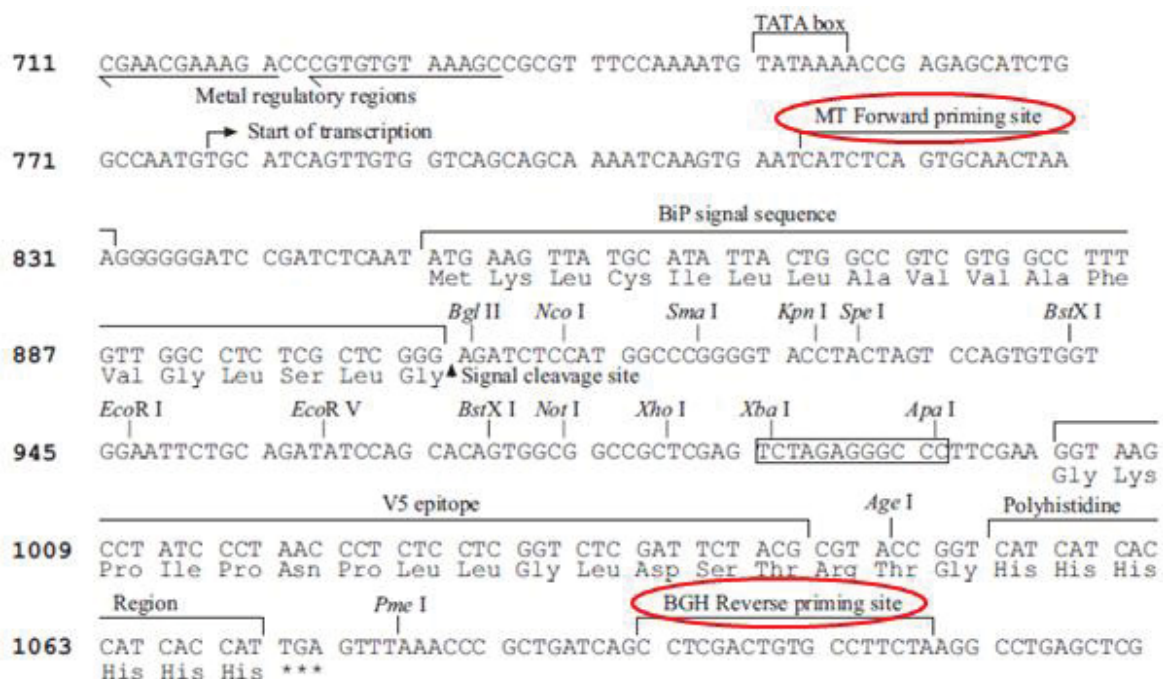


Figura 21 – Segmento do plasmídeo pMt/Bip/V5-His A destacando (em vermelho) os sítios de ligação dos iniciadores *MT Forward* e *BGH Reverse*. FONTE: Adaptado do manual *pMt/Bip/V5-His A, B and C* da Invitrogen, disponível em http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pmtbipv5his_man.pdf.

Como para os procedimentos de transfecção celular (descritos a seguir) é necessária uma grande quantidade do plasmídeo de interesse, os clones de bactérias

TOP10 contendo os plasmídeos pE1-CHIKV ou pE2-CHIKV foram cultivados em 100 mL de meio LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O DNA plasmidial dessas bactérias foi então extraído e purificado utilizando-se o kit *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

3.5.1.2 Transfecção Transitória de Células S2 com os Plasmídeos Recombinantes

Uma vez obtidos os plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV, foram feitas transfecções transitórias de célula S2 para os testes iniciais de expressão das proteínas de interesse, as quais foram denominadas rE1-CHIKV e rE2-CHIKV, respectivamente. Para tanto, foram adicionadas 3×10^6 células S2, em volume de 3 mL de meio Schneider suplementado com 10% de SBF inativado e antibióticos, a poços de placas de cultivo celular de 6 poços. As células foram incubadas por 16-24 h a 28°C. No momento da transfecção, 19 µg de DNA recombinante foram misturados com 36 µL de cloreto de cálcio estéril a 2M e água ultrapura estéril em volume suficiente para um total de 300 µL. Esta solução foi adicionada por gotejamento lento e com constante homogeneização a 300 µL de tampão HBS 2X, e a mistura foi incubada por 40 min a temperatura ambiente para precipitação do DNA. Após esta incubação, a mistura contendo o DNA recombinante foi adicionada gota a gota sobre as células, e estas foram incubadas por 16-24 h a 28°C. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com meio de cultivo, para remoção da solução de fosfato de cálcio. Para cada lavagem, foi adicionado 1 mL de meio a cada poço resultante da transfecção, este meio foi recolhido em um tubo estéril e centrifugado por 10 min a 100 xg, para recuperar as células que eventualmente tenham sido recolhidas junto com o meio de cultivo. As células foram então diluídas em 3 mL de meio de cultivo, transferidas para o mesmo poço de origem e mantidas a 28°C.

Nos ensaios de transfecção, foi feito um controle positivo com o plasmídeo pMt/Bip/V5-His/GFP (Invitrogen) e um controle negativo com células não transfectadas.

3.5.1.3 Padronização da Expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV em Células S2

Para determinar as melhores condições para expressão das proteínas rE1-CHIKV e rE2-CHIKV, foram testados diferentes tempos de indução e de recolhimento das células e diferentes concentrações de sulfato de cobre (CuSO_4) para indução da expressão proteica.

Primeiramente foram determinados os melhores tempos de indução e de recolhimento das células. Dessa forma, foi feita uma indução com $500 \mu\text{M}$ de CuSO_4 24, 48, 72 e 96 h após a transfecção transitória (descrita no item 3.5.1.2). O recolhimento das amostras foi feito 48, 72, 96 e 120 h após a transfecção. Uma vez definidos esses tempos, foi determinada a melhor concentração de CuSO_4 para indução da expressão proteica. Foram adicionados 500, 700 e $900 \mu\text{M}$ de CuSO_4 , respeitando os tempos de indução e recolhimento determinados para cada célula.

Em ambos os casos, para análise da expressão proteica, as células e o meio de cultivo foram coletados e centrifugados por 10 min a 100 xg . Os sobrenadantes foram separados para análise. Às células, foi adicionado 1 mL de PBS, seguindo com nova centrifugação. As células foram então diluídas em $150 \mu\text{L}$ de solução de lise celular, incubadas por 10 min a 37°C e centrifugadas por 10 min a 450 xg . O sobrenadante desta centrifugação corresponde ao lisado celular e foi separado para análise.

A análise foi feita por *western blot*, conforme descrito no item 3.4.4. Como anticorpo primário foi utilizado anticorpo anti-V5 (Invitrogen) diluído 1/5.000 e como anticorpo secundário, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/7.500.

3.5.1.4 Geração de Linhagens Estáveis de Células S2 Transfectadas

Para a obtenção de linhagens celulares estáveis produtoras das proteínas rE1-CHIKV e rE2-CHIKV, foi realizada nova transfecção de células S2 com os plasmídeos pE1-CHIKV ou pE2-CHIKV juntamente com o plasmídeo pCoBlast

(Invitrogen). O pCoBlast possui um gene de resistência ao antibiótico blasticidina, que possibilita a seleção de células transfectadas.

Para essa transfecção, foi seguido o protocolo descrito no item 3.5.1.2, adicionando-se 1 µg de pCoBlast à solução contendo o DNA recombinante e o cloreto de cálcio. A partir do terceiro dia após a transfecção, as células transfectadas passaram a ser mantidas em meio de cultivo contendo 25 µg/mL de blasticidina. Após aproximadamente duas semanas, com troca do meio a cada quatro dias, foram observadas colônias celulares resistentes à blasticidina. Essas células resistentes foram induzidas a expressar as proteínas recombinantes e então testadas por IFI, utilizando anticorpo anti-V5 (Invitrogen) diluído 1/2.000 em PBS como anticorpo primário. Como anticorpo secundário, foi utilizado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Sigma-Aldrich) diluído 1/300 em PBS com azul de Evans. Uma vez verificada a positividade das células cotransfectadas, as células em cultivo foram congeladas para geração de estoque. Essas células expressando as proteínas rE1-CHIKV e rE2-CHIKV foram, respectivamente, denominadas S2/E1-CHIKV e S2/E2-CHIKV.

3.5.1.5 Purificação das Proteínas Recombinantes

Os ensaios iniciais de purificação proteica foram realizados utilizando-se um lisado das células cotransfectadas expressando a proteína de interesse e o meio de cultivo dessas células, visando verificar se a proteína estava retida no interior das células ou se estava sendo liberada no meio de cultivo. Dessa forma, células S2/E1-CHIKV foram induzidas com 500 µM de CuSO₄ e células S2/E2-CHIKV, com 700 µM de CuSO₄, nos tempos determinados nos ensaios para padronização da expressão proteica (item 3.5.1.3). Células S2 não transfectadas foram utilizadas como controle negativo (MOCK).

Para a purificação, as células foram recolhidas por raspagem juntamente com o meio de cultivo e centrifugadas por 10 min a 400 xg. O sobrenadante desta centrifugação foi dialisado contra tampão de ligação à resina, para remoção do CuSO₄, e utilizado no ensaio de purificação. Para a purificação a partir do lisado celular, as células foram diluídas em tampão de ligação à resina e submetidas a três

ciclos de congelamento em gelo seco e etanol e descongelamento em banho a 42°C. Após centrifugação por 10 min a 2.600 xg, o sobrenadante foi utilizado no ensaio de purificação.

Em ambos os casos, as amostras a serem purificadas foram incubadas por 1 h a 4°C com resina Ni-NTA Agarose (Qiagen) previamente equilibrada em tampão de ligação à resina. Após o tempo de incubação, a resina com a amostra foi transferida para uma coluna de cromatografia *Poly-Prep*[®] (BioRad). O volume eluído, correspondente à fração não-ligada à resina, foi coletado para posterior análise. A seguir, foram realizadas duas lavagens da resina com tampão de lavagem em volume correspondente a cinco vezes o volume de resina, seguindo com a eluição da proteína utilizando-se tampão de eluição. A alta concentração do imidazol no tampão de eluição permite a liberação da proteína, pois o imidazol é um análogo da histidina, competindo pela ligação aos íons níquel associados à resina. Cada fração eluída foi coletada para posterior análise, assim como uma alíquota da resina restante na coluna. As amostras foram então analisadas por SDS-PAGE e *western blot*, utilizando anticorpo anti-V5 como anticorpo primário.

Para a produção de um estoque das proteínas, foram utilizadas garrafas de cultivo celular de 300 cm² contendo 7 x 10⁷ células (em volume de 70 mL). A purificação foi realizada a partir do meio de cultivo celular, utilizando 1 mL de resina e realizando-se três eluições, cada uma com 1 mL de tampão de eluição. As eluições contendo proteína (previamente analisadas por *western blot*) foram misturadas e a concentração de proteínas presentes na amostra foi estimada por comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

3.5.2 Imunização de Camundongos com a Proteína rE2-CHIKV

Três camundongos *Mus musculus* machos, da linhagem isogênica Balb/c, com 30 dias de idade e peso maior que 25 g, foram imunizados com a proteína rE2-CHIKV. Cada camundongo recebeu três doses de 20 µg da proteína por via intraperitoneal utilizando Alu-Gel-S (Serva) como adjuvante, seguindo com uma dose reforço de 20 µg da proteína por via endovenosa, com intervalo de 14 dias entre cada

dose. Os experimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR – processo número 23075.082918/2011-51) e Fiocruz (Protocolo n.º P-47/11-2). Esses animais foram criados e mantidos no biotério do Instituto Carlos Chagas / Fiocruz – PR, com água e ração *ad libitum* e mantidos em fotoperíodo de 12 h de claro/12 h de escuro. Todos os procedimentos que provocavam dor foram realizados sob efeito de anestésicos e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.5.3 Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra a rE2-CHIKV

Todos os procedimentos para obtenção dos hibridomas, descritos nos subitens a seguir, foram realizados utilizando meio RPMI-1640 suplementado com 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio e antibióticos. Não foram utilizados HEPES, nem SBF, pois o HEPES pode ser tóxico para as células durante a fusão e as proteínas presentes no SBF podem precipitar o polietilenoglicol (YOKOYAMA et al., 2006).

3.5.3.1 Obtenção dos Esplenócitos

Três dias após a dose reforço, os camundongos foram anestesiados e sedados com 100 mg/kg de cloridrato de quetamina e 1 mg/kg de xilazina, administrados por via intraperitoneal em volume de 0,1 mL/10 g de peso animal. Uma vez verificada a anestesia, foi coletado o soro pós-imune de cada animal por meio de punção cardíaca. Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical, embebidos em álcool 70% e levados a uma cabine de segurança biológica, para obtenção dos esplenócitos de forma estéril. O restante dos procedimentos foi realizado segundo padronizado por Zanluca et al. (2011).

Para tanto, os baços dos camundongos foram removidos assepticamente e picotados e macerados entre lâminas, para isolamento das células e remoção da

cápsula desse órgão. As células foram então filtradas com filtro de *nylon* e transferidas para um tubo cônico contendo 10 mL de meio RPMI-1640, no qual foi centrifugada por 10 min a 400 xg a 18°C. Ao precipitado celular foram adicionados 5 mL de solução de lise de hemácias gelada, com incubação por 5 min em banho de gelo, seguindo com a adição de 45 mL de meio RPMI-1640. As células foram centrifugadas por 10 min a 400 xg e então recuperadas em 45 mL de RPMI-1640. Esta etapa de centrifugação foi repetida duas vezes, sendo adicionados 10 mL de RPMI-1640 após a última centrifugação. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer utilizando corante azul de Tripán a 0,2%.

3.5.3.2 Células de Mieloma

As células de mieloma da linhagem P3X63Ag8.653 foram cultivadas nas condições descritas no item 3.3. No dia anterior à fusão, as células foram transferidas para garrafas de cultura celular de 75 cm², para atingirem a fase logarítmica do crescimento, pois as células em expansão logarítmica são as satisfatórias para a fusão (LAFON, 1996).

No dia da fusão, as células foram transferidas para um tubo cônico de 50 mL e centrifugadas por 10 min a 400 xg. Sobre o precipitado celular, foram adicionados 45 mL de meio RPMI-1640. Este procedimento foi realizado três vezes, sendo que, na última vez, foram adicionados 10 mL de meio sobre o precipitado celular. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de Tripán.

3.5.3.3 Fusão de Esplenócitos com Células de Mieloma para a Geração de Hibridomas

Para obtenção dos hibridomas, foram utilizados os esplenócitos dos camundongos imunizados e as células de mieloma descritos nos itens 3.5.3.1 e 3.5.3.2. A fusão destas células foi realizada utilizando polietilenoglicol (PEG, P.M. 3000-3700 – Sigma-Aldrich) como agente fusionante.

Para tanto, as células de mieloma e os esplenócitos foram misturados na proporção 1:5 respectivamente, em um tubo cônico de 50 mL, e centrifugados por 10 min a 400 xg. Sobre o precipitado celular, foi adicionado 1 mL de PEG 50% (em meio RPMI-1640) previamente aquecido a 37°C, gota a gota, durante 2 min, homogeneizando-se constantemente com movimentos rotativos suaves. A seguir, foi adicionado 1 mL de meio RPMI-1640 durante 1 min, mais 1 mL de RPMI-1640 durante 1 min e, por fim, 7 mL durante 2 min, sempre homogeneizando com movimentos rotativos. A suspensão celular foi centrifugada por 5 min a 400 xg e ao precipitado celular foram adicionados 10 mL de meio RPMI-1640 com HEPES e SBF, para ser feita a contagem das células viáveis. As células foram então distribuídas em placas de cultura de 96 poços, em concentração de $2,5 \times 10^5$ células/100 μ L/poço, e mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.5.3.4 Seleção dos Hibridomas

A seleção das células híbridas foi realizada por meio do cultivo em meio HAT (meio RPMI-1640 com os suplementos descritos no item 3.3 mais 0,1 mM de hipoxantina, 0,0004 mM de aminopterina e 0,016 mM de timidina – Sigma-Aldrich) durante 14 dias. Do 15º ao 19º dia após a fusão, as células foram cultivadas em meio HT (meio HAT sem aminopterina – Sigma-Aldrich) e, a partir do 20º dia, em meio RPMI-1640 com 20% de SBF, conforme descrito no item 3.2 (YOKOYAMA *et al.*, 2006).

As células que apresentaram crescimento durante ou após o cultivo com meio HAT foram submetidas ao teste de triagem para verificar se eram produtoras de anticorpos contra a proteína recombinante.

3.5.3.5 Triagem dos Hibridomas Secretores de Anticorpos Anti-rE2-CHIKV

A triagem dos hibridomas secretores de anticorpos anti-rE2-CHIKV foi realizada por ELISA indireto, utilizando um protocolo adaptado de Piza et al. (1999).

Resumidamente, placas de ELISA foram sensibilizadas com 250 ng/poço de rE2-CHIKV diluída em tampão carbonato (volume final de 100 µL) durante no mínimo 12 h a 4°C. A seguir, foi realizado um bloqueio dos sítios inespecíficos por adição de 300 µL/poço de tampão Tris-NaCl contendo 0,5% de gelatina, por 30 min a 37°C. Foram então adicionados 100 µL do sobrenadante de cultivo dos hibridomas (1 h a 37°C), seguido da adição de 100 µL de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1/6.000 em PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA (1 h a 37°C). Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com 200 µL/poço de PBS-T. Por fim, a reação foi detectada com TMB (3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina – KPL), 50 µL/poço por 10 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2M e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro (Biotek®, modelo Synergy H1) a 450 nm.

Os hibridomas identificados como positivos por esta técnica foram expandidos para placas de cultivo celular de 24 poços e, em seguida, para placas de 6 poços. Durante cada etapa de expansão, os hibridomas foram novamente triados, de forma a verificar sua estabilidade em secretar anticorpos anti-rE2-CHIKV.

3.5.3.6 Clonagem dos Hibridomas por Diluição Limitante

Para obtenção de anticorpos monoclonais, os hibridomas positivos durante a triagem e estáveis durante a expansão foram submetidos a duas clonagens por diluição limitante, de forma a serem obtidos poços em placas de cultivo celular com apenas uma célula híbrida. Considerando-se o fato de que cada linfócito B (e, portanto, cada hibridoma) produz anticorpos contra um único epítipo e que toda sua progênie sintetiza anticorpos idênticos, ao final do processo de clonagem por diluição limitante e nova expansão do hibridoma, AcM são obtidos (WADE, 1982; YOKOYAMA et al., 2006). Assim, a clonagem é requerida para evitar problemas de poli-especificidade e também para minimizar o risco de células não-secretoras crescerem demais, em detrimento dos hibridomas secretores de anticorpos (YOKOYAMA et al., 2006).

Para essa clonagem, foram feitas diluições seriadas (fator 2) dos hibridomas em placas de cultivo celular de 96 poços contendo 100 µL/poço de meio RPMI-1640. As placas foram observadas em microscópio invertido (Nikon, modelo Eclipse TS100) e os poços com apenas uma célula foram identificados. Após sete a dez dias de cultivo, a produção de anticorpos anti-rE2-CHIKV pelos hibridomas presentes nos poços identificados foi novamente verificada por ELISA. Uma segunda diluição limitante foi realizada para garantir a monoclonalidade dos anticorpos presentes no sobrenadante de cultura dos hibridomas.

3.5.3.7 Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais

A caracterização dos isotipos e subtipos dos AcM foi realizada utilizando o *kit* comercial *SBA Clonotyping™ System/HRP* (Southern Biotech), seguindo as instruções do fabricante.

3.5.3.8 Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com a Proteína rE2-CHIKV

A especificidade dos AcM para a proteína recombinante foi confirmada por imunofluorescência indireta em células S2/E2-CHIKV e S2 não transfectadas (MOCK). A reação foi realizada utilizando os AcM produzidos como anticorpos primários e anticorpo anti-imunoglobulina murina conjugado com Alexa Fluor 488 diluído 1/300 em PBS com azul de Evans como anticorpo secundário, seguindo o protocolo descrito no item 3.4.6.

Essa especificidade também foi verificada por *western blot*, seguindo o protocolo descrito no item 3.4.4. A proteína rE2-CHIKV foi utilizada na eletroforese e transferida para membrana de nitrocelulose. Na reação de *western blot*, foram utilizados os AcM como anticorpos primários e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/7.500 em TBS contendo 5% de leite desnatado como anticorpo secundário. Anticorpo anti-V5 foi utilizado como controle positivo da reação.

3.5.3.9 Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com Alfavírus VEEV e com Diferentes Flavivírus

A reatividade cruzada dos AcM para o alfavírus VEEV e para os flavivírus DENV sorotipos 1 a 4, SLEV e WNV foi determinada por IFI. Células C6/36, em concentração de 1×10^5 células/poço, em placas de cultivo celular de 96 poços, foram infectadas com DENV-1 BR/90, DENV-2 ICC 266, DENV-3 290-02 ou DENV-4 TVP 360 a um MOI de 1. Células HuH7.5 foram infectadas com SLEV 78V6507 ou VEEV cepa TC83 e células Vero E6, com WNV E/7229/06, todas a um MOI de 1, com 2×10^4 células/poço. Após 72 h de infecção, as células foram fixadas com metanol:acetona e utilizadas em IFI (ver item 3.4.6). Sobrenadantes de cultivo dos hibridomas foram utilizados como anticorpo primário, seguidos de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 diluído 1/300.

3.5.4 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-CHIKV

Para a detecção de IgM anti-CHIKV, foi padronizado um ensaio do tipo ELISA indireto, utilizando uma mistura de soros positivos (com IgM anti-CHIKV) e um soro sabidamente negativo. Após a avaliação de diferentes parâmetros do teste, como concentração dos reagentes, tampões e número de lavagens, foi estabelecido o protocolo, de acordo com o qual módulos de placa de ELISA (Nunc, Thermo Scientific) foram sensibilizados com 62,5 ng/poço de rE2-CHIKV (antígeno positivo) ou de MOCK (controle negativo) durante no mínimo 16 h a 4°C em câmara úmida. A seguir, foi realizado um bloqueio dos sítios inespecíficos por meio da adição de 200 µL/poço de PBS-T com 2% de leite desnatado, com incubação por 40 min a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as placas secas podiam ser utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20°C para uso posterior, sendo utilizadas placas armazenadas por até uma semana. Foram então adicionados 50 µL/poço dos soros-teste diluídos 1/50 em PBS, seguidos por incubação por 1 h a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com 200 µL/poço de PBS-T, foram adicionados 50 µL/poço de

anticorpo anti-IgM humana conjugado com peroxidase diluído 1/10.000 em PBS-T contendo 2% de leite desnatado. Foi realizada nova incubação por 1 h a 37°C em câmara úmida, seguindo com cinco lavagens com 200 µL/poço de PBS-T, com incubação do PBS-T da última lavagem por 15 min a temperatura ambiente. A reação foi detectada com TMB (100 µL/poço – KPL), sendo interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 2M após 8 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biotek®, modelo Synergy H1) a 450 nm. Para interpretação dos resultados, primeiramente o valor do branco da reação foi descontado da absorbância de cada amostra e então foi feita a diferença entre as absorbâncias obtidas com o antígeno positivo e com o antígeno negativo. Para fins de comparação, o ELISA foi realizado em paralelo com a rE2-CHIKV e com a proteína CHIK.sE2-SNAP (E2 de CHIKV fusionada à proteína SNAP, produzida em células S2 de *D. melanogaster*) (DESPRES; PAULOUS; CRUBLET, 2013), que tem sido utilizada em um MAC-ELISA para diagnóstico de CHIKV no Instituto Pasteur de Paris e foi gentilmente cedida pelo Dr. Philippe Desprès. A melhor concentração de CHIK.sE2-SNAP para sensibilização foi de 200 ng/poço. Destaca-se que essa proteína não possui um MOCK, portanto, a interpretação dos resultados foi feita apenas descontando-se o valor do branco da reação.

Para que pudessem ser comparados os testes com as duas proteínas, após essa padronização inicial, foi determinado o valor de corte do ensaio utilizando-se um painel de 10 soros sabidamente negativos cedido pelo Instituto Pasteur da Guiana. O valor de corte foi estabelecido como a média das absorbâncias dos soros negativos mais três vezes o desvio padrão. Para a validação do teste, foram ainda analisadas amostras de soros humanos (1) de pacientes com infecção aguda por CHIKV (n=20 – painel cedido pelo Instituto Pasteur da Guiana); (2) de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas (n=45); e (3) de indivíduos com outras infecções agudas: DENV (n=14), EBV (n=13), CMV (n=11), VDRL-positivo (n=11) e toxoplasmose (n=5). Os resultados com esses soros foram utilizados para calcular os valores de sensibilidade e de especificidade do teste desenvolvido. O grupo 3 foi utilizado ainda para análise da reatividade cruzada. Devido à restrição na quantidade de CHIK.sE2-SNAP disponível, o ELISA com esta proteína foi realizado apenas utilizando-se o painel de soros cedidos pelo Instituto Pasteur da Guiana (20 soros positivos e 10 soros negativos).

Os cálculos de sensibilidade e especificidade foram feitos com base em uma tabela 2x2 na qual os resultados foram categorizados como verdadeiros positivos (VP), falso-positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falso-negativos (FN) e utilizando as equações abaixo:

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

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

3.6 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA DENGUE

3.6.1 Produção do Antígeno Viral

Para utilização no desenvolvimento de um ensaio para detecção de IgM anti-DENV, foi gerado um estoque de vírus da dengue dos quatro sorotipos (DENV-1 BR/01-MR, DENV-2 BR/01-01, DENV-3 290-02 e DENV-4 TVP 360), os quais foram concentrados, purificados por colchão de sacarose e inativados por radiação gama.

Para tanto, células C6/36 foram infectadas com os respectivos vírus em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01. As infecções foram acompanhadas por sete a dez dias, até o aparecimento de efeito citopático. O vírus foi então recuperado a partir do meio de cultivo, após centrifugação por 10 min a 480 xg a 4°C.

A fim de se obter estoques virais purificados, os vírus foram precipitados com 7% (m/v) de PEG 8000 e 2,3% (m/v) de NaCl, com incubação por aproximadamente 16 h a 4°C sob agitação branda. Após este período, procedeu-se uma centrifugação por 30 min a 17.500 xg a 4°C. O *pellet* contendo as partículas virais foi então recuperado em 3 mL de tampão TNE e submetido a purificação por colchão de sacarose. Para tanto, as amostras foram adicionadas sobre gradiente descontínuo de sacarose a 30% e 60% (preparada no mesmo tampão) e centrifugadas por 2 h a 39.000 rpm (Hitachi, modelo Himac CP80WX) a 4°C. A interfase contendo as partículas virais purificadas foi coletada e armazenada a -80°C.

As partículas virais foram quantificadas pela técnica de titulação viral por imunodeteção de foco (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993). Resumidamente, 1×10^5 células C6/36, em poços de placas de cultivo celular de 24 poços, foram infectadas com 400 μL de diluições seriadas (fator 10) do vírus em meio Leibovitz L15 suplementado com 0,26% de triptose e gentamicina. Após incubação por 1 h a 28°C, o inóculo viral foi retirado e foram adicionados 500 μL /poço de uma mistura contendo 50% de meio de Leibovitz L15 suplementado com 0,26% de triptose, 10% de SBF e gentamicina e 50% de carboximetilcelulose (CMC) a 3,2% (m/v) em água bidestilada. Após sete dias a 28°C, procedeu-se com a revelação por detecção de focos virais. Para tanto, as células foram fixadas com paraformaldeído a 3% (m/v) em PBS por 20 min e permeabilizadas com PBS contendo 0,5% de Triton X-100 por 4 min, ambas as incubações à temperatura ambiente. Os focos foram detectados por incubação com o AcM 4G2 (1 h a 37°C), seguido de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/7.500 em PBS (1 h a 37°C) e de revelação com NBT e BCIP em tampão de fosfatase alcalina por 30 min. O título viral foi expresso em unidades formadoras de foco por mL (ffu/mL).

Para a inativação, partiu-se de quantidades virais da ordem de 10^8 ffu/mL. Por meio de uma cinética de irradiação, com alterações no tempo e intensidade da radiação gama, acompanhada de titulação viral por imunodeteção de foco, foram determinadas as melhores condições para inativação de cada isolado de DENV. A irradiação foi realizada por técnicos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) de São Paulo. A quantidade de proteínas presente nas amostras de vírus inativado foi determinada utilizando-se o kit *Micro BCA™ Protein Assay* (Pierce Biotechnology), seguindo as instruções do fabricante. A concentração proteica foi estimada por comparação do valor de sua absorbância em espectrofotômetro a 570 nm com os valores de uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA), por meio de análise de regressão linear da equação da reta.

3.6.2 Caracterização de Anticorpos Monoclonais Anti-DENV

Em um trabalho anterior, foram produzidos hibridomas secretores de anticorpos contra isolados brasileiros de vírus da dengue dos sorotipos 1, 2 e 3

(MAZZAROTTO, 2009). Neste trabalho, os hibridomas foram clonados por diluição limitante (ver item 3.5.3.6) e os AcM caracterizados.

3.6.2.1 Isotipagem dos Anticorpos Monoclonais

A caracterização dos isotipos e subtipos dos AcM foi realizada utilizando o *kit* comercial *SBA Clonotyping™ System/HRP* (Southern Biotech), seguindo as instruções do fabricante.

3.6.2.2 Determinação da Especificidade dos Anticorpos Monoclonais para as Proteínas de DENV

Para determinar a especificidade dos AcM para as proteínas de DENV, foi realizado um *western blot* utilizando DENV do sorotipo homólogo (o mesmo sorotipo utilizado na imunização dos camundongos). Três µg de DENV-1 BR/01-MR ou DENV-2 BR/01-01 ou 12 µg de DENV-3 290-02 inativados foram aplicados em gel de poliacrilamida a 13% e submetidos à SDS-PAGE e *western blot*, seguindo o protocolo descrito no item 3.4.4. Sobrenadante de cultura dos hibridomas foi utilizado como anticorpo primário e anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/7.500, como anticorpo secundário. Dessa forma, a especificidade dos AcM foi determinada com base na massa molecular das proteínas reconhecidas.

Os AcM produzidos contra DENV-2 também foram testados por *western blot* contra um peptídeo recombinante correspondente ao domínio III da proteína de envelope de DENV-2 (com aproximadamente 12 kDa) expresso em sistema procariótico. Além disso, os AcM produzidos contra DENV-3 foram testados por IFI em células S2 transfectadas com o plasmídeo pMt/Bip/V5-His A contendo o gene para a proteína E de DENV-3 (isolado BR 290-02) com a região correspondente aos últimos 101 aminoácidos C-terminais deletada (E Δ_{101} de DENV-3). Para tanto, células S2 transfectadas foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% de SBF inativado e 25 µg/mL de gentamicina. A expressão da proteína de envelope foi

induzida por adição de 500 μ M de CuSO_4 ao meio de cultivo por 48 h. Após este período de indução, foram adicionados 1×10^5 células/poço, em placas de cultivo celular de 96 poços. Após a adesão, as células foram fixadas com metanol:acetona e foi realizada uma IFI (ver item 3.4.6) utilizando como anticorpos os sobrenadantes de cultivo dos hibridomas, seguidos de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 diluído 1/300.

Em todos esses testes, AcM 4G2 (específico para a proteína de envelope de Flavivírus, produzido pelo hibridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) foi utilizado como controle positivo. Um anticorpo não relacionado anti-hantavírus, clone 572/7A (MAZZAROTTO et al., 2009) foi utilizado como controle negativo.

3.6.2.3 Determinação da Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com os Quatro Sorotipos de DENV e Outros Flavivírus e Alfavírus

A reatividade dos AcM contra os quatro sorotipos de DENV foi determinada por IFI em células C6/36 infectadas. C6/36, em concentração de 1×10^5 células/poço, em placas de cultivo celular de 96 poços, foram infectadas com DENV-1 BR/90, DENV-2 ICC 266, DENV-3 290-02 ou DENV-4 TVP 360 a um MOI de 1. Após 72 h de infecção, as células foram fixadas e utilizadas em IFI. Além disso, foi verificada a especificidade dos AcM contra os flavivírus YFV, SLEV e WNV e contra o alfavírus VEEV. Células HuH7.5 infectadas com YFV cepa 17DD, SLEV 78V6507 ou VEEV cepa TC83 e células Vero E6 infectadas com WNV E/7229/06, todas a um MOI de 1, com 2×10^4 células/poço, por 72 h foram utilizadas em IFI. As IFI foram realizadas da mesma forma que descrito no item 3.6.2.2.

3.6.3 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-DENV

3.6.3.1 Purificação de Anticorpos Monoclonais e Conjugação com Peroxidase

Três AcM foram selecionados com base em sua especificidade contra o DENV e outros flavivírus para serem conjugados com peroxidase e utilizados na padronização de um ensaio imunoenzimático para detecção de IgM anti-DENV. Esses AcM foram primeiramente concentrados, a partir de 1 L de meio de cultivo dos respectivos hibridomas, por precipitação com sulfato de amônio (PERRIN, 1996). Igual volume de solução de sulfato de amônio saturada foi adicionado, gota a gota, sob agitação, ao meio de cultivo dos hibridomas. Após incubação por 1 h, a mistura foi centrifugada por 45 min a 5.000 *xg*. Os AcM precipitados foram então diluídos em um volume mínimo de PBS e dialisados contra PBS. Todo o procedimento foi realizado a 4°C. Na sequência, os AcM concentrados foram purificados em coluna de proteína G (*HiTrap Protein G HP* – GE Healthcare). Cada AcM foi adicionado a uma coluna previamente equilibrada com tampão fosfato. Após lavagem da coluna com tampão fosfato, o AcM foi eluído em tampão glicina, sendo imediatamente neutralizado em tampão tris-HCl 1M (pH 9,0). Os AcM purificados foram então dialisados contra tampão carbonato, para posterior conjugação com peroxidase.

Para a conjugação, foi utilizado o método descrito por Wisdom com pequenas alterações (2005). Para tanto, 2 mg de peroxidase foram incubados com 100 µL periodato de sódio a 0,1 M e dialisados contra tampão acetato de sódio a 1 mM (pH 4,4). O pH da solução de peroxidase foi ajustado para 9,0-9,5 por adição de 10 µL de tampão carbonato a 0,2 M (pH 9,5) e a peroxidase foi imediatamente adicionada a 4 mg do AcM purificado. Após 2 h de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de boroidreto de sódio (a 4 mg/mL), seguindo com nova incubação por 2 h a temperatura ambiente. O anticorpo conjugado foi então purificado por precipitação com sulfato de amônio.

3.6.3.2 Padronização de Ensaio Tipo ELISA para Detecção de IgM anti-DENV

Para a detecção de IgM anti-DENV, primeiramente foi padronizado um ensaio do tipo ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA), utilizando uma mistura de soros positivos (com IgM anti-DENV) e um soro sabidamente negativo. Após serem testados diferentes parâmetros do teste, como diferentes tampões e reagentes, em diferentes volumes e concentrações, foi estabelecido o protocolo. Por este protocolo, módulos de placa de ELISA (Nunc, Thermo Scientific) foram sensibilizados com 100 ng/poço de anticorpo anti-IgM humana diluído em tampão carbonato (volume final de 100 μ L) durante no mínimo 16 h a 4°C em câmara úmida. A seguir, foi realizado um bloqueio dos sítios inespecíficos por meio da adição de 200 μ L/poço de PBS-T com 2% de leite desnatado, com incubação por 40 min a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as placas secas podiam ser utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20°C para uso posterior, sendo utilizadas placas armazenadas por até uma semana. Foram então adicionados 100 μ L/poço dos soros-teste diluídos 1/50 em PBS, seguidos de 100 μ L/poço de uma mistura de DENV dos quatro sorotipos. Esta mistura consiste em 0,5 μ g de DENV-1, -3 e -4 e 1 μ g de DENV-2 por poço diluídos em PBS. Seguiu-se com a adição de 50 μ L/poço de AcM D3 424/8G conjugado com peroxidase diluído 1/400 em PBS-T contendo 2% de leite desnatado. Entre cada etapa, foi realizada uma incubação por 1 h a 37°C em câmara úmida, seguida de três lavagens com 200 μ L/poço de PBS-T. Ao final, foram realizadas cinco lavagens com PBS-T. Por fim, a reação foi detectada com TMB (100 μ L/poço – KPL), sendo interrompida pela adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico a 2M após 6 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biotek®, modelo Synergy H1) a 450 nm. As amostras foram testadas em duplicata, sendo feita a média de suas absorbâncias. Para calcular a absorbância de cada amostra, foi descontado o valor do branco da reação.

Após essa padronização inicial, foi determinado o valor de corte do ensaio utilizando-se um painel de 45 amostras de soro de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas. O valor de corte foi determinado como a média das absorbâncias desses soros negativos mais três vezes o desvio padrão. Foram definidas como amostras indeterminadas as que apresentavam até um desvio padrão acima ou abaixo do valor de corte.

Para a validação do teste, foram ainda analisadas amostras de soro de pacientes com infecção aguda por DENV; amostras de soros de indivíduos com suspeita de dengue, mas com resultado negativo no teste *PanBio IgM capture assay*; de indivíduos com infecção aguda por outro flavivírus e indivíduos com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus (Tabela 1). As amostras positivas foram assim definidas utilizando-se o teste *PanBio IgM capture assay*. Com os resultados obtidos para todos esses soros, foram calculados os valores de especificidade e sensibilidade do teste desenvolvido. Os grupos 3 a 5 foram utilizados para análise da reatividade cruzada.

TABELA 1 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-DENV

Identificação	Quantidade	Descrição
Grupo 1	76	Amostras de soro de pacientes com infecção aguda por DENV
Grupo 2	45	Amostras de soro de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas
Grupo 3	5	Amostras de soro de indivíduos sintomáticos, com suspeita de dengue, mas negativos no teste para IgM anti-DENV
Grupo 4	19	Amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por outro flavivírus (SLEV)
Grupo 5	39	Amostras de soro de indivíduos com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus: EBV (n=13), CMV (n=10), VDRL-positivo (n=11), toxoplasmose (n=5)

EBV: vírus Epstein-Barr; CMV: citomegalovírus; VDRL: *Venereal Disease Research Laboratory*, para diagnóstico de sífilis.

3.7 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS

3.7.1 Produção de Partículas-Tipo-Vírus do SLEV (SLE_VLP) em Células HEK 293T

Para a padronização de um ensaio para diagnóstico de infecção pelo SLEV, optou-se por uma estratégia diferente: a de utilizar partículas-tipo-vírus de SLEV. Para a obtenção de SLE_VLPs, foi desenhado um gene sintético tomando por base o trabalho descrito por Purdy, Noga e Chang (2004). Para o desenho deste gene foram

utilizadas como referência sequências codificantes para as proteínas prM e E de SLEV identificados em São Paulo e na Argentina disponíveis no *GenBank* (acessos FJ753286, AY632544, EF158061, EF158068 e EF158063 para a prM e acessos DQ385450, DQ385451, DQ022950, AF205474 e AF205473 para a E). O gene desenhado contém a sequência codificante para a proteína prM e para o ectodomínio da proteína E do SLEV, associada à sequência sinal (na porção N-terminal) e ao endodomínio da proteína E (na porção C-terminal) do vírus da encefalite japonesa (JEV). Este gene contém ainda um sítio para clivagem com a enzima BamHI e a sequência de Kozak (GCCGCCGCCATGG) na extremidade 5' e um códon de parada (TGA) e um sítio para a enzima BstBI na extremidade 3' (Figura 22). O gene com otimização de códons para expressão em células humanas foi sintetizado pela GenScript e fornecido sob a forma de um inserto no plasmídeo pUC57.



Figura 22 – Esquema da construção do gene codificante para partículas-tipo-vírus de SLEV (SLE_VLP).

O plasmídeo contendo o gene de SLE_VLP foi adquirido na forma liofilizada. Este gene foi diluído em 20 µL de água nuclease *free* e armazenado a -20°C. Para a obtenção de um maior número de cópias plasmídias, bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes foram transformadas com 100 ng desse plasmídeo. Três colônias isoladas foram selecionadas e amplificadas em 6 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Os clones bacterianos selecionados foram estocados em glicerol a 25% e o DNA plasmidial foi purificado. Este mesmo procedimento foi realizado para o plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] (Invitrogen), escolhido como vetor de expressão. O pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®], no entanto, foi primeiramente ligado a um produto de PCR aleatório para que estivesse em sua forma fechada e pudesse ser propagado em bactérias, passando a ser denominado pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR.

Aproximadamente 1,7 µg do pUC57 contendo o gene de SLE_VLP e 2,4 µg do pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR foram submetidos à digestão com a enzima de restrição BamHI (New England Biolabs), em volume final de 30 µL, por 16 h a 37°C, seguida da digestão com a enzima BstBI (New England Biolabs) por 16 h a 65°C, de

acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da digestão foram purificados a partir da banda em gel de agarose a 0,8% utilizando-se o kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen) e ligados utilizando a enzima *T4 DNA ligase* (Promega). A reação feita por 18 h a 20°C, com a proporção molar inserto:vetor de 3:1, seguindo as instruções do fabricante. O plasmídeo resultante foi denominado pcDNA3.1/V5-His+SLE_VLP (Figura 23).

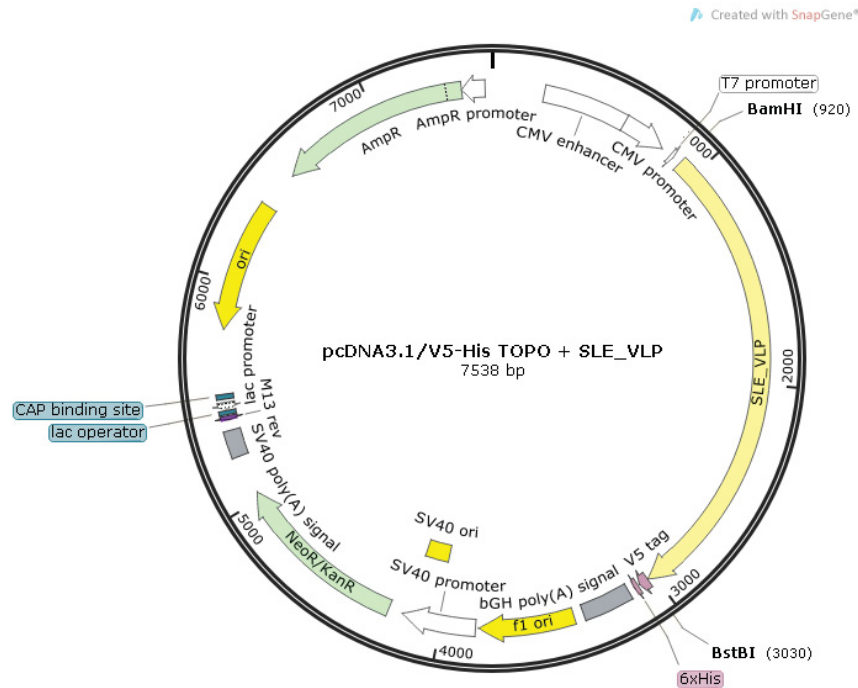


Figura 23 – Mapa do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP, gerado por meio da clonagem do gene sintético SLE_VLP no vetor pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®].

O volume total da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Dez colônias isoladas foram selecionadas e triadas pela técnica de PCR de colônia, utilizando os iniciadores *T7 Promoter* (TAATACGACTCACTATAGGG) e *BGH Reverse* (TAGAAGGCACAGTCGAGG), específicos para regiões do plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] que flanqueiam o sítio de clonagem (Figura 24). Os dois clones positivos foram selecionados para estocagem e purificação do DNA plasmidial. Após nova digestão com as enzimas BamHI e BstBI para confirmar a presença do inserto, um dos clones foi enviado para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado utilizando-se os iniciadores *T7 Promoter* e *BGH Reverse*.

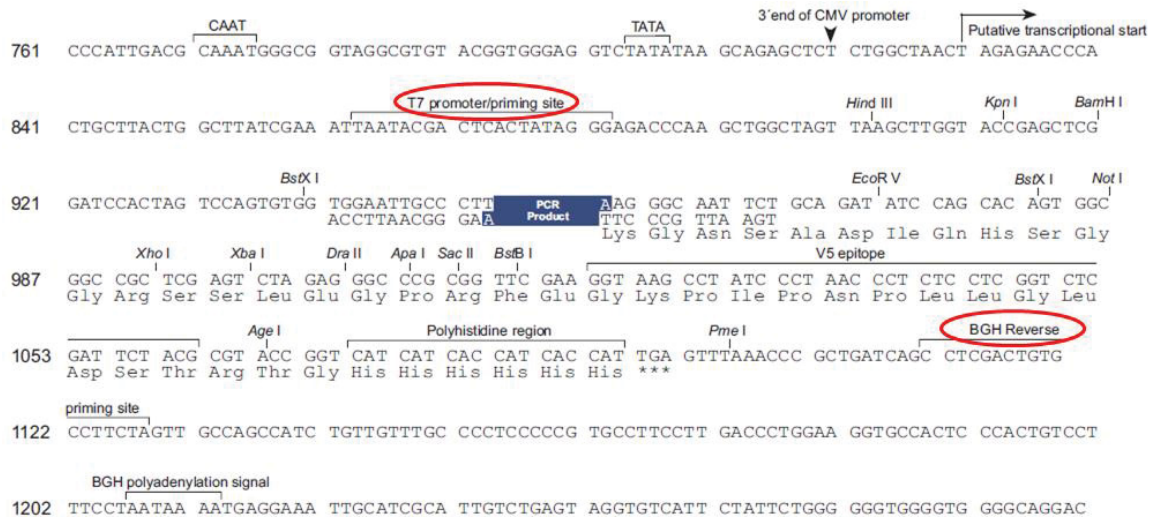


Figura 24 – Segmento do plasmídeo pcDNATM3.1/V5-His TOPO® destacando (em vermelho) os sítios de ligação dos iniciadores T7 *Promoter* e BGH *Reverse*. FONTE: Adaptado do manual *pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression kit* da Invitrogen, disponível em http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcdna3.1topota_man.pdf.

3.7.1.1 Transfecção de Células HEK 293T Mediada por Lipossomos

O pcDNA3.1/V5-His+SLE_VLP foi transfectado em células HEK 293T em um processo mediado por lipossomos, utilizando lipofectina. No dia anterior à transfecção, 5×10^5 células HEK 293T foram adicionadas a poços de uma placa de cultivo celular de 6 poços. No dia da transfecção, 12,5 μL de *Lipofectin® Reagent* (Invitrogen) foram misturados com 87,5 μL de *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™ Supplement* (Gibco) e incubados por 30 min a temperatura ambiente (solução A). No final dessa incubação, 2 μg de DNA plasmidial foram diluídos em *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium*, em volume final de 100 μL (solução B). As soluções A e B foram misturadas e incubadas por 15 min a temperatura ambiente (solução C). À solução C foram adicionados 1.250 μL com *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium* e esta solução foi adicionada sobre células HEK 293T previamente lavadas com 1 mL de *Opti-MEM® I Reduced Serum Medium*. Após 24 h a 37°C, o meio das células foi substituído por meio DMEM F12 com os suplementos descritos no item 3.2 mais 1 mg/mL do antibiótico de seleção G418 (Sigma-Aldrich). O meio das células foi trocado a cada três ou quatro dias, por aproximadamente sete semanas, quando foi verificado que 90-100% das células estavam produzindo a SLE_VLP. A positividade das células foi avaliada periodicamente por IFI, conforme descrito no item 3.4.6. Foi utilizado o

AcM 4G2 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1/300 em PBS com azul de Evans como anticorpo secundário. As células resultantes da transfecção foram denominadas 293T+SLE_VLP.

3.7.1.2 Obtenção de VLP de SLEV (SLE_VLP)

Para a produção de SLE_VLP, foram utilizadas garrafas de cultivo celular de 300 cm² contendo uma quantidade inicial de 1 x 10⁶ células 293T+SLE_VLP (em volume de 100 mL) ou em biorreatores com capacidade de 250 mL a 1 L de meio de cultivo. O meio de cultivo das células foi coletado após 6 dias, quando a produção foi realizada em garrafas de cultivo, ou quando o meio se apresentava acidificado (verificado pela coloração amarelada do meio), quando utilizado biorreator. O meio de cultivo foi então centrifugado por 10 min a 1.250 xg. As VLPs foram concentradas a partir do sobrenadante da centrifugação por meio da adição de 7% (m/v) de PEG 8000 e 2,3% (m/v) de NaCl, com incubação por aproximadamente 16 h a 4°C sob agitação branda. Após centrifugação por 30 min a 17.500 xg a 4°C, o *pellet* contendo as SLE_VLPs foi recuperado em PBS, em volume 100 vezes menor que o volume inicial de meio de cultivo, e armazenado a -20°C. Todo este procedimento foi realizado em paralelo com células 293T não transfectadas, obtendo-se assim o MOCK para essas VLPs.

A obtenção de SLE_VLPs foi verificada por *western blot* (item 3.4.4) utilizando o AcM 4G2 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina diluído 1/7.500 como anticorpo secundário.

3.7.2 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-SLEV

Para a detecção de IgM anti-SLEV foi padronizado um ensaio do tipo ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA). A padronização deste ensaio foi realizada utilizando-

se uma mistura de soros positivos (com IgM anti-SLEV) e um soro sabidamente negativo, sendo avaliados diferentes tampões, diferentes reagentes e em diferentes diluições e diferentes tempos de incubação.

Por esse protocolo, módulos de placa de ELISA (Nunc, Thermo Scientific) foram sensibilizados com 100 ng/poço de anticorpo anti-IgM humana diluído em tampão carbonato (volume final de 100 μ L) durante no mínimo 16 h a 4°C em câmara úmida. A seguir, foi realizado um bloqueio dos sítios inespecíficos por meio da adição de 200 μ L/poço de PBS-T com 2% de leite desnatado, com incubação por 40 min a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as placas secas podiam ser utilizadas imediatamente ou armazenadas a -20°C para uso posterior, sendo utilizadas placas armazenadas por até uma semana. Foram então adicionados 50 μ L/poço dos soros-teste diluídos 1/50 em PBS, seguidos de 50 μ L/poço da SLE_VLP ou MOCK diluídos 1/4 em PBS e então 50 μ L/poço de AcM D3 424/8G conjugado com peroxidase diluído 1/400 em PBS-T contendo 2% de leite desnatado. Entre cada etapa, foi realizada uma incubação por 1 h a 37°C em câmara úmida, seguida de três lavagens com 200 μ L/poço de PBS-T, exceto após a incubação com o anticorpo conjugado, em que foram realizadas cinco lavagens com PBS-T. Por fim, a reação foi detectada com TMB (100 μ L/poço – KPL), sendo interrompida pela adição de 50 μ L/poço de ácido sulfúrico a 2M após 6 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biotek®, modelo Synergy H1) a 450 nm. Para interpretação dos resultados, primeiramente o valor do branco da reação foi descontado da absorbância de cada amostra e então foi feita a diferença entre as absorbâncias obtidas com o antígeno positivo (SLE_VLP) e com o antígeno negativo (MOCK).

Após a padronização, iniciou-se o processo de validação do teste, sendo analisadas amostras de soros humanos classificados em distintos grupos: (1) pacientes com infecção aguda por SLEV; (2) indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas; (3) indivíduos saudáveis que moram em regiões de alta prevalência da doença, com IgG anti-SLEV; (4) indivíduos com infecção aguda por outro flavivírus; (5) indivíduos com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus. A quantidade de amostra por grupo está especificada na Tabela 2. As amostras positivas (grupo 1) são provenientes do surto ocorrido na Argentina em 2005 (SPINSANTI et al., 2008) e foram assim definidas utilizando-se outros dois testes: (1) teste de neutralização por redução de unidades formadores de placas (PRNT), que é

o padrão-ouro para detecção de anticorpos anti-SLEV, porém que não discrimina anticorpos IgG de IgM; (2) ELISA para detecção de IgM utilizando como antígeno o vírus produzido em cérebro de camundongos recém-nascidos.

O valor de corte do ensaio foi determinado como a média das absorbâncias dos soros de indivíduos saudáveis (grupo 2 da Tabela 2) mais três vezes o desvio padrão. Utilizando os resultados dos cinco grupos de soro, foram calculados os valores de especificidade e sensibilidade do teste desenvolvido. Os grupos 4 e 5 foram utilizados para análise da reatividade cruzada.

TABELA 2 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-SLEV

Identificação	Quantidade	Descrição
Grupo 1	19	Amostras de soro de pacientes com infecção aguda por SLEV
Grupo 2	43	Amostras de soro de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas
Grupo 3	8	Amostras de soro de indivíduos saudáveis que moram em regiões de alta prevalência de SLEV (Chaco, Argentina)
Grupo 4	14	Amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por outro flavivírus (DENV)
Grupo 5	38	Amostras de soro de indivíduos com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus: EBV (n=12), CMV (n=11), VDRL-positivo (n=11), toxoplasmose (n=4)

EBV: vírus Epstein-Barr; CMV: citomegalovírus; VDRL: *Venereal Disease Research Laboratory*, para diagnóstico de sífilis.

3.8 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO

3.8.1 Produção de Partículas-Tipo-Vírus do WNV (WN_VLP) em Células HEK 293T

A produção de partículas-tipo-vírus de WNV (WN_VLP) foi realizada utilizando-se gene sintético. Para o desenho do gene, foi usado como referência o genoma da cepa NY99. A sequência desse gene contém parte da proteína de capsídeo, correspondente à sequência sinal da proteína prM, precedida da sequência de Kozak, e a sequência codificante para as proteínas prM e E, seguida por um códon

de parada da tradução (TGA). O gene contém ainda um sítio para clivagem com as enzimas de restrição BamHI na extremidade 5' e XhoI na extremidade 3' (Figura 25). O gene com otimização de códons para expressão em células humanas foi sintetizado pela GenScript e fornecido sob a forma de um inserto no plasmídeo pUC57.

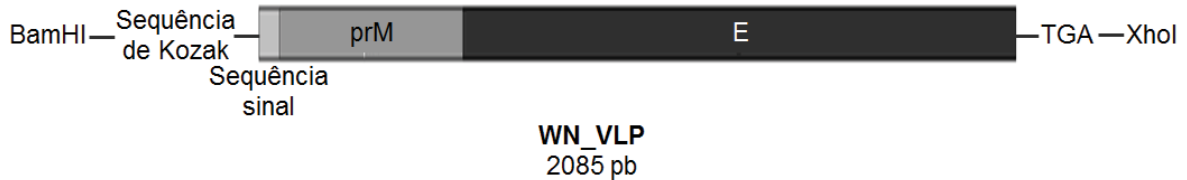


Figura 25 – Esquema da construção do gene codificante para partículas-tipo-vírus de WNV (WN_VLP).

O gene de WN_VLP foi clonado no vetor pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®], resultando no plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP (Figura 26); o plasmídeo recombinante foi transfectado em células HEK 293T e, a partir das células transfectadas, foram obtidas as VLPs de WNV. Esses procedimentos foram realizados da mesma forma que descrito para VLP de SLEV.

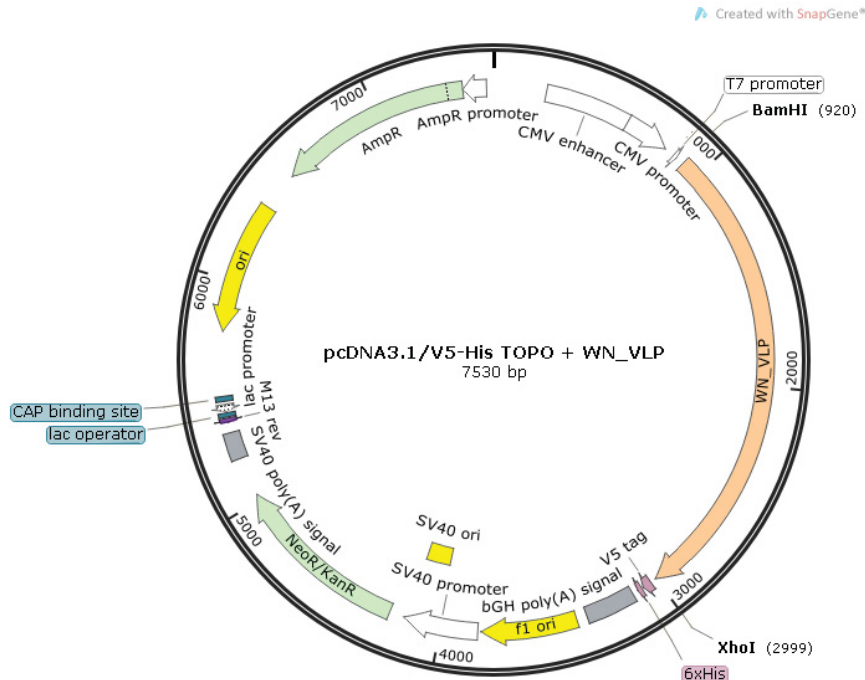


Figura 26 – Mapa do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP, gerado por meio da clonagem do gene sintético WN_VLP no vetor pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®].

3.8.2 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-WNV

O ensaio para detecção de IgM anti-WNV foi realizado da mesma forma que descrito para SLEV (item 3.7.2). A padronização do ensaio foi realizada utilizando um soro positivo (com IgM anti-WNV) e um soro negativo. O protocolo final ficou basicamente igual ao de SLEV, alterando-se apenas as diluições dos soros para 1/100 e da WN_VLP para 1/8 e o tempo de revelação para 5 min.

Este ELISA foi realizado utilizando-se uma amostra positiva (grupo 1), 45 amostras de soros de indivíduos saudáveis (grupo 2) e 71 amostras de indivíduos com outras infecções agudas (grupos 3 e 4 – Tabela 3). Não foi possível determinar o valor de corte do MAC-ELISA, nem os valores de sensibilidade e especificidade, pois foi obtida apenas uma amostra com IgM anti-WNV. A reatividade cruzada foi avaliada utilizando-se amostras de soro de indivíduos com infecção aguda para outros flavivírus (19 soros para DENV e 12 soros para SLEV) e com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus.

TABELA 3 – AMOSTRAS DE SORO HUMANO UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO PARA DETECÇÃO DE IGM ANTI-WNV

Identificação	Quantidade	Descrição
Grupo 1	1	Amostra de soro de paciente com infecção aguda por WNV
Grupo 2	45	Amostras de soro de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas
Grupo 3	31	Amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por outro flavivírus: DENV (n=19) e SLEV (n=12)
Grupo 4	40	Amostras de soro de indivíduos com outras infecções agudas, não causadas por flavivírus: EBV (n=13), CMV (n=11), VDRL-positivo (n=11), toxoplasmose (n=5)

EBV: vírus Epstein-Barr; CMV: citomegalovírus; VDRL: *Venereal Disease Research Laboratory*, para diagnóstico de sífilis.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

4.1.1 Expressão das Proteínas Recombinantes E1 e E2 de CHIKV em Células S2

Os plasmídeos pUC57 contendo os genes sintéticos que codificam o ectodomínio da proteína E1 ou da E2 de CHIKV foram primeiramente utilizados para transformação de bactérias *E. coli* da linhagem TOP10 quimiocompetentes. Três colônias isoladas foram selecionadas para amplificação em meio LB líquido e purificação do DNA plasmidial. O vetor selecionado para expressão das proteínas recombinantes foi o pMt/Bip/V5-His A. Este vetor foi amplificado e purificado da mesma forma.

Os plasmídeos contendo os genes E1-CHIKV e E2-CHIKV, bem como o vetor de expressão pMt/Bip/V5-His A, foram então submetidos a digestão com as enzimas de restrição BglII e XhoI. A visualização em gel de agarose corado com brometo de etídio revelou a presença de bandas de 3.568 pb, correspondentes ao vetor pMt/Bip/V5-His A (Figura 27, 1-3) e bandas de 1.236 pb, 1.074 pb e aproximadamente 2.700 pb, correspondentes a E1-CHIKV, E2-CHIKV e pUC57, respectivamente (Figura 27, 4-9).

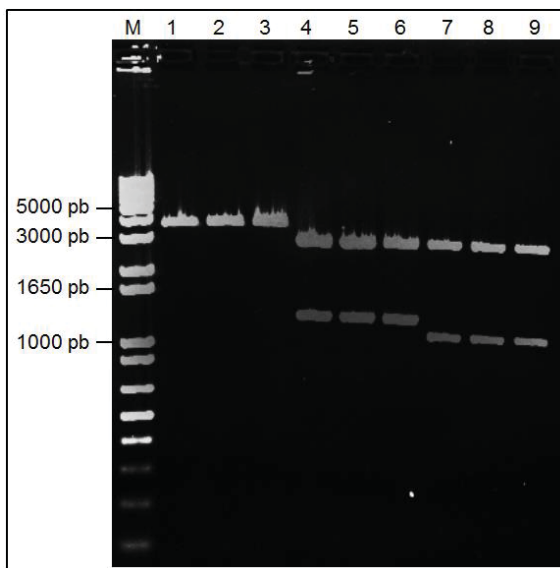


Figura 27 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pMt/Bip/V5-His A (1-3) e dos fragmentos de DNA codificantes para o ectodomínio das proteínas E1 (4-6) e E2 (7-9) do CHIKV em pUC57 e após digestão com as enzimas de restrição BglIII e XhoI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

Uma vez verificado que todos os clones bacterianos selecionados continham os genes de interesse, os fragmentos de DNA correspondentes ao pMt/Bip/V5-His A e aos genes E1-CHIKV e E2-CHIKV obtidos cada um a partir de um dos clones foram purificados com o intuito de retirar contaminantes que pudessem interferir com a posterior reação de ligação do inserto ao vetor (Figura 28).

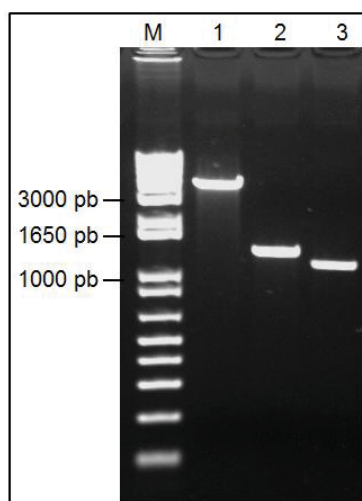


Figura 28 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pMt/Bip/V5-His A (1) e dos fragmentos de DNA codificantes para o ectodomínio das proteínas E1 (2) e E2 (3) do CHIKV purificados após digestão com as enzimas de restrição BglIII e XhoI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

Os fragmentos de DNA correspondentes aos genes E1-CHIKV e E2-CHIKV e o vetor purificados foram então submetidos a reações de ligação e em seguida

utilizados para transformar bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Os plasmídeos recombinantes resultantes foram denominados pE1-CHIKV e pE2-CHIKV, respectivamente. Os clones bacterianos contendo os plasmídeos recombinantes foram identificados pela técnica de palitagem, que permite a seleção por tamanho molecular, tendo sido selecionados cinco clones de cada reação de transformação para a análise. Pela Figura 29, pode-se perceber que todas as colônias triadas potencialmente contêm os plasmídeos recombinantes. Assim, os clones identificados como 3 e 10 foram selecionados para estocagem em glicerol e purificação do DNA plasmidial.

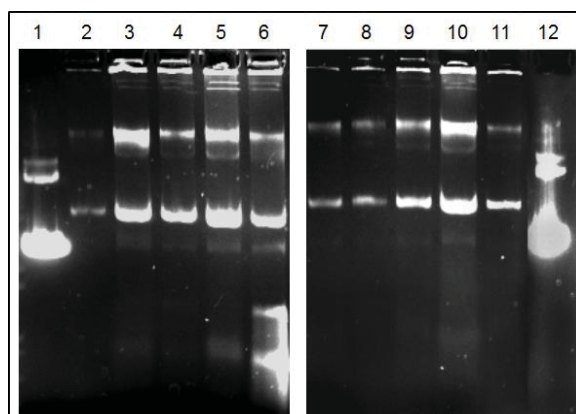


Figura 29 – Triagem dos potenciais clones contendo os plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV pela técnica de palitagem. Análise em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. 1 e 12: controle (pMt/Bip/V5-His A sem inserto); 2-6: colônias de bactérias transformadas com pE1-CHIKV; 7-11: colônias de bactérias transformadas com pE2-CHIKV.

Para confirmar a presença do inserto de DNA de interesse, o DNA plasmidial purificado foi submetido à digestão com as enzimas de restrição BglII e XhoI, e o resultado visualizado em gel de agarose a 0,8%. Na Figura 30 pode-se verificar a presença de bandas correspondente a E1-CHIKV (1.236 pb – coluna 2 da Figura 30), a E2-CHIKV (1.074 pb – coluna 4 da Figura 30) e ao plasmídeo pMt/Bip/V5-His (3.568 pb – colunas 2 e 4 da Figura 30). Para fins de comparação os plasmídeos pE1-CHIKV (4.798 pb – coluna 1 da Figura 30) e pE2-CHIKV (4.636 pb – coluna 3 da Figura 30) não-digeridos também foram aplicados no gel. A determinação da sequência nucleotídica destes plasmídeos demonstrou a correta fase de leitura e a ausência de mutações nos insertos clonados.

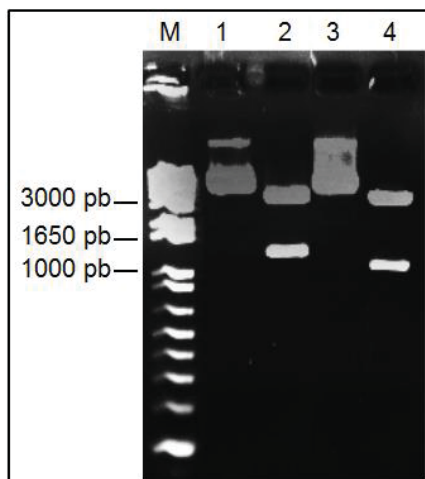


Figura 30 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio dos plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV digeridos com as enzimas BglIII e XhoI para confirmar a presença dos insertos de interesse. M: padrão de tamanho molecular (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen); 1: pE1-CHIKV não-digerido; 2: pE1-CHIKV digerido; 3: pE2-CHIKV não-digerido; 4: pE2-CHIKV digerido.

Os plasmídeos pE1-CHIKV e pE2-CHIKV foram utilizados para a transfecção transitória de células S2 de *D. melanogaster*. Para determinar as melhores condições para expressão proteica, a indução da expressão foi realizada em um período de 24 a 96 h após a transfecção e as células e o meio de cultivo foram coletados entre 48 e 120 h após a transfecção. As amostras foram analisadas por *western blot*. Na Figura 31 é mostrado o perfil de bandas correspondentes às proteínas rE1-CHIKV (~49 kDa), rE2-CHIKV (~45 kDa) e GFP (~34 kDa – controle positivo). Por comparação visual da intensidade das bandas, foi determinado que os melhores tempos para indução e recolhimento para a expressão da proteína rE1-CHIKV são de 48 h e 120 h, respectivamente, e para rE2-CHIKV, 48 h e 72 h, respectivamente.

A seguir, foram testadas diferentes concentrações de CuSO₄ para determinar a melhor condição para indução. A Figura 32 mostra o perfil de bandas referentes à expressão das proteínas recombinantes após a indução com 500 μM, 700 μM e 900 μM de CuSO₄. Por comparação visual da intensidade das bandas, foi estabelecida a concentração de 500 μM de CuSO₄ para indução da expressão de rE1-CHIKV e 700 μM para rE2-CHIKV.

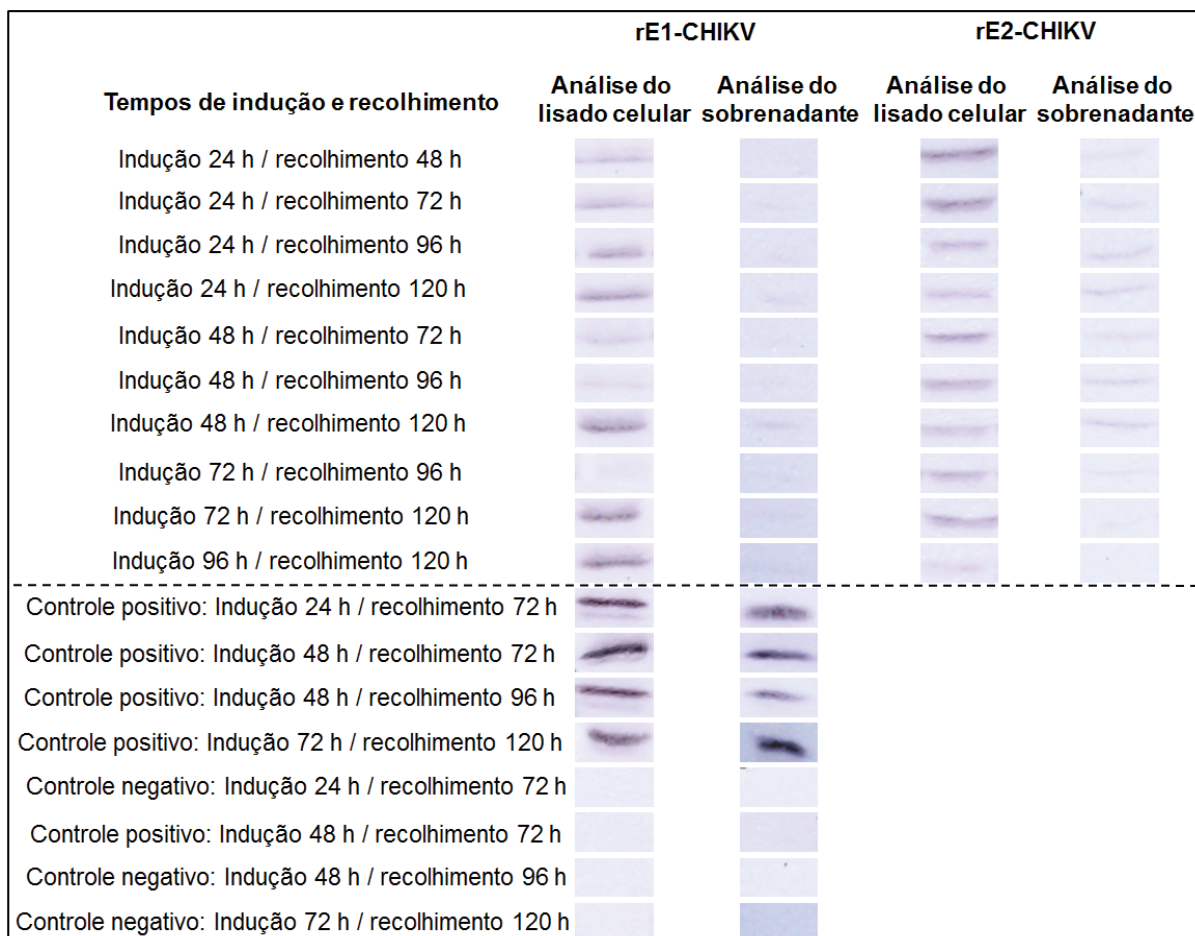


Figura 31 – Análise da expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV em diferentes tempos de indução e de recolhimento após a transfecção. A análise foi feita por *western blot* utilizando anticorpos anti-V5 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina como anticorpo secundário.

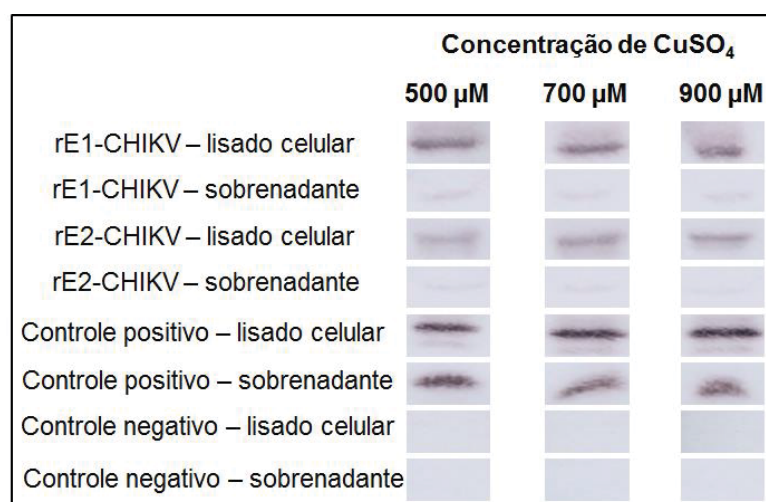


Figura 32 – Análise da expressão de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV após indução da expressão proteica com diferentes concentrações de CuSO₄. A análise foi feita por *western blot* utilizando anticorpos anti-V5 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina como anticorpo secundário.

Após a otimização da expressão das proteínas de interesse, foi realizada a cotransfecção de células S2 com os plasmídeos pE1-CHIKV ou pE2-CHIKV e o

plasmídeo pCoBlast para a geração de linhagens celulares estáveis. Uma vez obtidas as linhagens celulares estáveis, denominadas S2/E1-CHIKV e S2/E2-CHIKV, foram iniciados os ensaios para purificação das proteínas recombinantes. Essas proteínas são expressas fusionadas a uma cauda de poli-histidina, o que possibilitou sua purificação por cromatografia de afinidade por íons²⁺ metálicos imobilizados, utilizando resina com íons níquel.

Pela Figura 33, pode-se perceber que ambas as proteínas foram purificadas tanto na fração insolúvel (presentes no lisado celular), quanto na fração solúvel (no sobrenadante), com uma pequena perda de proteína na fração não-ligada à resina, nas lavagens e, em alguns casos, na resina, após as quatro eluições. Porém, em todos os casos, apesar das proteínas de interesse estarem sendo eluídas, outras proteínas estavam sendo copurificadas. Além disso, antes da purificação, havia uma alta concentração de proteínas com massa molecular próxima a 50 kDa, que é próxima à massa das proteínas de interesse (~49 kDa para rE1-CHIKV e ~45 kDa para rE2-CHIKV), em especial no meio de cultivo, e que provavelmente correspondia à albumina presente no soro bovino fetal adicionado ao meio de cultura dessas células. A fim de otimizar o processo de purificação, as células S2/E1-CHIKV e S2/E2-CHIKV foram adaptadas ao meio SF-900II (Invitrogen), um meio que não necessita adição de soro bovino fetal.

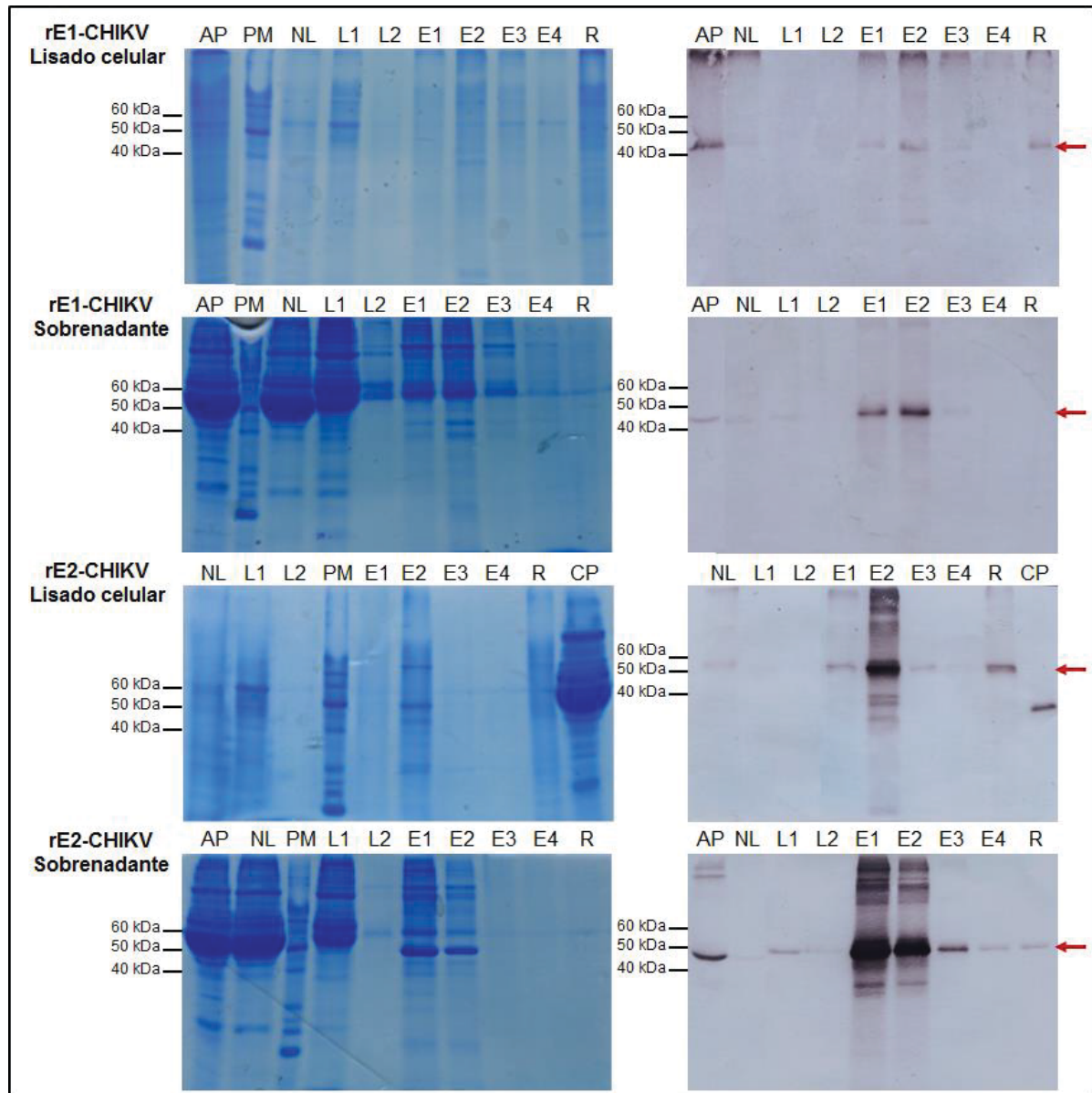


Figura 33 – Análise da purificação de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV a partir do lisado celular e do meio de cultivo (sobrenadante). A análise foi feita por SDS-PAGE sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 13% corado com solução de azul de *Coomassie* (figuras à esquerda) e *western blot* utilizando anticorpos anti-V5, seguido de anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (figuras à direita). PM: padrão de massa molecular (BenchMark™ *Protein Ladder*, Invitrogen); AP: antes de purificar; NL: fração não ligada à resina; L1 e L2: lavagens 1 e 2; E1-E4: eluições 1 a 4; R: resina; CP: controle positivo (GFP). As setas vermelhas indicam as proteínas de interesse.

Uma vez adaptadas ao meio SF-900II, as células foram induzidas a expressar as respectivas proteínas recombinantes e novos testes de purificação proteica foram realizados. Os resultados das purificações estão apresentados na Figura 34. Por esta figura, novamente pode-se observar que ambas as proteínas podem ser obtidas a partir das frações insolúveis, mas também estão sendo secretadas no meio de cultivo. Os melhores resultados foram obtidos para a proteína rE2-CHIKV, a qual foi obtida purificada a partir do meio de cultivo. Embora a banda correspondente à proteína de

interesse tenha menor intensidade quando utilizado meio SF-900II, a purificação mais eficiente da proteína compensa o uso deste meio de cultivo. Com essas purificações, foram obtidas concentrações de proteína purificada de aproximadamente 12,5 µg/mL. A proteína rE1-CHIKV, por outro lado, foi obtida em menor quantidade (não sendo visualizada por SDS-PAGE corado com azul de *Coomassie* – Figura 34), embora ainda fossem visíveis outras proteínas.

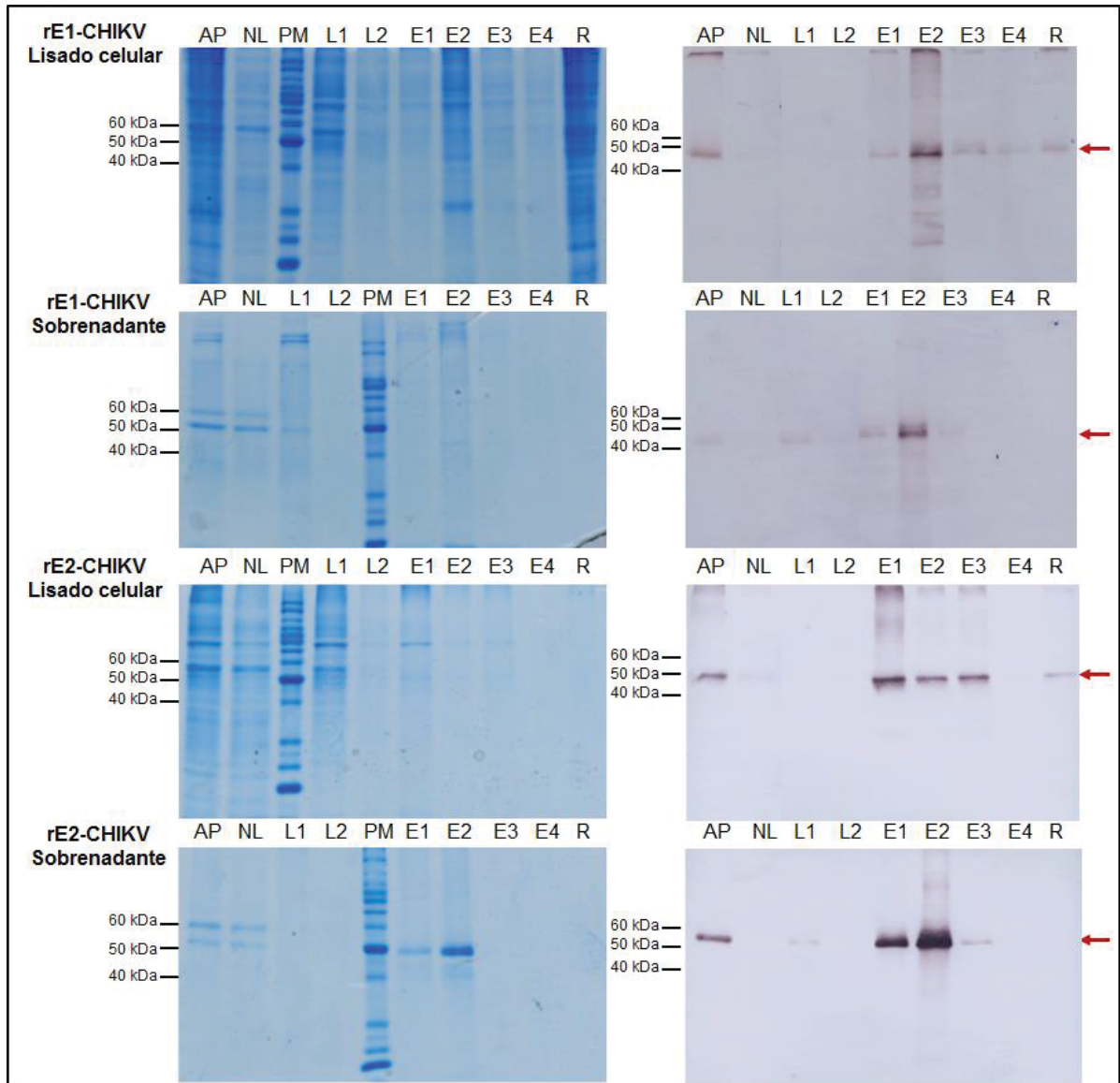


Figura 34 – Análise da purificação de rE1-CHIKV e rE2-CHIKV a partir do lisado celular e do meio de cultivo de células cultivadas em meio SF-900II. A análise foi feita por SDS-PAGE sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 13% corado com solução de azul de *Coomassie* (figuras à esquerda) e *western blot* utilizando anticorpos anti-V5, seguido de anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (figuras à direita). PM: padrão de massa molecular (BenchMark™ *Protein Ladder*, Invitrogen); AP: antes de purificar; NL: fração não ligada à resina; L1 e L2: lavagens 1 e 2; E1-E4: eluições 1 a 4; R: resina. As setas vermelhas indicam as proteínas de interesse.

Além de serem obtidos melhores resultados na purificação da rE2-CHIKV, a proteína E2 é a responsável pela ligação do vírus a receptores na célula hospedeira e pela indução de anticorpos neutralizantes. Por isso, optou-se por continuar o trabalho com esta proteína.

A proteína rE2-CHIKV foi então utilizada para a imunização de camundongos (descrita no item 4.1.2).

4.1.2 Produção e Caracterização de Anticorpos Monoclonais contra o CHIKV

Para a obtenção de AcM contra a proteína rE2-CHIKV, camundongos *Mus musculus* da linhagem isogênica Balb/c foram imunizados com essa proteína. Alíquotas de soro foram coletadas antes da imunização e sete dias após a terceira dose. A presença de anticorpos anti-rE2-CHIKV foi verificada por ELISA, utilizando o protocolo descrito no item 3.5.3.5, exceto pelos soros terem sido diluídos em PBS-T contendo 1% de BSA. Os soros foram testados nas diluições 1/200 a 1/512.000, sendo que todos os camundongos apresentaram títulos de anticorpos anti-rE2-CHIKV maiores ou iguais a 256.000. Os três camundongos, portanto, foram utilizados para a obtenção de AcM contra essa proteína.

Após a fusão, seleção dos hibridomas produtores de anticorpos de interesse e clonagem por diluição limitante, foram obtidos três hibridomas secretores de AcM contra a proteína rE2-CHIKV. Esses AcM, denominados 1G1, 3A12 e 12A6, foram caracterizados quanto a seu isotipo, sendo todos eles do isotipo IgG1, com cadeia leve *kappa*.

Uma vez que a triagem dos AcM foi realizada por ELISA, não é possível verificar se os anticorpos são específicos para a proteína recombinante ou se reagem com algum componente da célula na qual a proteína foi produzida. Por isso, a especificidade dos AcM para a rE2-CHIKV foi analisada por IFI em células S2 transfectadas induzidas a expressar a proteína recombinante e em células S2 não transfectadas (MOCK) e por *western blot*. A Figura 35 ilustra o padrão de reatividade dos AcM com a proteína recombinante por IFI. Nenhum AcM reagiu com a célula não transfectada (dados não mostrados). A Figura 36 mostra a reatividade dos AcM com a proteína rE2-CHIKV pela técnica de *western blot*, sendo verificadas duas bandas

correspondentes à proteína recombinante. A banda de menor massa molecular provavelmente consiste na rE2-CHIKV sem a porção C-terminal (na qual estão o epítipo V5 e a cauda de poli-histidina), uma vez que esta banda não é detectada com anticorpo anti-V5. Por fim, os AcM foram testados contra o alfavírus VEEV e contra diferentes flavivírus (DENV 1-4, SLEV e WNV), não apresentando reatividade cruzada para nenhum deles (Figura 37).

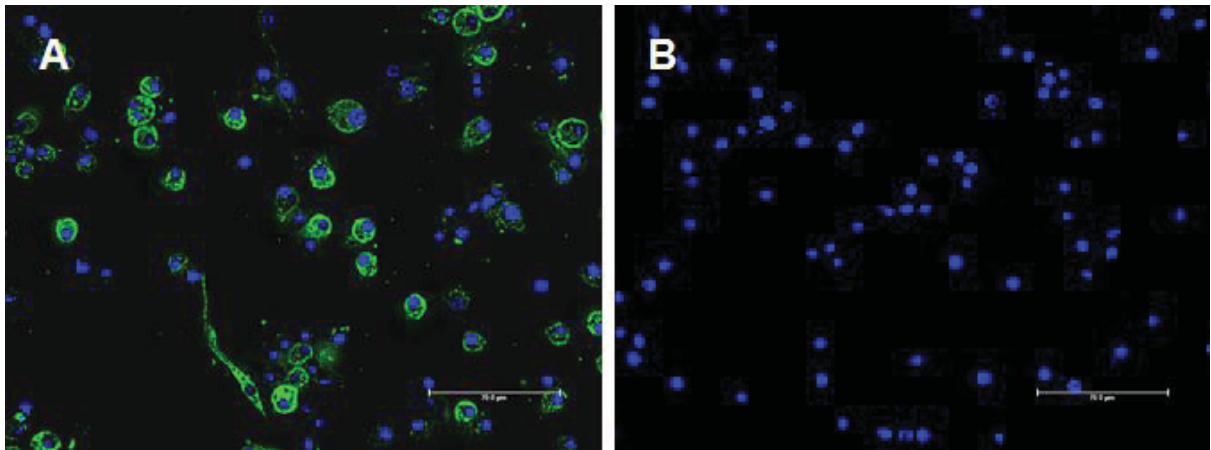


Figura 35 – Reatividade dos anticorpos monoclonais com a proteína rE2-CHIKV por imunofluorescência indireta em células S2/E2-CHIKV. A reação foi feita com os AcM, seguida por anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. A: AcM anti-E2 (todos os AcM apresentaram o mesmo padrão de reatividade); B: AcM não-relacionado (anti-hantavírus, clone 572/7A). Barras de escala: 70 µm.

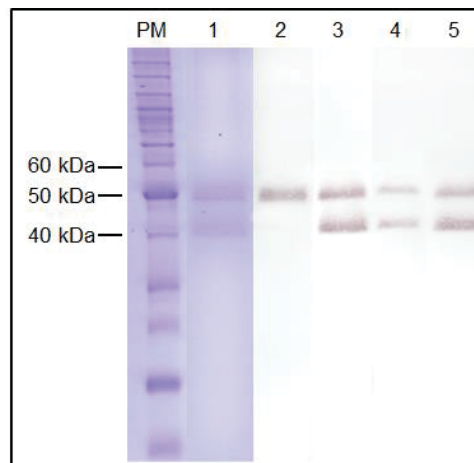


Figura 36 – Reatividade dos AcM com a proteína rE2-CHIKV por *western blot*. A proteína rE2-CHIKV foi submetida a SDS-PAGE em gel de poli-acrilamida a 13% e transferida para membrana de nitrocelulose. A reatividade dos AcM com a rE2-CHIKV foi detectada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. Anticorpo anti-V5 foi utilizado como controle positivo (2). O perfil proteico da rE2-CHIKV pode ser visualizado no gel corado com solução de azul de *Coomassie* (1). PM: padrão de massa molecular (BenchMark™ *Protein Ladder*, Invitrogen). 3: 1G1; 4: 3A12; 5: 12A6.

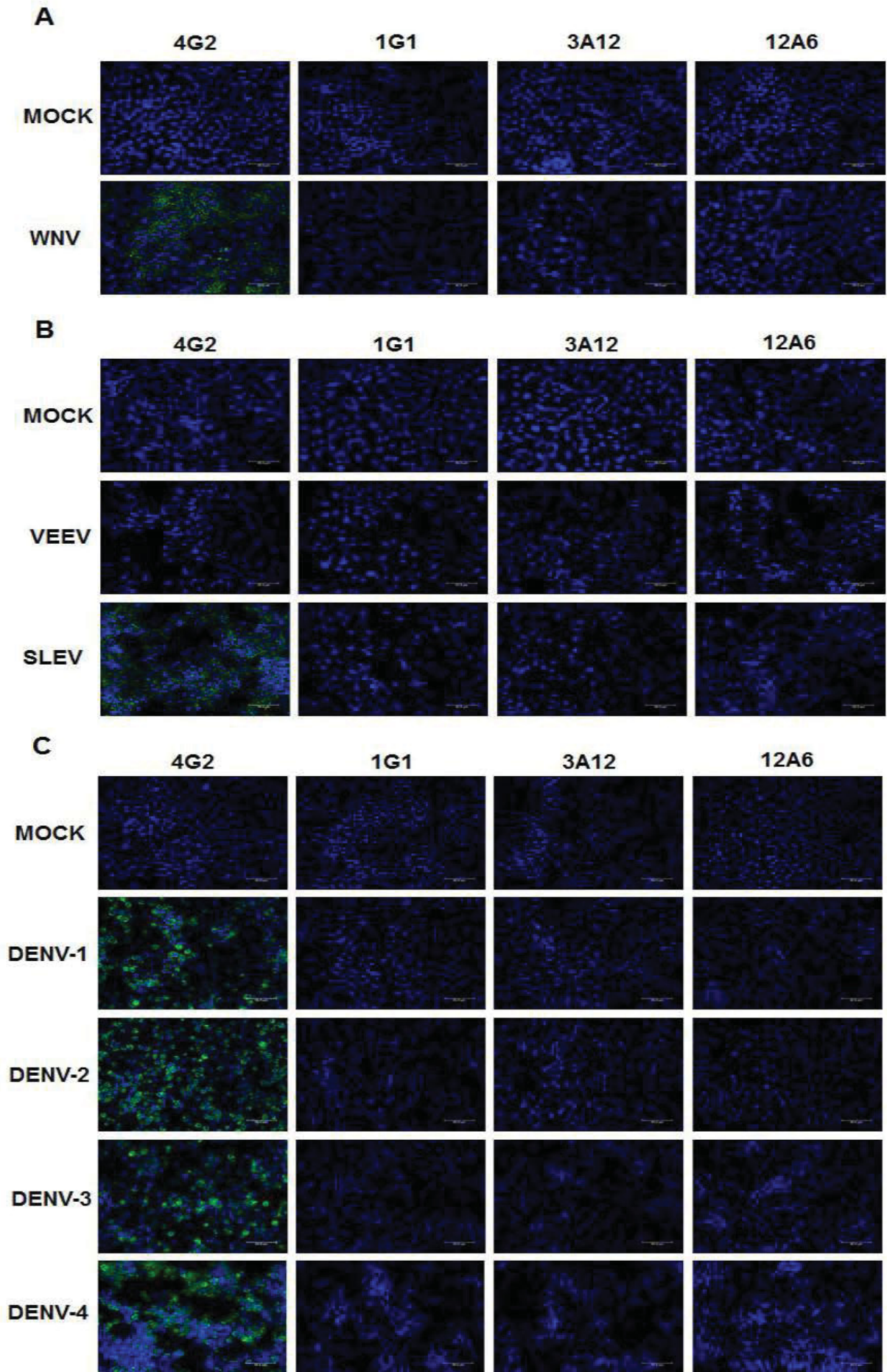


Figura 37 – Reatividade dos anticorpos monoclonais 1G1, 3A12 e 12A6 com VEEV, WNV, SLEV e DENV 1-4. IFI em células Vero E6 (A) infectadas com WNV, HuH7.5 (B) com VEEV ou SLEV e C6/36 (C) com DENV sorotipos 1 a 4 ou não infectadas (MOCK). As células foram fixadas com metanol:acetona e marcadas com os diferentes AcM, seguidos de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. O AcM 4G2 foi utilizado como controle positivo para as infecções com flavivírus. Barras de escala: 50 μ m.

4.1.3 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-CHIKV

Para o desenvolvimento de um ensaio para detecção de IgM anti-CHIKV, foi realizado um ELISA do tipo indireto utilizando-se a rE2-CHIKV como antígeno. Outros formatos de ELISA (como de captura da IgM e de captura de antígeno) foram testados durante o processo de padronização (dados não mostrados), nos quais foram utilizados os AcM produzidos neste trabalho, mas o que apresentou melhores resultados até o momento foi o ELISA indireto.

A padronização foi realizada em paralelo com as proteínas rE2-CHIKV e CHIK.sE2-SNAP. Primeiramente, foi verificado que a CHIK.sE2-SNAP também é reconhecida pelos AcM anti-rE2-CHIKV (Figura 38).

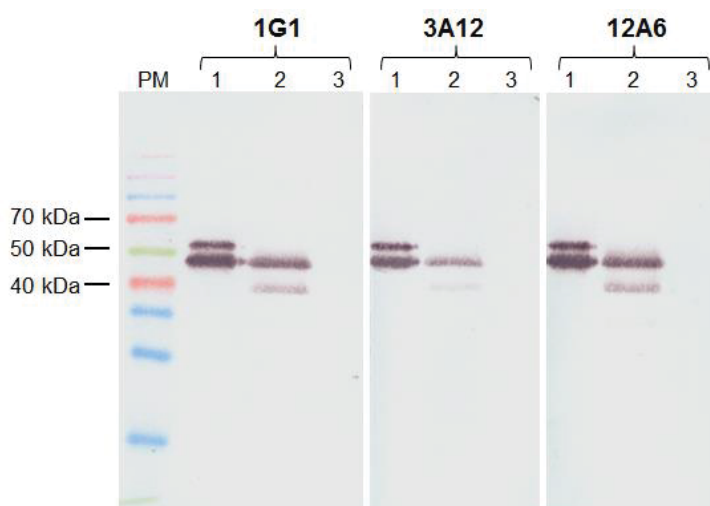


Figura 38 – Reatividade da proteína CHIK.sE2-SNAP pelos AcM anti-rE2-CHIKV por *western blot*. A proteína rE2-CHIKV e o MOCK foram utilizados como controle. As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliácridamida a 13% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A reação foi detectada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. PM: padrão de massa molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). 1: CHIK.sE2-SNAP; 2: rE2-CHIKV; 3: MOCK.

Para a determinação do valor de corte do teste, foi utilizado um painel de soros sabidamente negativos provenientes de área com a circulação do CHIKV (n=10) gentilmente cedido pelo Instituto Pasteur da Guiana, sendo o valor de corte definido como a média das absorvâncias dos soros negativos mais três vezes o desvio padrão. Na Figura 39 estão apresentadas as absorvâncias obtidas com os soros negativos, a sua média e desvio padrão utilizando-se a rE2-CHIKV (média = 0,026 e desvio padrão = 0,042) e a CHIK.sE2-SNAP (média = 0,132 e desvio padrão = 0,071) como antígeno. Como valor de corte, portanto, foi considerado o valor de absorvância de 0,152 no ELISA com a rE2-CHIKV e 0,345 com a CHIK.sE2-SNAP.

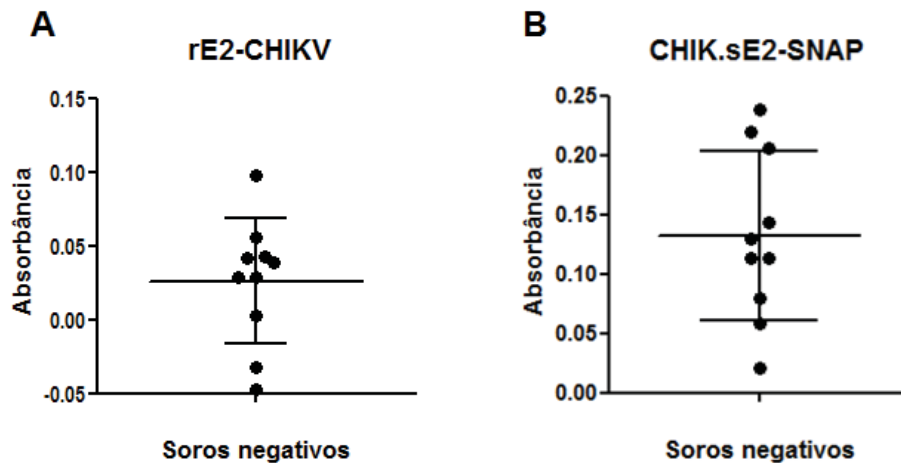


Figura 39 – Resultado dos soros negativos para CHIKV no ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV (A) e a CHIK.sE2-SNAP (B) como antígeno. Estão apresentados os valores de absorvância, com a média e o desvio padrão.

Uma vez estabelecido o valor de corte, os demais soros do painel cedido pelo Instituto Pasteur da Guiana foram testados pelo ELISA indireto utilizando as duas proteínas recombinantes (Figura 40). Por esse teste, foram obtidas seis amostras falso-negativas entre as 20 amostras com IgM anti-CHIKV ao utilizar a rE2-CHIKV e cinco amostras ao utilizar a CHIK.sE2-SNAP. Essa diferença provavelmente se deve à maior absorvância obtida com a CHIK.sE2-SNAP, uma vez que outras amostras estão próximas ao valor de corte. Isso indica que o desempenho do ELISA com a rE2-CHIKV foi bastante parecido ao desempenho com a CHIK.sE2-SNAP.

Devido aos resultados falso-negativos, estes soros também foram testados em um ensaio do tipo MAC-ELISA utilizando como antígeno CHIKV produzido em cérebro de camundongos neonatos, fornecido pelo Instituto Evandro Chagas ao LACEN/PR. Este ensaio confirmou a positividade das vinte amostras.

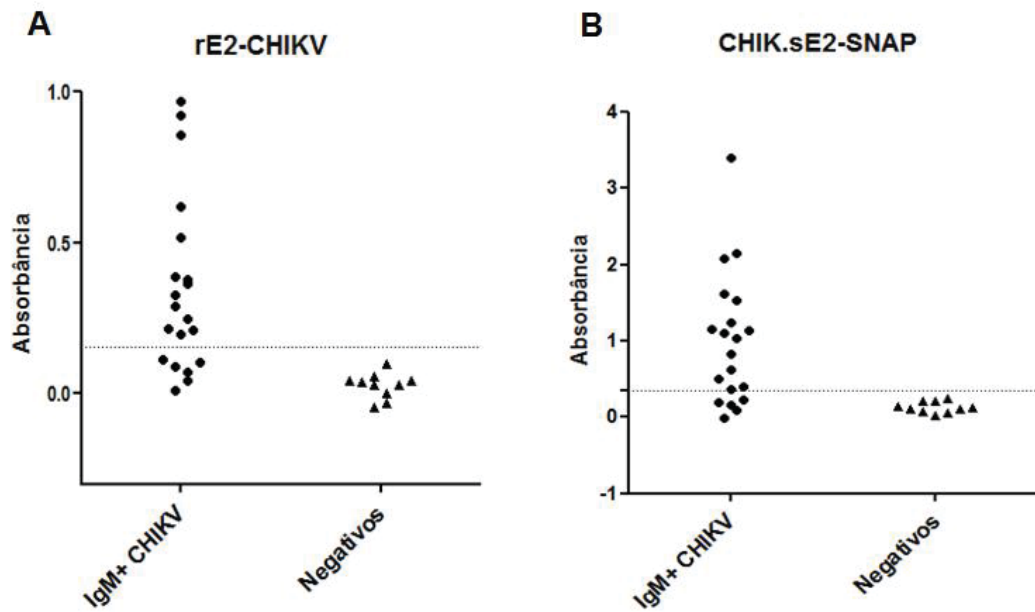


Figura 40 – Resultado do ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV (A) e a CHIK.sE2-SNAP (B) como antígeno. Foram analisados os soros do painel cedido pelo Instituto Pasteur da Guiana. As linhas pontilhadas indicam o valor de corte dos testes.

Os valores de sensibilidade e especificidade do teste com a rE2-CHIKV foram calculados utilizando-se o painel de amostras de soros humanos de indivíduos com infecção aguda por CHIKV, de soros sabidamente negativos, de soros de indivíduos saudáveis que moram em região não endêmica e de indivíduos com outras infecções agudas. Considerando-se esse painel de amostras, o teste apresentou sensibilidade de 70% e especificidade de 97%. As absorbâncias estão apresentadas nas Figuras 40 e 41. Além das seis amostras falso-negativas já descritas, foram obtidas três falso-positivas entre as 109 amostras negativas testadas, uma entre os soros de indivíduos saudáveis de região não endêmica, uma de indivíduo com toxoplasmose e uma de indivíduo com infecção por EBV.

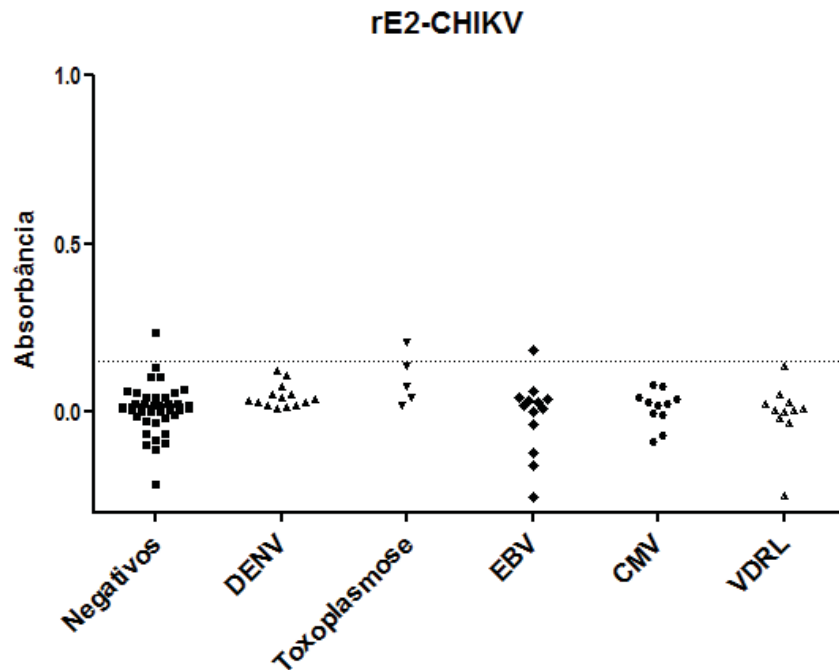


Figura 41 – Resultado do ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV como antígeno para os soros de indivíduos saudáveis que moram em regiões não endêmicas (negativos) e com infecções agudas não causadas por CHIKV. A linha pontilhada indica o valor de corte do teste (0,152). O gráfico está na mesma escala da Figura 40.

4.2 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA DENGUE

4.2.1 Produção do Antígeno Viral

Para utilização na padronização de um ensaio do tipo ELISA para detecção de anticorpos da classe IgM anti-DENV, foram gerados estoques de DENV dos quatro sorotipos (DENV-1 BR/01-MR, DENV-2 BR/01-01, DENV-3 290-02 e DENV-4 TVP 360). Com exceção do DENV-4, os outros vírus utilizados são isolados clínicos brasileiros de vírus da dengue. Um lote de cada vírus purificado, com título da ordem de 10^8 ffu/mL, foi inativado por radiação gama. A inativação foi confirmada por meio de titulação viral por imunodeteção de foco. A quantificação proteica de cada amostra foi determinada e está especificada na Tabela 5.

TABELA 5 – QUANTIDADE DE PROTEÍNA PRESENTE NAS AMOSTRAS DE VÍRUS DA DENGUE INATIVADAS POR RADIAÇÃO GAMA.

Vírus da dengue	Quantidade de proteína (µg/mL)
DENV-1 BR/01-MR	287,8
DENV-2 BR/01-01	197,6
DENV-3 290-02	678,0
DENV-4 TVP 360	121,5

4.2.2 Caracterização de Anticorpos Monoclonais Anti-DENV

Em um trabalho anterior, haviam sido gerados 147 hibridomas secretores de anticorpos anti-DENV. Estes hibridomas foram obtidos a partir de três protocolos de fusão: um utilizando esplenócitos de camundongos imunizados com DENV-1 BR/01-MR, um com DENV-2 BR/01-01 e um com DENV-3 BR 290-02 (MAZZAROTTO, 2009). Esses hibridomas foram estabilizados por dois ciclos de congelamento e descongelamento e clonados por diluição limitante, resultando em 22 hibridomas estáveis e secretores de AcM. Três dos hibridomas foram gerados a partir do protocolo de imunização com DENV-1, três do protocolo com DENV-2 e 16 do protocolo com DENV-3. A isotipagem dos AcM demonstrou que dez dos hibridomas produzem AcM do isotipo IgG2b, sete do isotipo IgG2a e cinco, IgG1, todos com cadeia leve *kappa* (Tabela 6).

TABELA 6 – DESIGNAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL (ACM) E CARACTERIZAÇÃO DE SEU ISOTIPO, REATIVIDADE CONTRA OS QUATRO SOROTIPOS DE DENV E ESPECIFICIDADE CONTRA A PROTEÍNA VIRAL

Nome do AcM	Sorotipo de DENV na imunização	Isotipo	Reatividade contra				Proteína do vírion
			DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	
D1 463/G6/H2	DENV 1	IgG1 κ	+	-	+	+	E
D1 695/12C/2H	DENV 1	IgG1 κ	+	+	+	+	E
D1 606/A12/B9	DENV 1	IgG1 κ	+	+	+	+	prM
D2 646/9G	DENV 2	IgG2 $\alpha\kappa$	-	+	-	-	N.D.
D2 658/9A	DENV 2	IgG2 $\alpha\kappa$	-	+	-	-	N.D.
D2 332/2D	DENV 2	IgG2 $\alpha\kappa$	-	+	-	-	E
D3 342/5G/G8	DENV 3	IgG2 $\alpha\kappa$	-	-	+	-	E
D3 388/4A/G6	DENV 3	IgG1 κ	-	-	+	-	E
D3 444/4G/H3	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	-	-	+	-	E
D3 389/F4/H10	DENV 3	IgG1 κ	-	-	+	-	E
D3 441/D1/H2	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	-	-	+	-	E
D3 290/4C/G9	DENV 3	IgG2 $\alpha\kappa$	-	-	+	-	E
D3 341/H9/F10	DENV 3	IgG2 $\alpha\kappa$	-	-	+	-	E
D3 344/H1	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	-	-	+	-	E*
D3 442/4E/G8	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	-	-	+	-	E
D3 242/F1/H2	DENV 3	IgG2 $\alpha\kappa$	-	+	+	-	E
D3 424/8G	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	E
D3 863/G7/H7	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	prM
D3 457/H7/H2	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	prM
D3 443/H12/H6	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	prM
D3 868/G7/H10	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	prM
D3 63/F2/G7	DENV 3	IgG2 $\beta\kappa$	+	+	+	+	E**

N.D. não determinado; - negativo; + positivo; E, proteína de envelope; prM, proteína pré-membrana;

*Não reagiu no *western blot*, mas reconheceu a proteína recombinante DENV-3 E Δ_{101} expressa por células S2 por IFI;

**Reagiu no *western blot*, mas não reconheceu a proteína DENV-3 E Δ_{101} por IFI em células S2 transfectadas.

4.2.2.1 Determinação da Especificidade dos Anticorpos Monoclonais para as Proteínas de DENV

A análise dos AcM por *western blot* contra partículas de DENV purificadas demonstrou que quatorze AcM reconhecem a proteína E e cinco reconhecem a proteína prM (Figura 42 e Tabelas 6 e 7). Os AcM D2 646/9G, D2 658/9A e D3 344/H1

não apresentaram reatividade contra as proteínas estruturais de DENV, quando analisados por *western blot* (Figura 42).

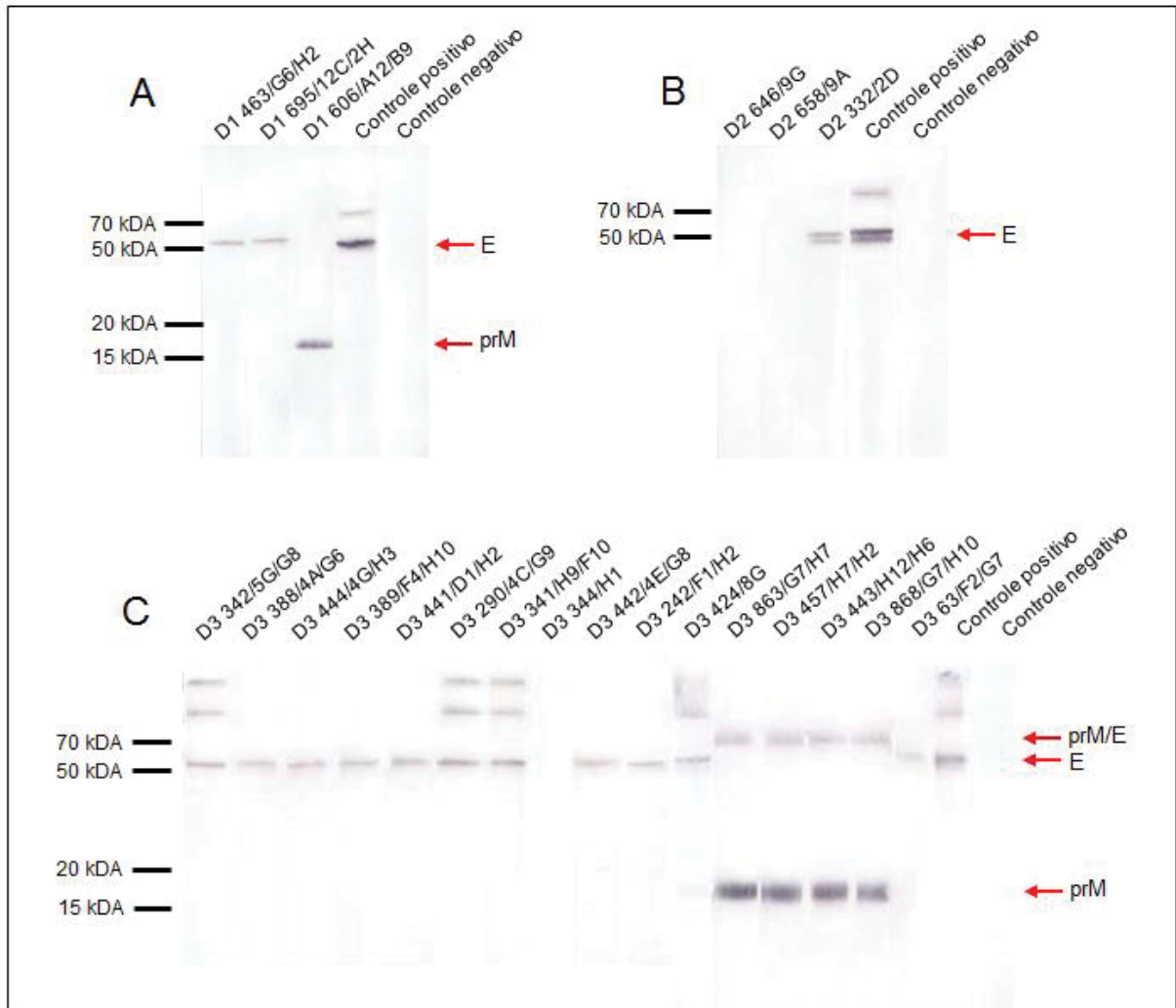


Figura 42 – *Western blot* dos AcM contra o sorotipo de DENV homólogo. DENV-1 BR/01-MR (A), DENV-2 BR/01-01 (B) e DENV-3 290-02 (C) foram submetidos a SDS-PAGE em gel de poliácridamida a 13% e transferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas foram detectadas utilizando os AcM, seguidos por anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. O AcM 4G2, específico para a proteína E de flavivírus, e um AcM não relacionado que reconhece a nucleoproteína de hantavírus (clone 572/7A) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Os AcM produzidos contra DENV-2 também foram testados por *western blot* com um peptídeo recombinante correspondente ao domínio III da proteína E de DENV-2. O AcM D2 332/2D reagiu com esta proteína, sugerindo que se trata de um AcM específico para o domínio III da proteína de E de DENV-2; os outros dois AcM não reagiram (Figura 43).

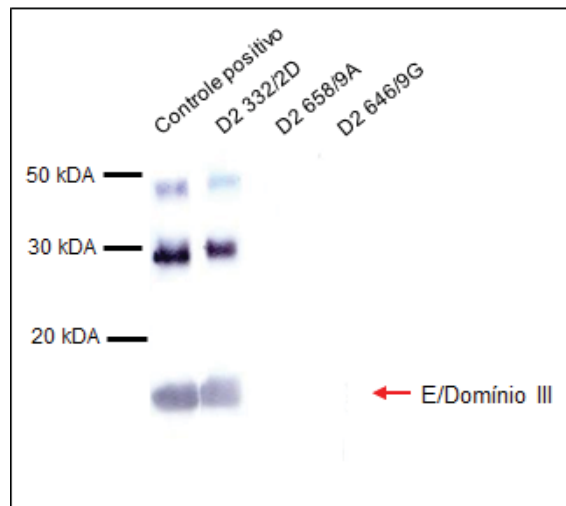


Figura 43 – *Western blot* dos AcM D2 332/2D, D2 658/9A e D2 646/9G contra o peptídeo correspondente ao domínio III da proteína E de DENV-2 produzida em *E. coli*. O peptídeo recombinante (~12 kDa) foi submetido a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 15%, transferido para membrana de nitrocelulose e detectado com os AcM, seguidos por anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. Um soro policlonal de camundongo anti-DENV-2 foi utilizado como controle positivo.

Além disso, o AcM D3 344/H1 reconheceu a proteína E Δ_{101} de DENV-3 expressa em células S2 por IFI, sugerindo que este AcM seja específico para um epítipo conformacional da proteína E (Tabela 7). Por outro lado, o AcM D3 63/F2/G7 reconheceu a proteína E por *western blot* com partículas virais purificadas, mas não por IFI com a proteína E Δ_{101} de DENV-3, sugerindo que o AcM reconheça um epítipo localizado na porção C-terminal da proteína E ou, alternativamente, alguma conformação do epítipo que esteja diferente nas distintas preparações do antígeno. Os demais AcM testados na IFI apresentaram o mesmo padrão de reatividade verificado por *western blot* (Tabela 7).

TABELA 7 – REATIVIDADE POR IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA DENV-3 COM A PROTEÍNA E Δ_{101} DE DENV-3 EXPRESSA POR CÉLULAS S2

AcM	Reatividade com a proteína E de DENV-3 recombinante
D3 342/5G/G8	+
D3 388/4A/G6	+
D3 444/4G/H3	+
D3 389/F4/H10	+
D3 441/D1/H2	+
D3 290/4C/G9	+
D3 341/H9/F10	+
D3 344/H1	+
D3 442/4E/G8	+
D3 242/F1/H2	+
D3 424/8G	+
D3 863/G7/H7	-
D3 457/H7/H2	-
D3 443/H12/H6	-
D3 868/G7/H10	-
D3 63/F2/G7	-

4.2.2.2 Determinação da Reatividade dos Anticorpos Monoclonais com os Quatro Sorotipos de DENV e Outros Flavivirus e Alphavirus

Para investigar quais os melhores AcM para uso em teste diagnóstico e em estudos epidemiológicos, os AcM foram analisados quanto a sua reatividade com os quatro sorotipos de DENV e com outros flavivirus e alphavirus. Os AcM foram testados por IFI contra isolados de DENV-1 (BR/90), -2 (ICC 266), -3 (290-02) e -4 (TVP 360). Diferentes padrões de reatividade foram identificados: grupo-específico (DENV-1, -2, -3 e -4), subcomplexo-específico (DENV-1, -3 e -4 e DENV-2 e -3) e sorotipo-específico (DENV-2 ou -3). Oito AcM reconheceram os quatro sorotipos de DENV; um AcM reconheceu os sorotipos 1, 3 e 4 e um reagiu com os sorotipos 2 e 3; três AcM foram específicos para o sorotipo 2 e nove para o sorotipo 3 (Tabela 6 e Figura 44). Todos os AcM apresentaram o mesmo padrão de fluorescência na IFI em células C6/36 infectadas com DENV, com uma forte marcação perinuclear (Figura 44).

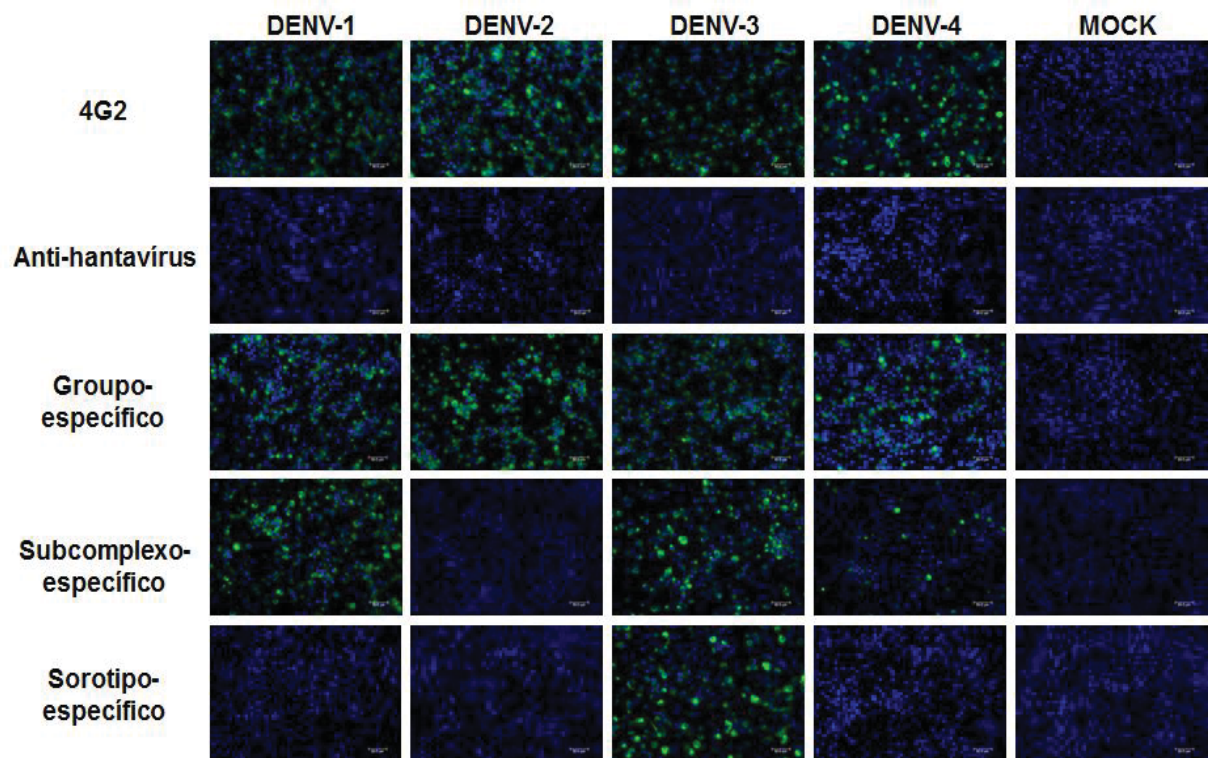


Figura 44 – Representação dos principais grupos de reatividade dos anticorpos monoclonais contra os quatro sorotipos de DENV. IFI em células C6/36 infectadas com DENV-1 (BR/90), DENV-2 (ICC 266), DENV-3 (290-02) ou DENV-4 (TVP 360) ou não infectadas (MOCK). As células foram fixadas com metanol:acetona e marcadas com os diferentes AcM, seguidos de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. O AcM 4G2 e um AcM não relacionado anti-hantavírus (clone 572/7A) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Barras de escala: 30 μ m.

Além disso, foi verificada a reatividade dos AcM contra YFV 17DD, SLEV 78V6507, WNV E/7229/06 e VEEV TC83. O AcM D3 424/8G reconheceu o YFV, SLEV e WNV e não reconheceu o alfavírus VEEV, sugerindo que é um anticorpo flavivírus-específico (Figura 45 e Tabela 8). Os AcM com reatividade contra a prM de DENV – D3 443/H12/H6, D3 457/H7/H2, D3 863/G7/H7 e D3 868/G7/H10 –, reconheceram os quatro sorotipos de DENV, o SLEV e o WNV, mas não reagiram com YFV e VEEV (Tabela 6 e 8). Os demais AcM apresentaram reatividade apenas com DENV.

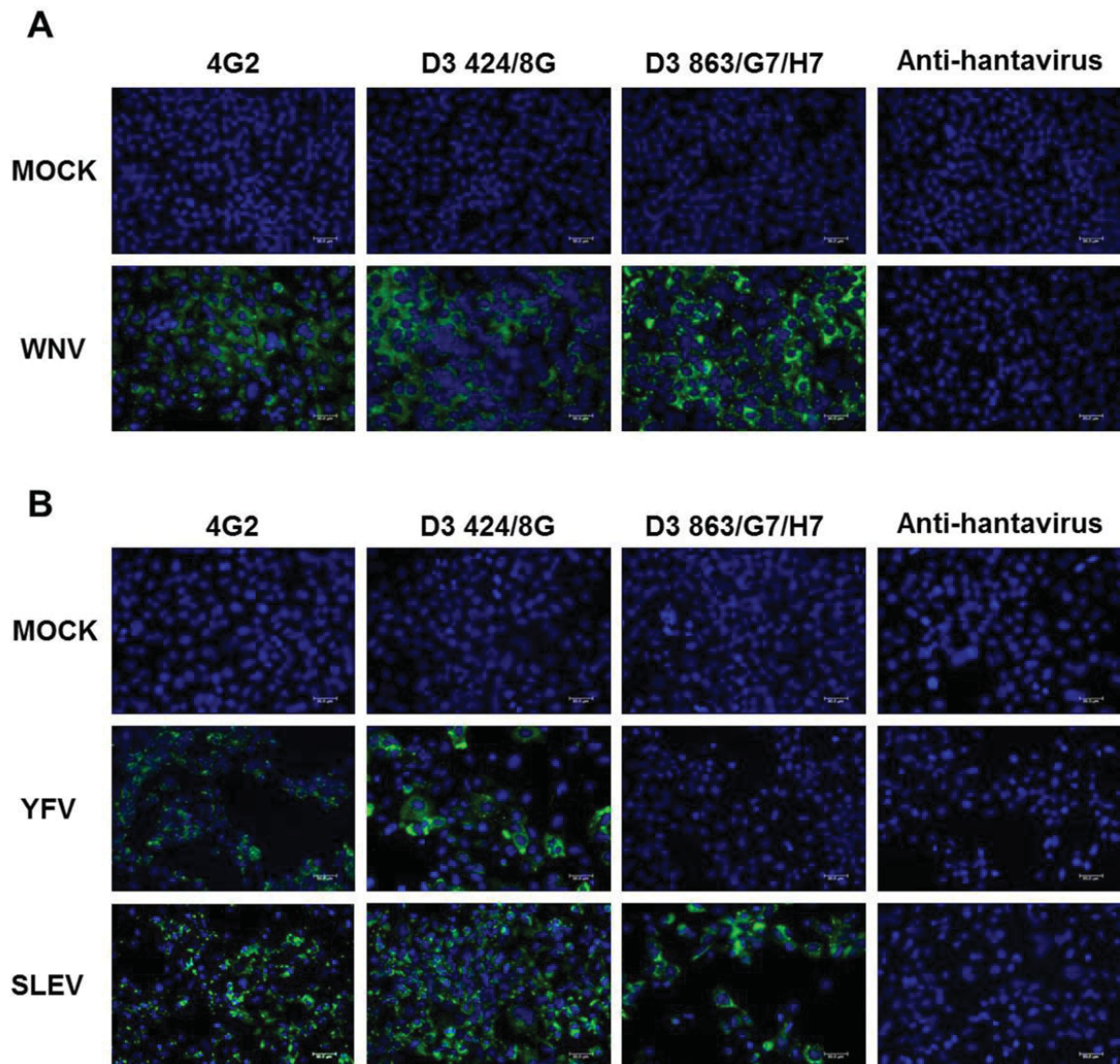


Figura 45 – Reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais D3 424/8G e D3 863/G7/H7 com WNV, YFV e SLEV. IFI em células Vero E6 (A) infectadas com WNV e HuH7.5 (B) com YFV ou SLEV ou não infectadas (MOCK). As células foram fixadas com metanol:acetona e marcadas com os diferentes AcM, seguidos de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488. O AcM 4G2 foi utilizado como controle positivo e um AcM não relacionado anti-hantavírus (572/7A), como controle negativo. Barras de escala: 30 μ m.

TABELA 8 – REATIVIDADE CRUZADA DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-DENV CONTRA YFV, SLEV, WNV E VEEV

AcM	Reatividade contra			
	YFV	SLEV	WNV	VEEV
D1 463/G6/H2	-	-	-	-
D1 695/12C/2H	-	-	-	-
D1 606/A12/B9	-	-	-	-
D2 646/9G	-	-	-	-
D2 658/9A	-	-	-	-
D2 332/2D	-	-	-	-
D3 342/5G/G8	-	-	-	-
D3 388/4A/G6	-	-	-	-
D3 444/4G/H3	-	-	-	-
D3 389/F4/H10	-	-	-	-
D3 441/D1/H2	-	-	-	-
D3 290/4C/G9	-	-	-	-
D3 341/H9/F10	-	-	-	-
D3 344/H1	-	-	-	-
D3 442/4E/G8	-	-	-	-
D3 242/F1/H2	-	-	-	-
D3 424/8G	+	+	+	-
D3 863/G7/H7	-	+	+	-
D3 457/H7/H2	-	+	+	-
D3 443/H12/H6	-	+	+	-
D3 868/G7/H10	-	+	+	-
D3 63/F2/G7	-	-	-	-

- negativo; + positivo.

4.2.3 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-DENV

Os AcM D3 424/8G (flavivírus-específico), D1 606/A12/B9 (grupo-específico, anti-prM) e D1 695/12C/2H (grupo-específico, anti-E) foram conjugados com peroxidase e utilizados em um ensaio preliminar do tipo MAC-ELISA. Neste ensaio, foram testados 22 soros positivos e 24 soros negativos, cujo diagnóstico foi determinado utilizando-se o teste comercial *PanBio IgM capture assay*. Com base nos valores de absorbância e na quantidade de falso-positivos (Figura 46), foi selecionado

o D3 424/8G-HRP para uso na padronização do ensaio para detecção de IgM anti-DENV.

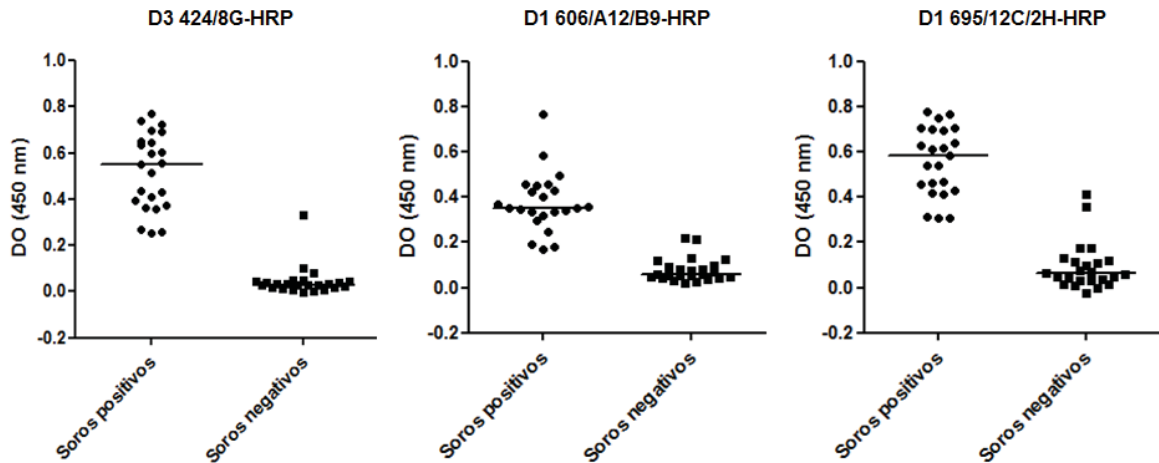


Figura 46 – Aplicação de anticorpos monoclonais no desenvolvimento de MAC-ELISA. AcM D3 424/8G, D1 606/A12/B9 e D1 695/12C/2H conjugados com peroxidase foram utilizados no MAC-ELISA para detectar IgM anti-DENV em soros de pacientes infectados ($n = 22$) e não infectados ($n = 24$). A linha horizontal corresponde à mediana.

Um ELISA de captura de IgM foi então padronizado utilizando-se uma mistura de DENV dos quatro sorotipos inativados por radiação gama e o AcM D3 424/8G-HRP. O valor de corte foi determinado utilizando-se um painel de soros de indivíduos saudáveis (grupos 2, Tabela 1). A média das absorvâncias desses soros negativos mais três vezes o desvio padrão correspondeu ao valor de 0,177 (valor de corte), sendo consideradas indeterminadas as amostras com valor de absorvância entre 0,137 e 0,217.

Por este ensaio, foram verificados sete soros falso-negativos e um indeterminado entre as 76 amostras com infecção aguda por DENV e dois indeterminados entre as 45 amostras de indivíduos saudáveis. Entre as amostras de soros de indivíduos com outras infecções agudas, foram observadas três reações indeterminadas e três falso-positivas entre os indivíduos com reação aguda causada por SLEV ($n=19$) e duas falso-positivas entre os indivíduos com infecção aguda por CMV ($n=10$) (Figura 47). Considerando-se o painel de amostras utilizado (Tabela 1), o teste apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 95%. Os soros indeterminados não foram considerados nestes cálculos.

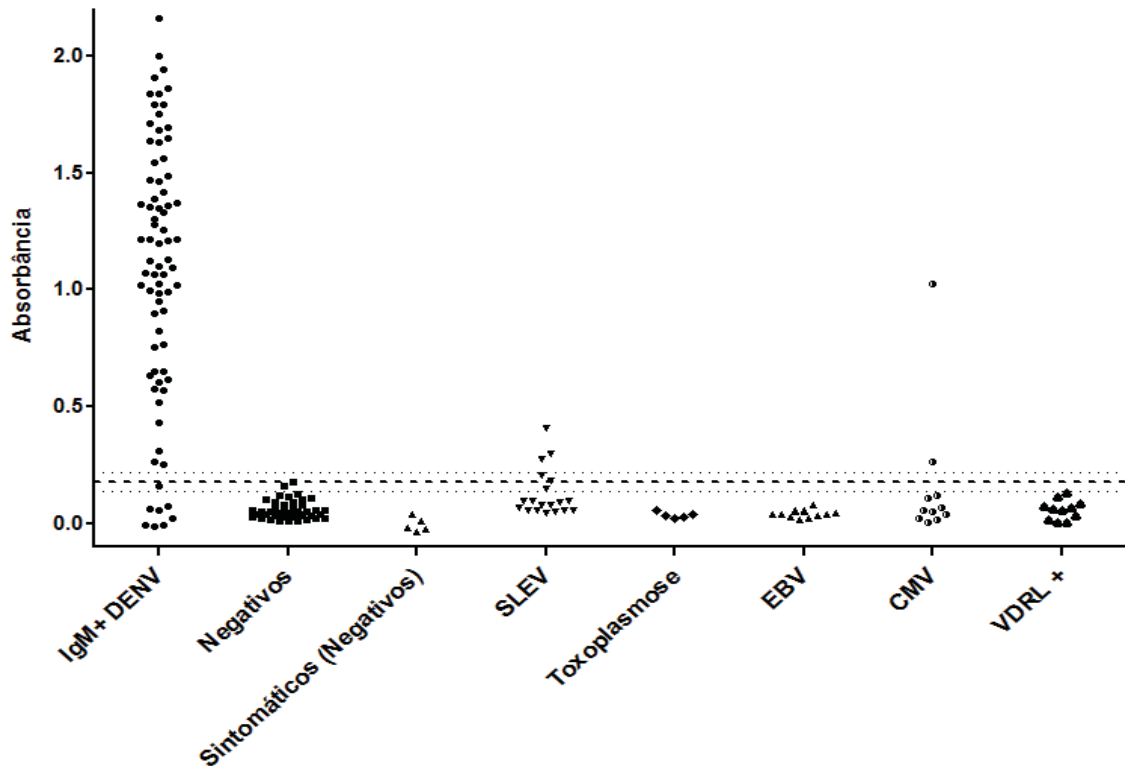


Figura 47 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-DENV. A linha tracejada indica o valor de corte do teste (0,177) e as linhas pontilhadas os limites das amostras indeterminadas (0,137-0,217).

4.3 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS

4.3.1 Produção de Partículas-Tipo-Vírus do SLEV (SLE_VLP) em Células HEK 293T

Para a obtenção de proteínas do SLEV, optou-se por uma estratégia diferente das adotadas para o CHIKV e para o DENV. Com base no trabalho descrito por Trainor *et al.* (2007), VLPs (partículas-tipo-vírus) de SLEV foram produzidas. O uso de VLPs apresenta vantagens como mimetizar a superfície viral nativa e possibilitar que sejam feitas mutações sítio dirigidas em epítomos envolvidos na reatividade cruzada entre os flavivírus, reduzindo a reatividade cruzada em testes diagnósticos (ROBERSON; CRILL; CHANG, 2007; TRAINOR *et al.*, 2007). Além disso, para o desenho do gene sintético, foram utilizadas sequências gênicas de SLEV circulante em São Paulo e na

Argentina, pois refletem o perfil antigênico do vírus que circula na região alvo desse estudo.

O gene sintético contendo as sequências codificantes para as proteínas estruturais prM e E (VLP) de SLEV clonado no plasmídeo pUC57 foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Três colônias isoladas foram selecionadas para amplificação em meio LB líquido e purificação do DNA plasmidial. O vetor pcDNATM3.1/V5-His TOPO foi amplificado e purificado da mesma forma.

Os plasmídeos pUC57 contendo o gene de SLE_VLP e pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR obtidos a partir de uma dessas colônias foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e BstBI (Figura 48), e os fragmentos de DNA correspondentes ao gene de SLE_VLP (2.115 pb) e ao vetor de expressão (5.428 pb) foram purificados (Figura 49). Na Figura 49 (coluna 1), pode-se verificar que, além do gene SLE_VLP, há uma banda contaminante correspondente ao pUC57. Apesar disso, esse material foi utilizado para a reação de ligação do gene SLE_VLP ao vetor de expressão.

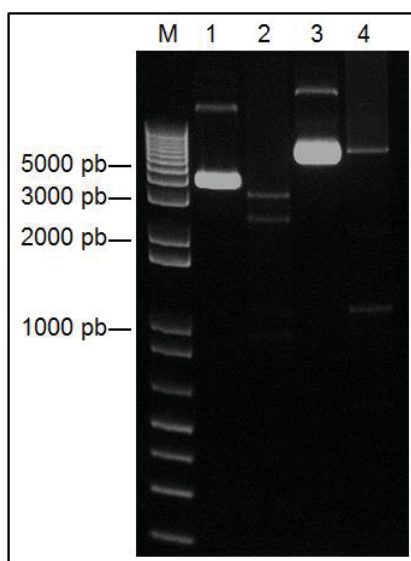


Figura 48 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed (Biotium) do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO e do fragmento de DNA codificante para VLP de SLEV em pUC57 antes e após digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstBI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen); 1: SLE_VLP em pUC57 não digerido; 2: SLE_VLP em pUC57 digerido; 3: pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR não digerido; 4: pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR digerido.

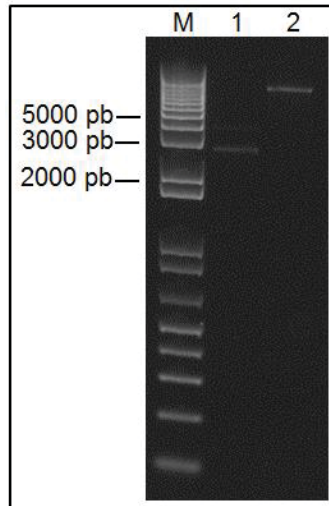


Figura 49 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed (Biotium) do fragmento de DNA codificante para VLP de SLEV (1) e do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO (2) purificados após digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstBI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

O plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes e os clones bacterianos recombinantes foram identificados por reações de PCR de colônia (Figura 50). O tamanho esperado para o fragmento amplificado é de 2.286 pb. Para comparação, juntamente com os produtos da PCR de colônia, o gene SLE_VLP também foi aplicado no gel de agarose. Os clones 5 e 8, que apresentaram resultado positivo, foram estocados em glicerol e tiveram o DNA plasmidial purificado, com subsequente digestão com as enzimas de restrição BamHI e BstBI, para confirmar a presença do inserto (Figura 51). Por esta figura, pode-se verificar que na coluna referente ao clone 5 foram liberados dois fragmentos que provavelmente correspondem ao pUC57 (~2.710 pb) e ao pcDNA3.1/V5-His TOPO (5.428 pb) e na coluna referente ao clone 8, dois fragmentos que provavelmente correspondem ao gene SLE_VLP (2.115 pb) e ao pcDNA3.1/V5-His TOPO. O plasmídeo presente no clone 8 foi então sequenciado, sendo confirmada a presença do gene SLE_VLP e a correta fase de leitura desse inserto de DNA.

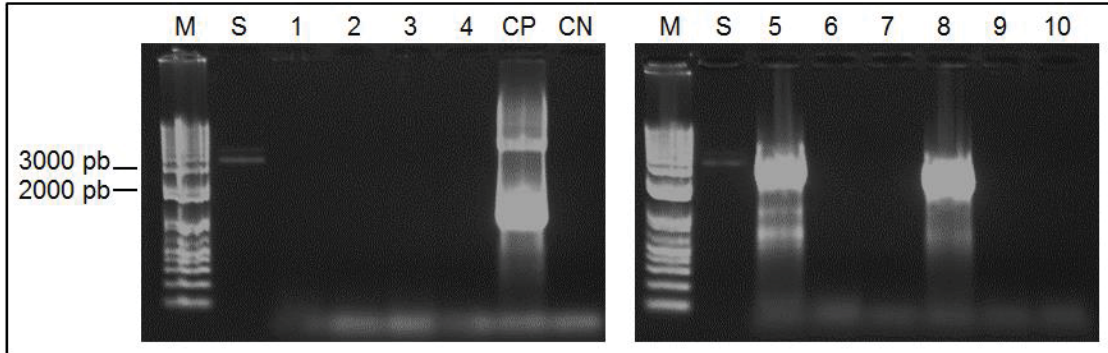


Figura 50 – Triagem dos potenciais clones contendo o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP por PCR de colônia. Análise em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed (Biotium). M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen); S: gene SLE_VLP; 1-10: colônias de bactérias transformadas com pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP; CP: controle positivo (pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR); CN: controle negativo (branco da reação).

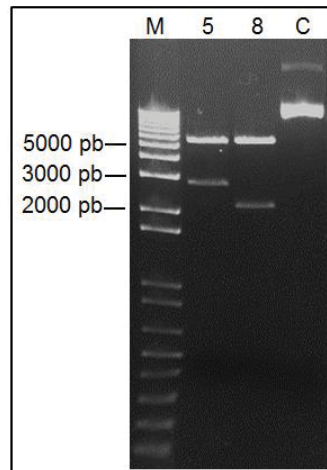


Figura 51 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio dos plasmídeos obtidos a partir dos clones 5 e 8 digeridos com as enzimas BamHI e BstBI para verificar a presença do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP. M: marcador de tamanho molecular (1 kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen); C: clone 8 não digerido, usado como controle.

Para a produção de SLE_VLP, o pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP foi utilizado para a transfecção de diferentes linhagens celulares de mamíferos (HEK 293T, BHK-21, CHO, Pro-5 e Vero). A análise por IFI utilizando o AcM 4G2, que reconhece a proteína E de flavivírus, demonstrou que as células mais estáveis após a transfecção foram as 293T (Figura 52). As demais células pararam de expressar a SLE_VLP ainda durante o período de seleção com o antibiótico G418 (dados não mostrados). Curiosamente, as células 293T não morrem ao serem cultivadas com G418, mas as células transfectadas foram selecionadas.

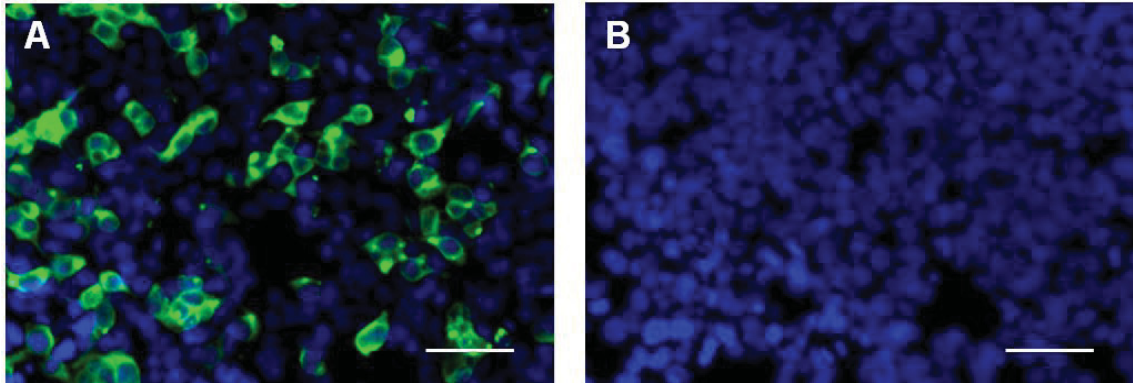


Figura 52 – Expressão de SLE_VLP por células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+SLE_VLP. Análise por imunofluorescência indireta utilizando o AcM 4G2 como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 como anticorpo secundário. A: células 293T transfectadas; B: células 293T não transfectadas (MOCK). Barras de escala: 60 μ m.

O sobrenadante de cultivo das células HEK 293T transfectadas, denominadas 293T+SLE_VLP, foi então precipitado com PEG 8000 e NaCl de forma a concentrar as SLE_VLPs. Como MOCK da reação, esta mesma precipitação foi realizada a partir do sobrenadante de células 293T não transfectadas. A análise das SLE_VLPs obtidas foi feita por *western blot* (Figura 53). A reação com o 4G2 evidenciou a presença da proteína E (Figura 53, item 3) na preparação de SLE_VLPs.

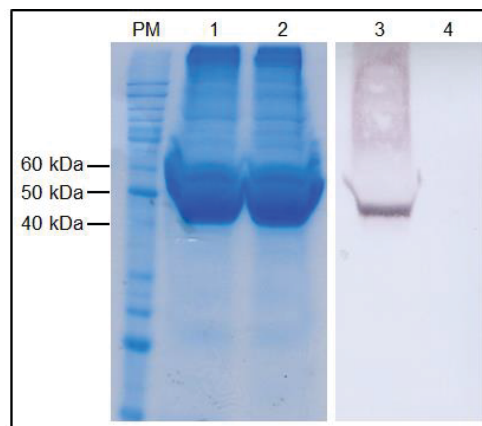


Figura 53 – Análise da obtenção de SLE_VLP após concentração por precipitação com PEG 8000 e NaCl. A análise foi feita por SDS-PAGE (1 e 2) e por *western blot* utilizando AcM 4G2 e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (3 e 4). PM: padrão de massa molecular (BenchMark™ *Protein Ladder*, Invitrogen); 1 e 3: SLE_VLP; 2 e 4: MOCK.

4.3.2 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-SLEV

Um ensaio do tipo ELISA de captura de IgM foi padronizado utilizando as SLE_VLPs e o AcM D3 424/8G-HRP. O valor de corte foi determinado utilizando-se um painel de soros de indivíduos saudáveis (grupo 2 – Tabela 2). A média das absorbâncias desses soros negativos mais três vezes o desvio padrão correspondeu ao valor de 0,218 e foi considerado o valor de corte. Foram considerados indeterminados os resultados entre o valor de corte mais ou menos um desvio padrão, o que correspondeu aos valores de absorbância entre 0,172 e 0,264.

Por este ensaio, foi verificada uma amostra falso-negativa entre as dezenove amostras de soros de indivíduos com infecção aguda por SLEV e uma amostra indeterminada entre as 43 amostras de soros de indivíduos saudáveis. Entre as amostras de soro de indivíduos com outras infecções agudas, foi verificada reatividade cruzada apenas com infecção aguda por DENV, com duas reações falso-positivas e uma indeterminada (n=14) (Figura 54). Os valores de sensibilidade e especificidade do teste, considerando-se o painel de amostras testado (Tabela 2) foram de 95% e 98%, respectivamente. Os soros indeterminados não foram considerados nestes cálculos.

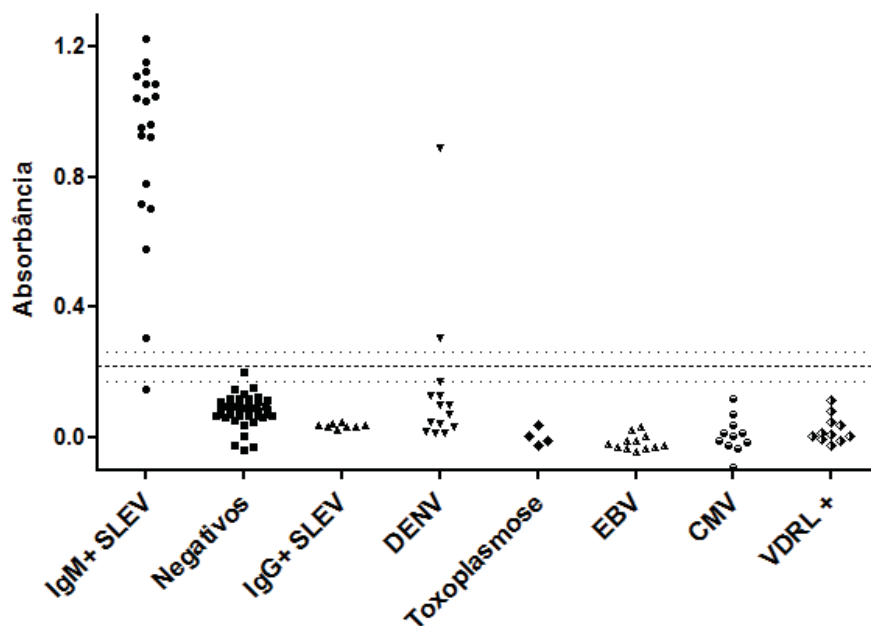


Figura 54 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-SLEV. A linha tracejada indica o valor de corte do teste (0,218) e as linhas pontilhadas os limites das amostras indeterminadas (0,172-0,264).

4.4 PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO VÍRUS DO OESTE DO NILO

4.4.1 Produção de Partículas-Tipo-Vírus do WNV (WN_VLP) em Células HEK 293T

Assim como para o SLEV, produziu-se VLP de WNV como antígeno para o desenvolvimento de um teste para diagnóstico sorológico deste vírus. O gene sintético referente as proteínas estruturais prM e E (VLP) de WNV clonado no plasmídeo pUC57 foi utilizado para a transformação de bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Três colônias isoladas foram selecionadas para amplificação em meio LB líquido e purificação do DNA plasmidial. O vetor pcDNATM3.1/V5-His TOPO foi amplificado e purificado da mesma forma.

Os plasmídeos pUC57 contendo o gene de WN_VLP e pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR obtidos a partir de uma dessas colônias foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (Figura 55). Os fragmentos correspondentes ao gene de WN_VLP (2.085 pb) e ao vetor de expressão (5.451 pb) foram purificados (Figura 56) e ligados, para a geração do plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP.

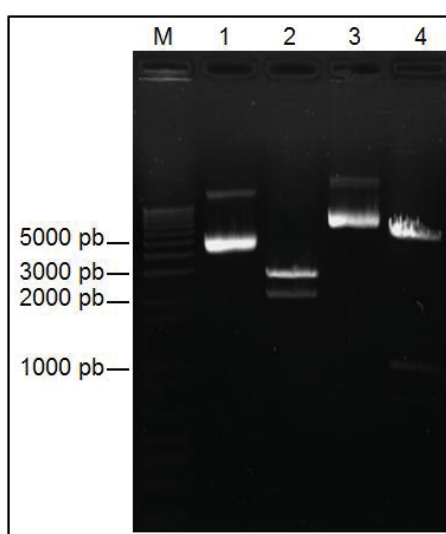


Figura 55 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO e do fragmento de DNA codificante para VLP de WNV em pUC57 antes e após digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen); 1: WN_VLP em pUC57 não digerido; 2:WN_VLP em pUC57 digerido; 3: pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR não digerido; 4: pcDNA3.1/V5-His TOPO+PCR digerido.

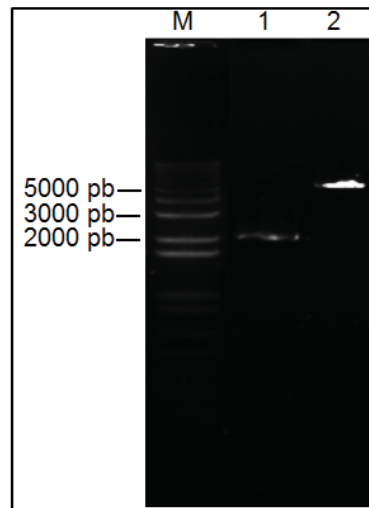


Figura 56 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio do fragmento de DNA codificante para VLP de WNV (1) e do vetor pcDNA3.1/V5-His TOPO (2) purificados após digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI. M: marcador de tamanho molecular (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen).

O plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* TOP10 quimiocompetentes e os clones bacterianos recombinantes foram identificados pela técnica de palitagem (Figura 57). Os clones 2, 3, 4 e 6, que aparentemente contêm o plasmídeo de interesse, foram estocados em glicerol e tiveram o DNA plasmidial purificado. O plasmídeo presente em um dos clones (clone 2) foi então sequenciado, sendo confirmada a presença do gene WN_VLP e a correta fase de leitura desse inserto de DNA.

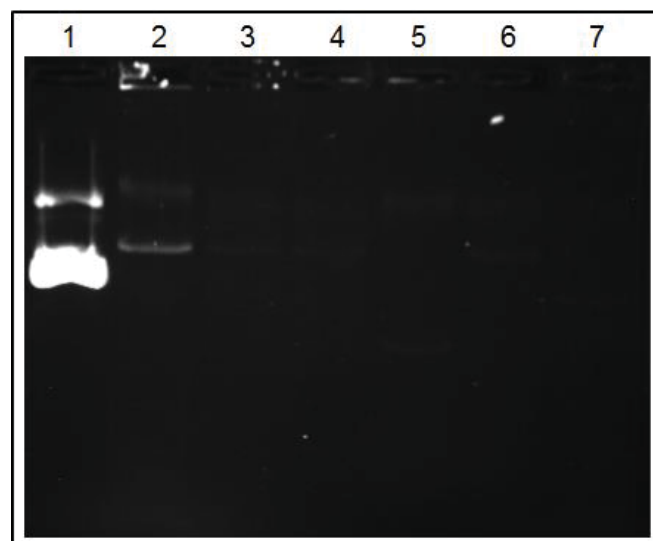


Figura 57 – Triagem dos potenciais clones contendo o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP pela técnica de palitagem. Análise em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio. 1: controle (pcDNA3.1/V5-His TOPO); 2-7: colônias de bactérias transformadas com pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP.

Para a produção de WN_VLP, o pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP foi utilizado para a transfecção de células HEK 293T. A análise por IFI utilizando o AcM D3 424/8G, que reconhece a proteína E de flavivírus, demonstrou que as células HEK 293T transfectadas foram selecionadas (Figura 58).

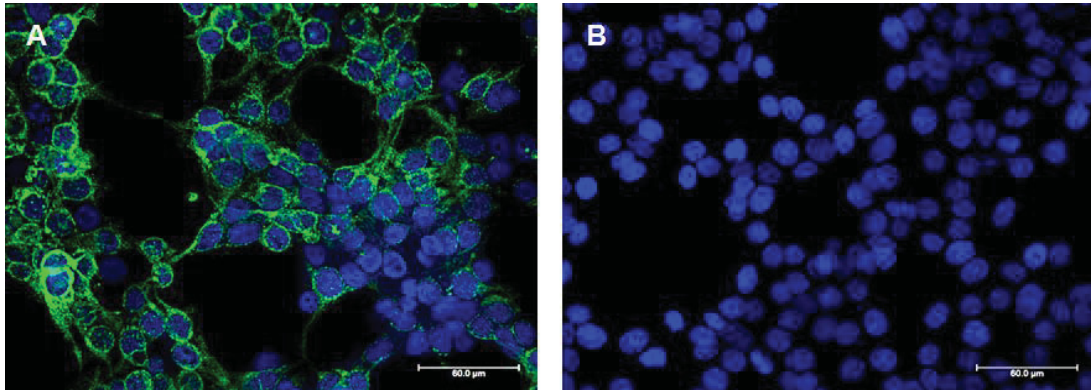


Figura 58 – Expressão de WN_VLP por células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1/V5-His TOPO+WN_VLP. Análise por imunofluorescência indireta, utilizando o AcM D3 424/8G (A) ou AcM não relacionado anti-hantavírus (B) como anticorpo primário e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 como anticorpo secundário. Barras de escala: 60 µm.

O sobrenadante de cultivo das células HEK 293T transfectadas, denominadas 293T+WN_VLP, foi então precipitado com PEG 8000 e NaCl de forma a concentrar as WN_VLPs. Como MOCK da reação, esta mesma precipitação foi realizada a partir do sobrenadante de células 293T não transfectadas. A análise foi feita por ensaios de *western blot* (Figura 59). A reação com o AcM 4G2 evidenciou a presença da proteína E (Figura 59, coluna 3) na preparação de WN_VLP.

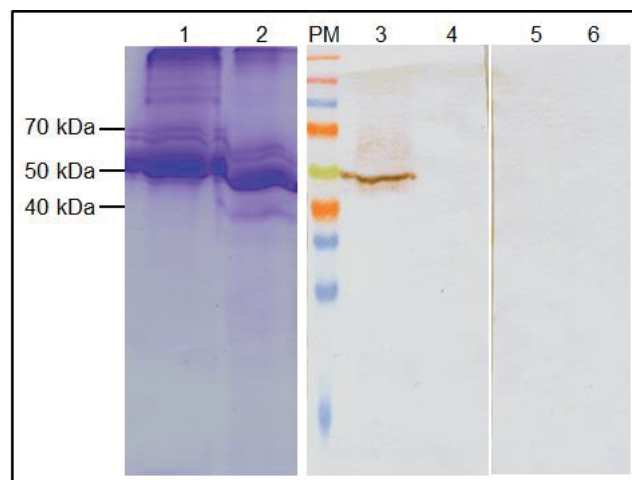


Figura 59 – Análise da obtenção de WN_VLP após concentração por precipitação com PEG 8000 e NaCl. A análise foi feita por SDS-PAGE (1 e 2) e por *western blot* utilizando AcM 4G2 (3 e 4) e um AcM não relacionado (anti-hantavírus, clone 572/7A – 5 e 6) e anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. PM: padrão de massa molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific); 1, 3 e 5: WN_VLP; 2, 4 e 6: MOCK.

4.4.2 Padronização de Ensaio Imunoenzimático para Detecção de IgM Anti-WNV

Um ensaio do tipo ELISA de captura de IgM foi padronizado utilizando-se as WN_VLPs e o AcM D3 424/8G-HRP. Uma vez que foi obtida apenas uma amostra de soro de indivíduo com infecção aguda causada por WNV, não foi possível estabelecer o valor de corte do ensaio. Inicialmente, para calcular o valor de corte, foi determinada a média das absorvâncias para os 45 soros de indivíduos saudáveis (-0,007) e o desvio padrão (0,023). A média mais três vezes o desvio padrão correspondeu ao valor de 0,061. Analisando-se os resultados obtidos para os demais soros negativos (grupos 3 e 4 da Tabela 3), no entanto, verificou-se que esse valor de corte não é suficiente para diferenciar as amostras positivas das negativas, sendo necessária a adição de um calibrador a esse ELISA. Os resultados obtidos com os soros de indivíduos com infecção aguda causada por WNV, de indivíduos saudáveis e de indivíduos com outras infecções agudas estão na Figura 60. Os valores de sensibilidade e especificidade só poderão ser calculados quando este ensaio for testado com mais amostras de soro com IgM anti-WNV e for estabelecido o valor de corte do teste.

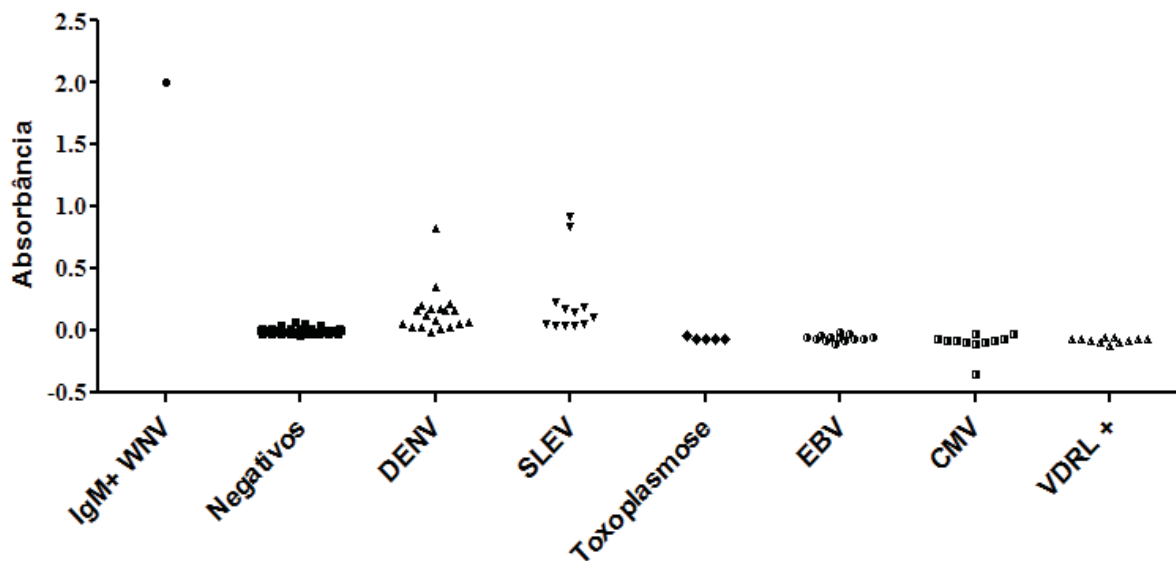


Figura 60 – Resultado do MAC-ELISA para detecção de IgM anti-WNV. Estão apresentados os resultados para os soros de indivíduos com infecção aguda por WNV, de indivíduos saudáveis de região não endêmica para WNV e de indivíduos com infecções agudas causadas por outro flavivírus (DENV e SLEV) e não causadas por flavivírus.

5 DISCUSSÃO

Os vírus Chikungunya, da dengue, da encefalite de Saint Louis e do oeste do Nilo são vírus de grande importância para a saúde pública no Brasil e no mundo. O DENV é hoje o arbovírus re-emergente mais importante no Brasil, com mais de oito milhões de casos notificados desde sua reintrodução na década de 80 (BRASIL, 2014e). O CHIKV foi introduzido no país há poucos meses e mais de cinco mil casos autóctones já foram relatados. Há grandes chances do vírus se dispersar por todo o país, devido ao alto índice de infestação dos mosquitos vetores. Na América, o CHIKV já causou mais de um milhão de infecções desde outubro de 2013 (WHO, 2015). O SLEV está amplamente distribuído pelas Américas. No Brasil, embora tenha sido isolado de casos esporádicos em humanos, estudos sorológicos têm demonstrado sua distribuição na região amazônica, sul e sudeste do país (FIGUEIREDO, 2007; IVERSSON, 1994; LOPES et al., 1979; LUBY; SULKIN; SANFORD, 1969; SVOBODA et al., 2014). No caso do WNV, apesar da primeira infecção confirmada em humanos no Brasil ter ocorrido no final de 2014, estudos sorológicos em cavalos e aves demonstraram que o vírus já circulava no país há alguns anos (MELANDRI et al., 2012; OMETTO et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2011, 2014; SILVA et al., 2013). Além disso, desde sua introdução no continente americano em 1999, o WNV passou por uma grande expansão geográfica e hoje tem causado a maior epidemia de encefalite por arbovírus já reportada nas Américas (WEAVER; REISEN, 2010). Ambos, SLEV e WNV, têm o potencial de se tornarem importantes problemas de saúde pública no Brasil e deveriam fazer parte de programas de vigilância para seres humanos e animais domésticos. Estes programas deveriam ser capazes de detectar os primeiros casos dessas arboviroses emergentes e um diagnóstico laboratorial rápido é essencial para isso. Sem um sistema de vigilância, esses patógenos podem passar despercebidos até que causem surtos (FIGUEIREDO, 2007).

Além disso, não existem agentes antivirais específicos para tratamento, nem vacinas licenciadas para uso humano. Os sintomas iniciais dessas arboviroses se confundem entre si e com várias outras doenças infecciosas que cocirculam no Brasil, dificultando o diagnóstico clínico (FIGUEIREDO, 2007; GOULD; SOLOMON, 2008). Em função disso, o diagnóstico diferencial é fundamental para que seja adotado o manejo clínico adequado, pois a rapidez e eficiência das primeiras medidas

contribuirão para um melhor prognóstico do paciente. No entanto, não existem testes diagnósticos de produção nacional validados e disponíveis comercialmente, o que ressalta a importância de se investir no desenvolvimento de ferramentas que facilitem o diagnóstico e que sejam úteis no monitoramento da circulação desses vírus. O presente trabalho visou o desenvolvimento de insumos que atendam a essa necessidade.

5.1 VÍRUS CHIKUNGUNYA

Inicialmente, foram produzidas as proteínas de envelope E1 e E2 de CHIKV em células de *D. melanogaster*. Essas proteínas foram selecionadas por serem as proteínas mais imunogênicas do vírus. Durante uma infecção por alfavírus, anticorpos neutralizantes são direcionados principalmente para a E2 e em menor extensão para a E1 (HUNT et al., 2010; STRAUSS et al., 1991; VRATI et al., 1988). Uma vez que o vírus ainda não circulava no Brasil no momento em que este trabalho foi iniciado, optou-se por desenhar os genes a partir da sequência consenso entre as sequências completas do genoma disponíveis no *GenBank*. Quanto ao sistema de expressão, como essas proteínas são glicosiladas, a expressão foi realizada em células de *D. melanogaster*, pois possibilita a obtenção de proteínas com glicosilação semelhante à produzida por células de mamíferos, importante para a obtenção das proteínas mais próximas à sua forma nativa (BROOKS, 2004).

Vários trabalhos têm descrito a expressão de proteínas de CHIKV em sistema de baculovírus (CHO et al., 2008a, 2008b; KUMAR et al., 2014; KUO et al., 2011; METZ et al., 2011). Esse sistema, no entanto, não possibilita um bioprocessamento contínuo, pois a proteína de interesse é obtida somente após a lise da célula infectada. A utilização de células S2, por outro lado, permite a obtenção de um sistema de expressão contínuo e, conseqüentemente, de níveis mais altos de expressão (DESPRES; PAULOUS; CRUBLET, 2013).

Nesse trabalho, as proteínas E1 e E2 de CHIKV foram expressas e purificadas com sucesso. A proteína rE1-CHIKV, no entanto, foi obtida em pequena quantidade, sendo detectada apenas por *western blot* utilizando anticorpo anti-V5. Já a rE2-CHIKV foi obtida de forma relativamente pura e em maior quantidade. Uma vez que a proteína

E2 é a responsável pela ligação a receptores na célula hospedeira e é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (GRIFFIN, 2013), optou-se por continuar o trabalho com esta proteína. Além disso, Cho *et al.* (2008) demonstraram que testes para diagnóstico sorológico de Chikungunya utilizando uma proteína E2 recombinante produzida em sistema de baculovírus apresenta maior sensibilidade que testes utilizando a proteína E1 produzida da mesma maneira.

Recentemente, foi verificado que a fusão da proteína de interesse à proteína SNAP, uma mutante da enzima de reparo de DNA O⁶-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (AGT), aumenta em pelo menos 50 vezes o rendimento proteico, além de aumentar a estabilidade da proteína produzida por células S2. No caso da proteína E2 de CHIKV, por exemplo, com esta estratégia, foram gerados lotes de proteína com concentração de aproximadamente 600 a 1200 µg/mL (DESPRES; PAULOUS; CRUBLET, 2013). Nesse trabalho, foram obtidos aproximadamente 12,5 µg/mL, o que indica que essa é uma ótima estratégia para trabalhos futuros.

Além das proteínas recombinantes, foram produzidos três hibridomas secretores de AcM contra a rE2-CHIKV. Esses AcM, denominados 1G1, 3A12 e 12A6, foram caracterizados por ELISA, IFI e *western blot* contra a proteína rE2-CHIKV, reconhecendo essa proteína em todos os ensaios realizados. Nenhum AcM reagiu com a proteína rE1-CHIKV, nem com o MOCK (dados não mostrados).

Os AcM produzidos podem ter outras aplicações além de serem utilizados em teste imunoenzimático para detecção de anticorpos anti-CHIKV, que é o foco deste trabalho. Podem ser utilizados em pesquisa e testes diagnósticos para a detecção do vírus, por meio de ELISA de captura de antígeno, imunofluorescência, citometria de fluxo, *immunoblot*, teste imunocromatográfico e imunohistoquímica. Kumar, Sudeep e Arankalle (2012) e Bréhin *et al.* (2008) demonstraram a aplicabilidade de AcM anti-E2 em alguns desses testes. Okabayashi *et al.* (2014) desenvolveram um teste imunocromatográfico para a detecção de CHIKV utilizando AcM anti-E1, obtendo valores de sensibilidade e especificidade próximos a 90% quando comparados com RT-PCR. Um ensaio semelhante poderia ser desenvolvido utilizando os AcM anti-rE2-CHIKV produzidos neste trabalho.

Para a utilização nesses ensaios, é importante que os AcM sejam específicos para o CHIKV. Foi demonstrado que os AcM 1G1, 3A12 e 12A6 não apresentam reatividade cruzada com o alfavírus VEEV, nem com os flavivírus DENV sorotipos 1 a 4, SLEV e WNV. Além disso, foi demonstrado por ELISA indireto que a rE2-CHIKV,

proteína contra a qual os AcM foram produzidos, é reconhecida por anticorpos anti-CHIKV presentes no soro de pacientes infectados, o que sugere que a rE2-CHIKV tem uma conformação próxima à E2 nativa. Juntos, esses resultados sugerem a especificidade dos AcM para o CHIKV, mas isso só poderá ser confirmado quando os AcM forem testados contra o vírus nativo.

Os AcM podem ser usados ainda em ensaios de imunoprecipitação de proteínas virais, de agregados proteicos ou de partículas virais. Técnicas de imunoprecipitação têm sido utilizadas na determinação de interações entre diferentes proteínas virais (ROMAN-SOSA; KIELIAN, 2011) e entre proteínas virais e do hospedeiro (WINTACHAI et al., 2012). Assim, os AcM podem ser úteis em estudos sobre o ciclo de replicação e mecanismos da patogenicidade viral (MASRINOUL et al., 2014).

AcM também têm sido utilizados para a identificação de determinantes antigênicos virais, inclusive no mapeamento de epítopos envolvidos na reatividade cruzada entre diferentes vírus da mesma família (BLACKBURN; BESSELAAR; GIBSON, 1995; CHUA; CHAN; SAM, 2014; STRAUSS et al., 1991). Nos últimos anos, com a grande expansão do CHIKV pelo mundo, também tem sido estudada a utilização de AcM anti-CHIKV neutralizantes como ferramentas terapêuticas (GOH et al., 2013; SELVARAJAH et al., 2013; WARTER et al., 2011).

Nesse trabalho, os AcM anti-rE2-CHIKV não foram utilizados no ELISA para detecção de IgM anti-CHIKV, devido ao formato do ELISA padronizado. O AcM 12A6 foi conjugado com peroxidase e utilizado em um ELISA de captura de IgM, mas apresentou extensa reatividade inespecífica (dados não mostrados). Novas conjugações deste e dos demais AcM serão realizadas, para a posterior padronização de um MAC-ELISA. Talvez a alteração do formato do ELISA melhore a sensibilidade do teste, conforme será discutido mais adiante.

Com a crescente emergência do CHIKV desde 2004, diversos sistemas de ELISA têm sido desenvolvidos. Mas muitos deles se baseiam no uso da partícula viral ou das proteínas virais nativas. O teste que hoje é utilizado pelos laboratórios de referência para diagnóstico de CHIKV no Brasil utiliza o vírus produzido em cérebro de camundongos neonatos extraído pelo método de sacarose-acetona (BRASIL, 2014f). Além de todas as impurezas inerentes desse método, essa técnica é incoerente com o preceito ético segundo o qual cada vez mais tem se reduzido o uso de animais de laboratório quando existem alternativas. Entretanto, embora o CHIKV

infecte de forma produtiva e em altos títulos diferentes linhagens celulares em cultura, há a recomendação de que estas infecções sejam realizadas em laboratórios NB3 (BRASIL, 2010). Além disso, Khan et al. (2014) demonstraram que a proteína E2 ou uma mistura de E2 e E1 recombinantes apresenta resultado comparável ao vírus nativo produzido e purificado a partir de cultivo celular quando utilizadas em testes do tipo ELISA indireto e MAC-ELISA para detecção de IgM anti-CHIKV em soros de pacientes. Valores de sensibilidade mais baixos foram obtidos utilizando-se apenas a E1 recombinante.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm descrito a produção das proteínas E1, E2 e C de CHIKV em *E. coli* e em sistemas de expressão em células de inseto e sua utilização em testes para diagnóstico de infecções por CHIKV (BHATNAGAR et al., 2014; CHO et al., 2008a, 2008b; KUMAR et al., 2014; PRIYA et al., 2014; TRIPATHI; PRIYA; SHRIVASTAVA, 2014; YATHI et al., 2011). No presente trabalho, a proteína E2 produzida em células S2 de *D. melanogaster* foi utilizada em um ELISA indireto para detecção de IgM anti-CHIKV em soro de pacientes. Os resultados com essa proteína foram comparados com a proteína CHIK.sE2-SNAP, que tem sido utilizada em ensaios do tipo MAC-ELISA no Instituto Pasteur de Paris.

No ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV foram obtidas seis amostras falso-negativas, enquanto com a CHIK.sE2-SNAP foram obtidas cinco. Essa diferença provavelmente é devido à maior absorvância obtida com a CHIK.sE2-SNAP, uma vez que entre as seis amostras falso-negativas no ensaio com a rE2-CHIKV, cinco também foram falso-negativas com a CHIK.sE2-SNAP e a amostra discordante está bem próxima ao valor de corte. Esses valores mais altos de absorvância podem ser devido à utilização de cerca de oito vezes mais proteína CHIK.sE2-SNAP no teste que rE2-CHIKV. Quando foi aumentada a concentração de rE2-CHIKV no ELISA, no entanto, foram obtidos valores mais altos de absorvância não apenas com a rE2-CHIKV, mas também com o MOCK. A CHIK.sE2-SNAP foi purificada por cromatografia de afinidade seguida por gel filtração, enquanto a rE2-CHIKV foi apenas purificada por cromatografia de afinidade. É possível que a composição do tampão da proteína também possa ter levado a essa diferença de absorvância. Está sendo testada uma segunda purificação para a rE2-CHIKV, na tentativa de melhorar esses resultados.

Foi analisada a reatividade cruzada da rE2-CHIKV com amostras de soro de pacientes com infecção aguda por DENV e com outras infecções agudas (EBV, CMV, VDRL-positivo e toxoplasmose). Não foi verificada reação cruzada com as amostras

de infecção por DENV testadas. Isso é um ótimo resultado, uma vez que o DENV e o CHIKV cocirculam no Brasil, há grande semelhança entre os sintomas causados por esses vírus, além de ambos os vírus possuírem reatividade antigênica cruzada (CAVRINI et al., 2009). Houve reação cruzada com uma amostra de toxoplasmose e uma de infecção por EBV. No teste comercial *Chikungunya IgM micro-capture ELISA* (IBL International, Hamburg, Germany) é especificado que pode haver reatividade cruzada com anticorpos contra *Toxoplasma*, *Borrelia* e CMV e que a estimulação policlonal de linfócitos B em uma infecção por EBV pode levar à detecção inespecífica de anticorpos da classe IgM. Ressalta-se que, nesta validação inicial, o valor de corte foi calculado utilizando-se apenas dez soros sabidamente negativos, para que os resultados pudessem ser comparados aos resultados utilizando a CHIK.sE2-SNAP. Em uma etapa posterior, o valor de corte deverá ser novamente calculado utilizando-se um painel com mais amostras de indivíduos saudáveis.

Os testes comerciais disponíveis para detecção de IgM anti-CHIKV apresentam variados valores de sensibilidade e especificidade. Prat et al. (2014) avaliaram quatro testes para diagnóstico sorológico de CHIKV: dois testes imunocromatográficos e dois em formato de ELISA. Nas análises feitas por esses autores, um dos testes imunocromatográficos apresentou sensibilidade de 30% e especificidade de 73%, enquanto o outro apresentou especificidade de 93%, mas sensibilidade de 20%. Já os ensaios no formato ELISA apresentaram sensibilidade de 79% e 85% e especificidade de 88% e 82%, respectivamente. Ao se acessar a bula de um dos testes imunocromatográficos e de um ELISA, os valores de sensibilidade e especificidade explicitados são >90%, o que indica que esses valores são altamente dependentes do painel de soros utilizado na validação do teste e que há uma necessidade de se desenvolver testes diagnósticos melhor validados.

O ELISA padronizado neste trabalho apresentou sensibilidade de 70% e especificidade de 97%. Em relação à especificidade, a proteína rE2-CHIKV mostrou-se uma ferramenta promissora como insumo para diagnóstico. A baixa sensibilidade, no entanto, indica que há necessidade de uma melhor padronização da técnica. É possível que a alteração do formato do ensaio para MAC-ELISA aumente essa sensibilidade. Um problema no ELISA desenvolvido é que, apesar de ter sido traçada uma linha corte com base nos resultados dos soros sabidamente negativos, a diferença entre as absorbâncias das amostras positivas e as absorbâncias das amostras negativas e falso-negativas não é muito nítida, com várias amostras

positivas próximas à linha de corte. Esse tipo de resultado, no entanto, também foi obtido por outros autores: Yathi et al. (2011), ao utilizar um fragmento de 11 kDa da E1, e CHO et al. (2008a), ao utilizar as proteínas E1 e E2 recombinantes, ambos em ELISA indireto para detecção de IgM; e Kumar et al. (2014), ao utilizar a proteína E1 recombinante em um ELISA de captura de IgG.

5.2 VÍRUS DA DENGUE

Neste trabalho, foi descrita a obtenção de 22 hibridomas secretores de AcM contra isolados brasileiros de DENV. Quando testados por imunofluorescência indireta em células C6/36 infectadas com DENV, apresentaram uma forte marcação perinuclear tendendo a se espalhar pelo citoplasma. Essa observação é consistente com a distribuição das proteínas de DENV-2 relatada por Cardiff et al. (1973), que observaram uma intensa fluorescência perinuclear irradiando para o citoplasma em um padrão granular de intensidade decrescente. Henschal et al. (1982) verificaram o mesmo padrão de fluorescência com AcM após infectar células LLC-MK2 com diferentes flavivírus. Em geral, proteínas estruturais e não estruturais podem estar localizadas na região perinuclear antes da liberação de vírions, ocasionando essa intensa marcação perinuclear, enquanto a fluorescência citoplasmática está associada às proteínas estruturais (CARDIFF et al., 1973).

As análises por IFI e *western blot* demonstraram que a maioria dos AcM produzidos nesse trabalho é específica para as proteínas E ou prM de DENV. Isso é esperado uma vez que os camundongos foram imunizados com as partículas virais e o DENV não replica bem em camundongos imunocompetentes, ou seja, não há muita geração de proteínas não estruturais (JOHNSON; ROEHRIG, 1999; SCHUL et al., 2007). Normalmente, as proteínas estruturais dos flavivírus são os principais antígenos estimuladores da resposta imune. Em humanos, as proteínas E e prM, juntamente com a proteína não estrutural 1 (NS1), são os principais alvos de anticorpos durante uma infecção por DENV, principalmente em uma infecção primária (REY et al., 1995; ROTHMAN, 2011). A proteína de envelope de DENV-2, reconhecida pelos AcM D2 332/2D e o controle positivo 4G2, apareceu como duas bandas no *western blot*. Isso provavelmente se deve a diferentes padrões de glicosilação da

proteína E (MONDOTTE et al., 2007). Os outros AcM produzidos contra DENV-2 (D2 646/9G e D2 658/9A) não reconheceram os antígenos virais por *western blot*, o que sugere que eles sejam contra um epítipo conformacional de uma proteína estrutural ou contra alguma proteína não estrutural. D3 342/5G/G8, D3 290/4C/G9, D3 341/H9/F10, D3 424/G8 e o controle positivo 4G2 reconheceram bandas que provavelmente correspondem a dímeros e trímeros da proteína E de DENV. A variabilidade na intensidade das bandas observada no *western blot* pode ser devido a diferenças na concentração dos AcM, uma vez que foram utilizados sobrenadantes de cultivo dos hibridomas.

O AcM D3 63/F2/G7 reconheceu a proteína E de DENV-3 apenas no *western blot*, não reconhecendo a E Δ_{101} de DENV-3 por IFI. Uma vez que a E Δ_{101} de DENV-3 não possui os 101 aminoácidos C-terminais, esse AcM pode ser contra um epítipo localizado nessa região. Além disso, existem trabalhos descrevendo AcM anti-flavivírus que reconhecem epítopos crípticos, que são epítopos inacessíveis à ligação de anticorpos na partícula viral nativa, mas estão expostos quando a proteína não está devidamente enovelada (AUSTIN et al., 2012; CHAN et al., 2012; STIASNY et al., 2006). A desnaturação das proteínas virais no *western blot* pode ter exposto o epítipo de ligação deste AcM. Stiasny et al. (2006) verificaram que anticorpos com reatividade cruzada podem ser direcionados para um aglomerado de epítopos parcialmente ocluídos com a montagem da proteína E na partícula viral madura do vírus da encefalite transmitida por carrapato (*tick-borne encephalitis virus* – TBEV). Austin et al. (2012) e Chan et al. (2012) descreveram, respectivamente, um AcM que se liga a epítopos crípticos localizados ao *loop* CC' do domínio III (DIII) da proteína E de dois genótipos diferentes de DENV-1 e um AcM humanizado anti-prM que também reconhece um epítipo críptico na junção dos domínios I e II (DI/DII) da proteína E de DENV.

Alguns epítopos são comuns a vários flavivírus. Foi verificado, por exemplo, que alguns AcM anti-proteína E de JEV apresentam reatividade cruzada para o vírus da encefalite de Murray Valley (MVE), WNV, SLEV, DENV-1 e DENV-2 (KIMURA-KURODA; YASUI, 1986). Além dos quatro sorotipos de DENV, o AcM D3 424/8G caracterizado neste trabalho, reconheceu WNV, SLEV e YFV, enquanto os AcM D3 863/G7/H7, D3 457/H7/H2, D3 443/H12/H6 e D3 868/G7/H10 também reconheceram estes vírus com exceção do YFV. Neste trabalho, foram caracterizados AcM com diferentes padrões de reatividade: flavivírus-específico, grupo-específico (DENV1-4),

subcomplexo-específico (DENV-1, -3 e -4 ou DENV-2 e -3) e sorotipo-específico (DENV-2 ou -3). Da mesma forma, Henchal et al. (1982) descreveram anticorpos com esses distintos padrões de reatividade do DENV.

O diagnóstico sorológico de uma infecção por flavivírus é difícil devido à extensa reatividade antigênica cruzada entre esses vírus (KIMURA-KURODA; YASUI, 1986). AcM bem caracterizados são ferramentas importantes para o desenvolvimento de testes diagnósticos. Para avaliar a aplicabilidade dos AcM no desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático para diagnóstico de dengue, os AcM D3 424/8G (flavivírus-específico), D1 606/A12/B9 (grupo-específico, anti-prM) e D1 695/12C/2H (grupo-específico, anti-E) foram conjugados com peroxidase e utilizados em ensaios do tipo MAC-ELISA. Os três anticorpos foram conjugados com sucesso e foram capazes de diferenciar amostras positivas de negativas. Com base nos valores de absorvância obtidos e na quantidade de falso-positivos, optou-se por seguir os trabalhos com o D3 424/8G. É importante ressaltar que, em um teste do tipo MAC-ELISA, o que determina a especificidade do teste é o antígeno utilizado. Por isso, não há problemas em se utilizar um AcM com reatividade cruzada para os flavivírus. Esse AcM apresenta a vantagem de ser utilizado também na padronização dos ensaios para diagnóstico de SLEV e WNV.

Os AcM grupo e sorotipo-específicos podem ser utilizados em ensaios para a detecção do vírus, inclusive possibilitando a identificação do sorotipo viral. Anticorpos têm sido utilizados em ELISA de captura de antígeno (KUNO; GUBLER; WEIL, 1985) e podem ser utilizados para a detecção de DENV por imunohistoquímica (LIMONTA et al., 2007), indicando outra possível aplicação dos AcM anti-DENV conjugados com peroxidase. Os AcM também podem ser conjugados com outras moléculas, como fluorocromos ou ouro coloidal e ser utilizados em outros formatos de teste para o diagnóstico de rotina de dengue.

Para a padronização do ensaio para detecção de IgM anti-DENV, foi utilizado o D3 424/8G conjugado com peroxidase juntamente com DENV dos quatro sorotipos (DENV-1 BR/01-MR, DENV-2 BR/01-01, DENV-3 290-02 e DENV-4 TVP 360) produzidos em cultivo celular, purificados por colchão de sacarose e inativados por radiação gama. Trata-se de isolados brasileiros de vírus da dengue, com exceção do DENV-4, que é uma cepa laboratorial. No momento da padronização desse teste, não havia um isolado de DENV-4 disponível no laboratório, por isso foi utilizada essa cepa.

O MAC-ELISA padronizado apresentou valores de sensibilidade de 91% e de especificidade de 95%. Assim como descrito anteriormente para o CHIKV, a sensibilidade e a especificidade dos ensaios para detecção de IgM anti-DENV são fortemente influenciadas pela qualidade do antígeno utilizado e pode variar bastante entre os testes comerciais disponíveis (PEELING et al., 2010). Os soros positivos foram obtidos junto ao LACEN de Curitiba, em um momento em que o sorotipo de DENV predominante no Paraná era o sorotipo 4. Talvez a substituição do DENV-4 TVP360 por um isolado de DENV brasileiro possibilite a detecção dos soros falso-negativos, aumentando a sensibilidade do teste. Colombo et al. (2013) demonstraram que há resultados falso-negativos em amostras com infecção por DENV-4 no Brasil ao se utilizar o teste comercial da PanBio® para detecção de NS1. É possível que esse resultado esteja ocorrendo também no ensaio para detecção de IgM desenvolvido durante este trabalho. Recentemente foi isolado um DENV-4 a partir do soro de um paciente do estado do Paraná no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, o qual poderá ser utilizado nesse ELISA.

As amostras de infecção por CMV com resultado falso-positivo nesse teste também apresentaram alta absorvância ao ser testada com SLE_VLP, WN_VLP e MOCK. Ao se calcular a diferença entre as absorvâncias com as VLPs e com o MOCK, no entanto, as amostras foram consideradas negativas nesses ensaios. Isso é um indicativo de que essas reações falso-positivas para DENV são devido a uma ativação policlonal de linfócitos B causada pela infecção por CMV. Talvez seja necessário um tratamento adicional dos soros para bloqueio de fator reumatoide.

Trabalhos avaliando testes comerciais do tipo ELISA para detecção de IgM anti-DENV têm obtido valores de sensibilidade entre 61,5% e 100% e de especificidade entre 79,9% e 97,8% (GROEN et al., 2000; HUNSPERGER et al., 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009b). Com base nos valores de sensibilidade e especificidade (91% e 95%, respectivamente) obtidos no presente trabalho pode-se concluir que o teste desenvolvido é bastante promissor, embora algumas alterações possam ser realizadas com o intuito de aumentar a sensibilidade.

Por fim, a intensidade da resposta imune do indivíduo varia se a infecção por DENV é primária ou secundária. Durante uma infecção primária, os títulos de IgM são mais altos e mais específicos que em uma infecção secundária. Em uma infecção secundária, os títulos de IgM podem ser bastante baixos, dificultando sua detecção. Já os títulos de IgG são maiores durante uma infecção secundária. Ensaios baseados

na detecção de IgG anti-DENV podem ser usados para identificar infecções passadas e atuais por DENV, desde que amostras pareadas sejam coletadas no intervalo de tempo correto para que possa ser verificada a variação nos títulos de anticorpos (PEELING et al., 2010). Os insumos desenvolvidos nesse trabalho podem ser utilizados para a padronização de ensaios para a detecção de IgG. A disponibilidade de ambos os testes (para detecção de IgM e IgG) amplia o poder de diagnóstico de uma infecção por DENV.

5.3 VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS E VÍRUS DO OESTE DO NILO

Para o desenvolvimento de um ensaio para diagnóstico de infecção pelo SLEV, foram produzidas partículas-tipo-vírus da encefalite de Saint Louis (SLE_VLP) em células de mamífero. O desenho do gene para expressão das SLE_VLPs foi baseado no trabalho descrito por Purdy, Noga e Chang (2004). Dessa forma, o gene desenhado continha as sequências que codificam para as proteínas prM e E (ectodomínio) do SLEV juntamente com o peptídeo sinal e o endodomínio da proteína E do vírus da encefalite japonesa. Chang et al. (2003), ao produzir VLP de DENV-2, verificaram que essas regiões do JEV favorecem uma maior secreção de VLP sem alterar a reatividade com AcM contra o vírus, indicando que são regiões antigenicamente inertes, mas que favorecem a secreção do antígeno.

No caso do WNV, também foram produzidas VLPs, mas o gene sintético foi desenhado utilizando apenas sequências deste vírus. Takahashi et al. (2009) avaliaram o efeito da alteração do número de aminoácidos do peptídeo sinal sobre a produção e secreção de VLP de WNV. Eles verificaram que uma das melhores condições realmente é a utilização da sequência sinal nativa do vírus, com o início no sítio de clivagem da NS2B/3. Assim, o gene de WN_VLP contém os nucleotídeos correspondentes à sequência sinal da proteína prM e a sequência que codifica para as proteínas prM e E de WNV, usando como referência o genoma da cepa NY99. Para o desenho desse gene, inicialmente foi feito um alinhamento de todas as sequências de prM e E disponíveis no *GenBank*, mas a sequência consenso foi muito parecida à da cepa NY99.

A utilização de VLP como antígeno deve-se, primeiramente, ao fato de que o sistema utilizado para produção das VLPs resulta na expressão das proteínas estruturais de superfície desses vírus (prM e E) em suas conformações nativas, com os mesmos tipos de glicosilação e demais modificações pós-traducionais das proteínas produzidas em mamíferos infectados por SLEV ou WNV. Assim, as VLPs mimetizam a superfície viral nativa e ainda têm a vantagem de não serem infecciosas. O sistema de expressão utilizado possibilita a obtenção contínua de VLPs, uma vez que as partículas são secretadas constitutivamente no meio de cultivo das células, o processo para concentração das VLPs é simples e fácil e elas podem ser liofilizadas para armazenamento por longos períodos de tempo (HOLMES et al., 2005). Além disso, por meio de mutações nas VLPs, pode-se reduzir a reatividade cruzada com outros flavivírus (CRILL; TRAINOR; CHANG, 2007; ROBERSON; CRILL; CHANG, 2007; TRAINOR et al., 2007).

A efetividade do uso de VLP como insumos para o diagnóstico de flavivírus já foi explorada por vários autores (DAVIS et al., 2001; HUNT; CROPP; CHANG, 2001; PURDY; NOGA; CHANG, 2004; ROBERSON; CRILL; CHANG, 2007). Inclusive foi demonstrado que o uso de VLP pode resultar em maior sensibilidade e especificidade de testes para diagnóstico de flavivírus do que o uso de antígenos produzidos em cérebro de camundongo, um dos métodos mais tradicionais de produção de antígeno (HOLMES et al., 2005; PURDY; NOGA; CHANG, 2004). Segundo os autores, a maior especificidade ao utilizar VLP pode ser devido à melhor qualidade e maior pureza das VLPs comparadas com antígenos produzidos em cérebro de camundongos. Neste último método, o vírus é inativado quimicamente e os componentes lipídicos dos cérebros de camundongos são removidos por extração com acetona. Não há nenhum outro processo adicional de purificação. Além disso, a utilização de antígenos produzidos em cultivo celular ou em cérebro de camundongos tem a dificuldade adicional de que o SLEV e o WNV devem ser cultivados em laboratórios NB3 (BRASIL, 2010).

O MAC-ELISA padronizado utilizando as SLE_VLPs apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 98%, com as amostras analisadas. Por esse ensaio, foi obtido apenas um resultado falso-negativo entre as amostras de soro com IgM anti-SLEV (1/19), um indeterminado entre as amostras de soro de indivíduos saudáveis (1/43) e um indeterminado e dois falso-positivos entre as amostras de pacientes com infecção aguda por DENV (3/14). Não houve reação cruzada com amostras de soro

de indivíduos com outras doenças agudas (EBV, CMV, VDRL-positivo e toxoplasmose).

Já está bem descrita a limitação dos testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos anti-flavivírus devido à geração de anticorpos com reatividade cruzada entre diferentes flavivírus (BECK et al., 2013; KIMURA-KURODA; YASUI, 1986; OYER; BECKHAM; TYLER, 2014; REISEN, 2003). Conforme mencionado acima, essa limitação também foi verificada nos testes descritos neste trabalho. Desconsiderando a amostra indeterminada, 14% das amostras de soro de pacientes com dengue apresentaram reação cruzada no MAC-ELISA para diagnóstico de infecção por SLEV. Purdy, Noga e Chang (2004) verificaram reação cruzada com 28% das amostras de infecção por WNV ao utilizar VLP de SLEV em um ensaio do tipo MAC-ELISA.

Devido às frequentes reações cruzadas entre flavivírus, os resultados positivos em testes sorológicos devem ser interpretados com cuidado. O ideal é que os resultados sejam confirmados por testes de neutralização, utilizando um painel dos flavivírus sabidamente circulantes na região de estudo. Nesse sentido, os ensaios do tipo ELISA são ótimos como testes de triagem, uma vez que são relativamente rápidos e baratos. Além disso, anticorpos do tipo IgM são difíceis de se detectar por testes de neutralização ou de inibição de hemaglutinação. Mas o padrão-ouro para um diagnóstico sorológico ainda é a PRNT e é importante a sua utilização como teste confirmatório. A interpretação de resultados de testes sorológicos pode ser ainda mais complicada quando envolve flavivírus do mesmo sorocomplexo, como SLEV e WNV, na América, pois também existe neutralização cruzada entre eles. Nesses casos, o resultado deve ser dado com base na comparação dos títulos de anticorpos neutralizantes com os flavivírus sabidamente circulantes na região. A identificação da infecção recente consiste em encontrar o vírus associado com os títulos mais elevados de anticorpos neutralizantes, os quais devem ser pelo menos quatro vezes maiores que para os demais vírus. Ainda assim, existe dificuldade de se interpretar os resultados quando houver infecção simultânea por mais de um flavivírus. No Brasil, tem-se ainda o problema de a dengue ser endêmica e de grande parte da população ter sido vacinada contra a febre amarela. Além disso, a exposição a vários flavivírus (seja por infecção ou por vacinação) pode gerar proteção cruzada total ou parcial a outros flavivírus, levando a uma subestimação da incidência de infecções agudas pelos flavivírus por todo o mundo (BECK et al., 2013).

Para reduzir o problema de reatividade cruzada, antígenos de SLEV e WNV contendo mutações na proteína de envelope têm sido produzidos e utilizados em testes de diagnóstico. Essas mutações foram realizadas em epítomos envolvidos na reatividade cruzada entre os flavivírus (CHABIERSKI et al., 2014; CRILL; TRAINOR; CHANG, 2007; ROBERSON; CRILL; CHANG, 2007; TRAINOR et al., 2007). Roberson, Crill e Chang (2007) compararam o uso de VLP de SLEV e de WNV nativas e mutadas em MAC-ELISA para diagnóstico dessas viroses. Eles verificaram que o uso de VLP de SLEV mutada (mutações G106D-L107R-H246R) reduziu a reatividade cruzada com soros de indivíduos com infecção aguda por WNV de 51% ao utilizar VLP de SLEV nativa para 20%. Da mesma forma, houve uma redução de 46% para 24% da reatividade cruzada de soros de indivíduos com infecção por SLEV em um MAC-ELISA para detecção de IgM anti-WNV ao se utilizar VLP de WNV nativa e mutada (mutações G106R/L107H), respectivamente.

Com base nos resultados obtidos por Trainor et al. (2007) e Roberson, Crill e Chang (2007), foram feitas mutações sítio dirigidas na SLE_VLP (G106D-L107R-H246R). Ensaios preliminares com a VLP mutada demonstraram que essas partículas não são reconhecidas pelos AcM 4G2 e D3 424/8G, específicos para a proteína E de flavivírus, por *western blot* (dados não mostrados). Novos ensaios serão realizados para utilização dessas VLPs no MAC-ELISA.

Por fim, foi padronizado um ensaio do tipo MAC-ELISA utilizando as WN_VLPs como antígeno e o AcM D3 424/8G-HRP. Porém, não foi possível estabelecer o valor de corte, nem os valores de sensibilidade e especificidade do ensaio devido à dificuldade em se conseguir amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por WNV. Foi obtida uma única amostra contendo IgM anti-WNV, que apresentou um valor de absorvância pelo menos duas vezes maior que qualquer outra amostra testada. As amostras de soro de indivíduos saudáveis e com doenças agudas não causadas por flavivírus ficaram todas com valores de absorvância próximos a zero. Entre as amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por SLEV (n=12) e por DENV (n=19), três amostras apresentaram valores de absorvância mais altos, um pouco abaixo de 1,0. Para saber se essas amostras são falso-positivas ou não, no entanto, é necessário que o ensaio seja testado com mais amostras de soro com IgM anti-WNV e que seja estabelecido o valor de corte do teste. Apesar da falta de soros para a validação do teste, os resultados obtidos nesse ensaio foram promissores. Além disso, caso seja verificada reatividade cruzada com outros flavivírus, também

podem ser feitas mutações sítio dirigidas na WN_VLP (CRILL; TRAINOR; CHANG, 2007).

Em resumo, os ensaios do tipo MAC-ELISA padronizados neste trabalho para diagnóstico de infecção aguda por SLEV e por WNV foram considerados bastante satisfatórios, embora haja a necessidade de se obter painéis de amostras de soro caracterizados para o processo de validação dos insumos. A expressão constitutiva das VLPs no sobrenadante de cultura das células HEK-293T, assim como a facilidade para sua concentração, são fatores importantes a serem considerados e que deverão impactar no menor custo dos kits. Além de suas aplicabilidades como antígenos para ensaios de diagnóstico sorológico de infecções por SLEV e WNV, as VLPs produzidas durante este trabalho poderão também ser utilizadas em pesquisas envolvendo a identificação de substâncias e compostos antivirais e em estudos sobre a morfogênese viral. É importante salientar que a produção de testes destinados ao diagnóstico de viroses emergentes e re-emergentes que circulam nas Américas a um preço exequível, permitirá diminuir a morbidade e mortalidade relacionada a estas doenças, assim como conferir maior independência tecnológica ao país.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Proteínas E1 e E2 de CHIKV, denominadas rE1-CHIKV e rE2-CHIKV, respectivamente, foram produzidas em células S2 de *D. melanogaster* e purificadas por cromatografia de afinidade;
- Vírus da dengue dos sorotipos 1 a 4 (DENV-1 BR/01-MR, DENV-2 BR/01-01, DENV-3 290-02 e DENV-4 TVP 360) foram produzidos em cultivo celular, purificados por colchão de sacarose e inativados por radiação gama;
- Partículas-tipo-vírus (VLP) do SLEV e do WNV foram produzidas em células 293T transfectadas;
- Foram gerados três hibridomas produtores de anticorpos anti-rE2-CHIKV, denominados 1G1, 3A12 e 12A6, os quais foram caracterizados como sendo do isotipo IgG1, com cadeia leve *kappa*;
- Os AcM 1G1, 3A12 e 12A6 não reconheceram o alfavírus VEEV, nem os flavivírus DENV sorotipos 1 a 4, SLEV e WNV;
- Foram obtidos 22 hibridomas secretores de AcM anti-DENV, os quais foram caracterizados como sendo dos isotipos IgG2b (dez AcM), IgG2a (sete AcM) ou IgG1 (cinco AcM), todos com cadeia leve *kappa*;
- A maioria dos AcM produzidos contra o DENV é específico para a proteína E ou para a prM;
- Oito AcM reconheceram os quatro sorotipos de DENV; um AcM reconheceu os sorotipos 1, 3 e 4 e um reagiu com os sorotipos 2 e 3; três AcM foram específicos para o sorotipo 2 e nove para o sorotipo 3;
- Dos AcM que reconheceram os quatro sorotipos de DENV, o AcM D3 424/8G também reconheceu SLEV, WNV e YFV, enquanto os AcM D3 443/H12/H6, D3 457/H7/H2, D3 863/G7/H7 e D3 868/G7/H10 reconheceram o SLEV e o WNV, mas não reagiram com YFV;
- Nenhum AcM produzido contra DENV reconheceu o alfavírus VEEV;
- Os AcM D3 424/8G (flavivírus-específico), D1 606/A12/B9 (grupo-específico, anti-prM) e D1 695/12C/2H (grupo-específico, anti-E) foram conjugados com peroxidase e utilizados em um ensaio preliminar do tipo MAC-ELISA, sendo que o D3 424/8G-HRP apresentou melhores resultados e foi utilizado na padronização de ensaios para diagnóstico sorológico de infecção aguda por DENV, SLEV e WNV;

- Está em processo de validação um ensaio do tipo ELISA indireto utilizando a rE2-CHIKV como antígeno para a detecção de IgM anti-CHIKV, o qual apresentou sensibilidade de 70% e especificidade de 97%;
- Está em processo de validação um ensaio do tipo ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) para a detecção de IgM anti-DENV, no qual foi utilizada uma mistura de DENV dos quatro sorotipos produzidos em cultivo celular e o AcM D3 424/8G-HRP. O ensaio apresentou sensibilidade de 91% e especificidade de 95%;
- Está em processo de validação um ensaio do tipo MAC-ELISA para a detecção de IgM anti-SLEV, utilizando as SLE_VLPs produzidas neste trabalho e o AcM D3 424/8G-HRP. O ensaio apresentou sensibilidade de 95% e especificidade de 98%;
- Está sendo padronizado um ensaio do tipo MAC-ELISA para a detecção de IgM anti-WNV, no qual foram utilizados as WN_VLPs produzidas neste trabalho e o AcM D3 424/8G-HRP. Não foi possível calcular os valores de sensibilidade e especificidade devido à dificuldade em se obter amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por WNV.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho resultou na produção das proteínas E1 e E2 do vírus Chikungunya e de VLPs do vírus da encefalite de Saint Louis e do vírus do oeste do Nilo em sistema eucariótico, além de vírus da dengue dos quatro sorotipos inativados por radiação gama. Além disso, foram obtidos três anticorpos monoclonais contra a proteína E2 recombinante de CHIKV e foram caracterizados 22 anticorpos monoclonais contra o DENV, alguns deles reconhecendo também o SLEV e o WNV. Os resultados obtidos até o momento mostraram grande aplicabilidade desses insumos em testes diagnósticos. Os testes diagnósticos desenvolvidos apresentaram resultados satisfatórios com o painel de amostras testado. Como parte do processo de validação, um painel bem caracterizado com maior número de amostras deve ser utilizado.

8 PERSPECTIVAS

- Purificar a proteína rE2-CHIKV por cromatografia de troca iônica ou por gel filtração e verificar se os resultados relacionados a especificidade do ensaio imunoenzimático podem ser melhorados;
- Testar os AcM anti-rE2-CHIKV com o CHIKV nativo. Caso o resultado seja positivo, esses AcM poderão ser utilizados no desenvolvimento de testes diagnósticos baseados na detecção de antígenos virais em diferentes formatos de ensaios;
- Conjugar os AcM anti-rE2-CHIKV com peroxidase e utilizá-los na padronização de um ensaio do tipo MAC-ELISA para diagnóstico de CHIKV visando aumentar a especificidade das reações;
- Substituir o DENV-4 TVP 360 por um isolado brasileiro de DENV-4 no MAC-ELISA para diagnóstico de dengue;
- Testar um painel de amostras de soro de indivíduos com infecção aguda por WNV no MAC-ELISA como parte do processo de validação dos insumos produzidos e para estabelecer o valor de corte do ensaio e então calcular a sensibilidade e especificidade do teste;
- Produzir VLPs de SLEV e de WNV com mutações em epítomos envolvidos na reatividade cruzada entre flavivírus e utilizá-las em ensaios para diagnóstico sorológicos dos respectivos vírus;
- Utilizar os insumos desenvolvidos neste trabalho para a padronização de ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG contra os respectivos vírus. A disponibilidade de testes para detecção de IgM e de IgG pode melhorar o diagnóstico dessas viroses e ainda possibilita a realização de estudos epidemiológicos.

REFERÊNCIAS

ALLISON, S. L. et al. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. **Journal of virology**, v. 77, n. 21, p. 11357–11366, 2003.

ANGELINI, R. et al. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. **Euro surveillance**, v. 36, n. 12, p. E070906.1, 2007.

ASHBURN, P.; CRAIG, C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. **Journal of infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 440–475, 1907.

AUSTIN, S. K. et al. Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 10, p. e1002930, 2012.

AUTORINO, G. L. et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 12, p. 1372–1378, 2002.

BARNES, W. M. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. **Science**, v. 195, n. 4276, p. 393–394, 1977.

BEASLEY, D.; SUDERMAN, M.; BARRET, A. Mouse neuroinvasive phenotype of West Nile virus strains varies depending upon virus genotype. **Virology**, v. 296, n. 1, p. 17–23, 2002.

BEATTY, M. et al. Mosquitoborne infections after Hurricane Jeanne, Haiti, 2004. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 2, p. 308–310, 2007.

BECK, C. et al. Flaviviruses in Europe: complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of west nile disease. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, p. 6049–6083, 2013.

BERGE, T.; BANKS, I.; TIGERTT, W. Attenuation of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig heart cells. **American journal of hygiene**, v. 73, p. 209–218, 1961.

BHATNAGAR, S. et al. Evaluation of multiple antigenic peptides based on the chikungunya E2 protein for improved serological diagnosis of infection. **Viral immunology**, p. 1–6, 2014.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BLACKBURN, N. K.; BESSELAAR, T. G.; GIBSON, G. Antigenic relationship between chikungunya virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. **Research in virology**, v. 146, n. 1, p. 69–73, 1995.

BLIGHT, K.; MCKEATING, J.; RICE, C. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 13001–13014, 2002.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. **Animal health research reviews**, v. 9, n. 1, p. 71–86, 2008.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical infectious diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 2007.

BOSCH, I. et al. West Nile virus, Venezuela. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 651–653, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. p. 253

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. p. 44

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde confirma primeiro caso de Febre do Nilo**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/15962-saude-confirma-primeiro-caso-de-febre-do-nilo>>. Acesso em: 29 dez. 2014a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya: situação atualizada**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15897-ministerio-atualiza-situacao-do-virus-chikungunya>>. Acesso em: 25 abr. 2015b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do Chikungunya no Brasil**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/junho/11/Nota-Informativa-Chikungunya-.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2015c.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Chikungunya serão confirmados por critério clínico**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15010-casos-serao-confirmados-por-criterio-clinico>>. Acesso em: 20 jan. 2015d.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/dengue>>. Acesso em: 15 dez. 2014e.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014f. p. 100

BRÉHIN, A.-C. et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 185–195, 2008.

BROOKS, S. A. Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use. **Molecular biotechnology**, v. 28, p. 241–255, 2004.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection : an overview. **New microbiologica**, v. 36, p. 211–227, 2013.

CALISHER, C. H. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. **Acta virologica**, v. 32, n. 5, p. 469–478, 1988.

CARDIFF, R. D. et al. Cytological localization of dengue-2 antigens: an immunological study with ultrastructural correlation. **Infection and immunity**, v. 7, n. 5, p. 809–816, 1973.

CASSADOU, S. et al. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro surveillance**, v. 19, n. 13, p. 20752, 2014.

CAUSEY, O. R.; SHOPE, R. E.; THEILER, M. Isolation of St. Louis encephalitis virus from arthropods in Pará, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 13, n. 3, p. 449, 1964.

CAVRINI, F. et al. Chikungunya: an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. **Journal of infection in developing countries**, v. 3, n. 10, p. 744–752, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Intrauterine West Nile virus infection - New York, 2002. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 51, n. 50, p. 1135–1136, 2002.

CHABIERSKI, S. et al. Distinguishing West Nile virus infection using a recombinant envelope protein with mutations in the conserved fusion-loop. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 246, 2014.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual review of microbiology**, v. 44, p. 649–688, 1990.

CHAN, A. H. Y. et al. A human prM antibody that recognizes a novel cryptic epitope on dengue E glycoprotein. **PLoS one**, v. 7, n. 4, p. e33451, 2012.

CHANG, G. J. J. et al. Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. **Virology**, v. 306, p. 170–180, 2003.

CHO, B. et al. Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya virus infection. **Yonsei medical journal**, v. 49, n. 5, p. 828–835, 2008a.

CHO, B. et al. Expression of the capsid protein of Chikungunya virus in a baculovirus for serodiagnosis of Chikungunya disease. **Journal of virological methods**, v. 154, p. 154–159, 2008b.

CHUA, C. L.; CHAN, Y. F.; SAM, I.-C. Characterisation of mouse monoclonal antibodies targeting linear epitopes on Chikungunya virus E2 glycoprotein. **Journal of virological methods**, v. 195, p. 126–133, 2014.

COLOMBO, T. E. et al. Dengue-4 false negative results by Panbio® Dengue Early ELISA assay in Brazil. **Journal of clinical virology**, v. 58, n. 4, p. 710–712, 2013.

COUDERC, T. et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.

CRILL, W. D.; TRAINOR, N. B.; CHANG, G.-J. J. A detailed mutagenesis study of flavivirus cross-reactive epitopes using West Nile virus-like particles. **Journal of general virology**, v. 88, p. 1169–1174, 2007.

DAVIS, B. S. et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of virology**, v. 75, n. 9, p. 4040–4047, 2001.

DAY, J. F. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: lessons from recent, and not so recent, outbreaks. **Annual review of entomology**, v. 46, p. 111–138, 2001.

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M.-P.; DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 209–219, 1993.

DESPRES, P.; PAULOUS, S.; CRUBLET, E. **Mgmt-based method for obtaining high yeilds of recombinant protein expressionUS Patent App. 13/824,476**, 2013. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US20130309747>>. Acesso em: 10 jan. 2015

DIALLO, M. et al. Amplification of the sylvatic cycle of dengue virus type 2 , Senegal , 1999 – 2000: Entomologic findings and epidemiologic considerations. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 3, p. 362–367, 2003.

DIAMOND, M. et al. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. **Viral immunology**, v. 16, n. 3, p. 259–278, 2003.

DIAZ, L. A. et al. Genotype III Saint Louis encephalitis virus outbreak, Argentina, 2005. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 11, p. 1752–1754, 2006.

DIAZ, L. A. et al. West Nile virus in birds, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 689–691, 2008.

DÍAZ, L. A. et al. Virus West Nile en Argentina: un agente infeccioso emergente que plantea nuevos desafíos. **Hornero**, v. 26, n. 1, p. 5–28, 2011.

DICK, O. B. et al. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.

DONADIEU, E. et al. Differential virulence and pathogenesis of West Nile viruses. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2856–2880, 2013.

DREBOT, M. A. et al. West Nile virus surveillance and diagnostics: a Canadian perspective. **The Canadian journal of infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 105–114, 2003.

DROSTEN, C. et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses , Lassa virus , Crimean-Congo hemorrhagic fever virus , Rift Valley fever virus , Dengue virus , and Yellow Fever virus by real-time reverse transcription-PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2323–2330, 2002.

DUSSART, P. et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 11, p. 1185–1189, 2006.

ERTILAV, M. et al. Meningoencephalitis Caused by West Nile virus in a renal transplant recipient. **Microbiyoloji bülteni**, v. 48, n. 4, p. 674–682, 2014.

FANG, Y.; REISEN, W. Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, p. 480–485, 2006.

FEKI, I. et al. Epidemic West Nile virus encephalitis in Tunisia. **Neuroepidemiology**, v. 24, p. 1–7, 2005.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1643–1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 2008.

GOH, L. Y. H. et al. Neutralizing monoclonal antibodies to the E2 protein of chikungunya virus protects against disease in a mouse model. **Clinical immunology**, v. 149, n. 3, p. 487–497, 2013.

GOULD, E. A et al. Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, 2010.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500–509, 2008.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 651–686.

GROEN, J. et al. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. **Clinical and vaccine immunology**, v. 7, n. 6, p. 867–871, 2000.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21(st) Century. **Tropical medicine and health**, v. 39, n. 4 Suppl, p. 3–11, 2011.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36S, p. S40–S42, 2010.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 102, p. 522–523, 2008.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International journal of infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 69–80, 2004.

HALSTEAD, S.; O'ROURKE, E. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of experimental medicine**, v. 146, p. 201–217, 1977.

HAMMON, W. M.; REEVES, W. C.; GRAY, M. Mosquito vectors and inapparent animal reservoirs of St. Louis and western equine encephalitis viruses. **American journal of public health**, v. 33, n. 3, p. 201–207, 1943.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102–1103, 1960.

HANG, V. T. et al. Diagnostic accuracy of NS1 ELISA and lateral flow rapid tests for dengue sensitivity, specificity and relationship to viraemia and antibody responses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 1, p. e360, 2009.

HARRINGTON, T. et al. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. **Transfusion**, v. 43, n. 8, p. 1018–1022, 2003.

HAWMAN, D. W. et al. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. **Journal of virology**, v. 87, n. 24, p. 13878–13888, 2013.

HAYES, E. B. et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 1174–1179, 2005.

HENCHAL, E. A. et al. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 31, n. 4, p. 830–836, 1982.

HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T.; PAREDES, A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. **Advances in virology**, 2014.

HOLLIDGE, B. S.; GONZALEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. **Journal of neuroimmune pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 428–442, 2010.

HOLMES, D. A. et al. Comparative Analysis of Immunoglobulin M (IgM) Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Virus-Like Particles or Virus-Infected Mouse Brain Antigens To Detect IgM Antibody in Sera from Patients with Evident Flaviviral Infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3227–3236, 2005.

HOTTA, S. Experimental studies in dengue. I. Isolation, identification and modifications of the virus. **The journal of infectious diseases**, v. 90, n. 1, p. 1–9, 1952.

HOWE, D. et al. Use of the polymerase chain reaction for the sensitive detection of St. Louis encephalitis viral RNA. **Journal of virological methods**, v. 36, n. 1, p. 101–110, 1992.

HUANG, C. et al. First isolation of West Nile virus from a patient with encephalitis in the United States. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 12, p. 1367–1371, 2002.

HUNSPERGER, E. A et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3171, 2014.

HUNT, A. R. et al. The first human epitope map of the alphaviral E1 and E2 proteins reveals a new E2 epitope with significant virus neutralizing activity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 7, p. e739, 2010.

HUNT, A. R.; CROPP, C. B.; CHANG, G. J. A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen. **Journal of virological methods**, v. 97, n. 1-2, p. 133–149, 2001.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus taxonomy: 2013 release**. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

IVERSSON, L. Situação atual do conhecimento eco-epidemiológico sobre arbovírus patogênicos para o homem na região de mata atlântica de SP. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 343–353, 1994.

IWAMOTO, M. et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. **The New England journal of medicine**, v. 348, p. 2196–2203, 2003.

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **Journal of virology**, v. 73, n. 1, p. 783–786, 1999.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future microbiology**, v. 4, p. 837–856, 2009.

KASHYAP, R. S. et al. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. **Cerebrospinal fluid research**, v. 7, p. 12, 2010.

KHAN, M. et al. Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. **Journal of medical virology**, v. 86, p. 1169–1175, 2014.

KIMURA-KURODA, J.; YASUI, K. Antigenic comparison of envelope protein E between Japanese encephalitis virus and some other flaviviruses using monoclonal antibodies. **Journal of general virology**, v. 67, p. 2663–2672, 1986.

KOMAR, N. West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. **Advances in virus research**, v. 61, p. 185–234, 2003.

KOMAR, N.; CLARK, G. G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. **Pan American journal of public health**, v. 19, n. 2, p. 112–117, 2006.

KOPP, A. et al. Provenance and geographic spread of St. Louis Encephalitis Virus. **mBio**, v. 4, n. 3, p. 1–11, 2013.

KRISZTALOVICS, K. et al. West Nile virus infections in Hungary, August-September 2008. **Euro surveillance**, v. 13, n. 45, p. 19030, 2008.

KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.

KUHN, R. J. Togaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 629–650.

KUMAR, M.; SUDEEP, A. B.; ARANKALLE, V. A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. **Vaccine**, v. 30, n. 43, p. 6142–6149, 2012.

KUMAR, P. et al. Development and evaluation of baculovirus-expressed Chikungunya virus E1 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya infection. **Journal of virological methods**, v. 206, p. 67–75, 2014.

KUNO, G.; GUBLER, D. J.; WEIL, N. S. S. Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. **Journal of virological methods**, v. 12, p. 93–103, 1985.

KUO, S.-C. et al. Cell-based analysis of Chikungunya virus membrane fusion using baculovirus-expression vectors. **Journal of virological methods**, v. 175, n. 2, p. 206–215, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAFON, M. Techniques for the production, screening and characterization of monoclonal antibodies. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 133–144.

LAHARIYA, C.; PRADHAN, S. K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years : a review. **Journal of vector borne diseases**, v. 43, p. 151–160, 2006.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–551, 1992.

LANCIOTTI, R. S. et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. **Science**, v. 286, p. 2333–2337, 1999.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4066–4071, 2000.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.

LE GUENNO, B. et al. West Nile: a deadly virus? **The lancet**, v. 348, p. 1315, 1996.

LEITMEYER, K. C. et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.

- LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The journal of infectious diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, 2000.
- LIMONTA, D. et al. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. **Journal of clinical virology**, v. 40, p. 50–54, 2007.
- LINDENBACH, B. D. et al. Flaviviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 712–746.
- LINDSEY, N. et al. Surveillance for human West Nile virus disease — United States , 1999 – 2008. **Morbidity and mortality weekly report**, v. 59, p. 1–18, 2010.
- LITZBA, N. et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. **Journal of virological methods**, v. 149, n. 1, p. 175–179, 2008.
- LOPES, O. S. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus in South Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 3, p. 583–585, 1979.
- LORENZ, I. C. et al. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. **Journal of virology**, v. 77, n. 7, p. 4370–4382, 2003.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu , state of Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 799–800, 2002.
- LUBY, J. P. St. Louis encephalitis. **Epidemiologic reviews**, v. 1, p. 55–73, 1979.
- LUBY, J. P.; SULKIN, S. E.; SANFORD, J. P. The epidemiology of St. Louis encephalitis: a review. **Annual review of medicine**, v. 20, p. 329–349, 1969.
- LUMSDEN, L. L. St. Louis encephalitis in 1933. **Public health report**, v. 73, n. 4, p. 340–354, 1958.
- MAIA, F. G. M. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirão Preto, Brazil: report of one case. **International journal of infectious diseases**, v. 26, p. 96–97, 2014.
- MALKINSON, M. et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 4, p. 392–397, 2002.
- MARTIN, C. S.-S.; LIU, C. Y.; KIELIAN, M. Dealing with low pH: entry and exit of alphaviruses and flaviviruses. **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 514–521, 2009.
- MASRINOUL, P. et al. Monoclonal antibody targeting chikungunya virus envelope 1 protein inhibits virus release. **Virology**, v. 464-465, p. 111–117, 2014.

MAZZAROTTO, G. A. C. A et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus. **Journal of virological methods**, v. 162, n. 1-2, p. 96–100, 2009.

MAZZAROTTO, G. A. C. A. **Geração e caracterização de anticorpos monoclonais para dengue e hantavírus - desenvolvimento de insumos com potencial biotecnológico aplicado à saúde**. 144 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073–1075, 2012.

METZ, S. W. et al. Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 353, 2011.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of invertebrate pathology**, v. 107, p. S16–30, 2011.

MITCHELL, C. et al. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 34, n. 5, p. 945–955, 1985.

MITCHELL, C.; FRANCY, D.; MONATH, T. Arthropod vectors. In: MONATH, T. P.; REEVES, W. C. (Eds.). **St. Louis Encephalitis**. Washington: American Public Health Association, 1980. p. 313–379.

MONDINI, A. et al. Saint Louis encephalitis virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 1, p. 176–178, 2007a.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **Journal of clinical virology**, v. 40, n. 1, p. 84–86, 2007b.

MONDOTTE, J. A. et al. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of virology**, v. 81, n. 13, p. 7136–7148, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921–927, 2003.

MORALES, M. A. et al. West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 10, p. 1559–1561, 2006.

MORRISON, T. E. Reemergence of chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 88, n. 20, p. 11644–11647, 2014.

- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MURGUE, B. et al. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 692–696, 2001.
- MURRAY, K. O.; WALKER, C.; GOULD, E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. **Epidemiology and infection**, v. 139, n. 6, p. 807–817, 2011.
- MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control. **Medical journal armed forces India**, v. 71, p. 67–70, 2015.
- NASH, D. et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 24, p. 1807–1814, 2001.
- NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus--evolution and adaptation. **Infection, genetics and evolution**, v. 10, n. 7, p. 876–885, 2010.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro , Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925–926, 2001.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 9, p. 1376–1381, 2005.
- NOGUEIRA, R. M. R. Diagnóstico laboratorial específico e diagnóstico imunológico da dengue. In: SOUZA, L. J. (Ed.). **Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008. p. 97–108.
- NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Pan American journal of public health**, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007.
- NUNES, M. et al. Phylogeography of dengue virus serotype 4, Brazil, 2010–2011. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 11, p. 1858–1864, 2012.
- OKABAYASHI, T. et al. Detection of chikungunya virus antigen by a novel rapid immunochromatographic test. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 2, p. 382–388, 2015.
- OMETTO, T. et al. West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 107, n. 11, p. 723–730, 2013.
- OSANAI, C. et al. Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53–54, 1983.

OYER, R. J.; BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L. West Nile and St. Louis encephalitis viruses. **Handbook of clinical neurology**, v. 123, p. 433–447, 2014.

PANNING, M. et al. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 3, p. 416–422, 2008.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467–474, 2011.

PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2706, 2014.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S30–S37, 2010.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H. (Eds.). **Laboratory techniques in rabies**. 4. ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 433–444.

PETERSEN, L. R.; HAYES, E. B. West Nile Virus in the Americas. **Medical clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1307–1322, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 747–794.

PIZA, A. S. T. et al. An ELISA suitable for the detection of rabies virus antibodies in serum samples from human vaccinated with either cell-culture vaccine or suckling-mouse-brain vaccine. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 1, p. 39–43, 1999.

PLATONOV, A. E. et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd region, Russia, 1999. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 128–132, 2001.

PLATONOV, A. E. et al. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. **Parasitology research**, v. 103, p. S45–53, 2008.

POPOVICI, F. et al. West Nile fever in a patient in Romania, August 2008: case report. **Euro surveillance**, v. 13, n. 39, p. 18989, 2008.

POST, P. R. et al. The early use of yellow fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil - A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 849–857, 2001.

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the Alphaviruses. **Journal of virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.

POWERS, A. M. Chikungunya. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 209–219, 2010.

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, 2014.

PRINCE, H. E. et al. Chikungunya virus RNA and antibody testing at a national reference laboratory since emergence of Chikungunya in the Americas. **Clinical and vaccine immunology**, 24 dez. 2014.

PRIYA, R. et al. Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus. **Journal of virological methods**, v. 203, p. 15–22, 2014.

PURDY, D. E.; NOGA, A. J.; CHANG, G. J. Noninfectious recombinant antigen for detection of St. Louis encephalitis virus-specific antibodies in serum by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4709–4717, 2004.

REISEN, W. K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. **Advances in virus research**, v. 61, p. 139–183, 2003.

REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, p. 291–298, 1995.

ROBERSON, J. A.; CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Differentiation of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections by use of noninfectious virus-like particles with reduced cross-reactivity. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3167–3174, 2007.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROCCO, I. M. et al. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281–285, 2005.

ROEHRIG, J. T. et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 3, p. 376–379, 2003.

ROMAN-SOSA, G.; KIELIAN, M. The interaction of alphavirus E1 protein with exogenous domain III defines stages in virus-membrane fusion. **Journal of virology**, v. 85, n. 23, p. 12271–12279, 2011.

ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 26, n. 3, p. 337–343, 1977.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **The journal of hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.

ROSSI, S. L.; ROSS, T. M.; EVANS, J. D. West Nile virus. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 47–65, 2010.

ROSSINI, G. et al. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008-case report. **Euro surveillance**, v. 13, n. 41, p. 19002, 2008.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.

RUDNICK, A. Studies of the ecology of dengue in Malaysia. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 35, n. 1, p. 78–79, 1966.

SABIN, A. Research on dengue during World War II. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 1, p. 30–50, 1952.

SAMBOL, A. R.; HINRICHS, S. H. Evaluation of a new West Nile virus lateral-flow rapid IgM assay. **Journal of virological methods**, v. 157, n. 2, p. 223–226, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, C. L. S. DOS et al. Genetic characterization of St. Louis encephalitis virus isolated from human in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 57–63, 2006.

SCHATZMAYR, H. G. Aspectos históricos da dengue e de seus vetores. In: SOUZA, L. J. (Ed.). **Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008. p. 1–10.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245–246, 1986.

SCHILLING, S. et al. Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. **Journal of clinical virology**, v. 31, p. 179–184, 2004.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 27, n. 2, p. 353–365, 1972.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.

- SCHUL, W. et al. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 5, p. 665–674, 2007.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.
- SELVARAJAH, S. et al. A neutralizing monoclonal antibody targeting the acid-sensitive region in chikungunya virus E2 protects from disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 9, p. e2423, 2013.
- SERGON, K. et al. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333–337, 2008.
- SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central-West, Northeast and Southeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 7, p. 921–923, 2013.
- SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.
- SMITHBURN, K. C. et al. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. **American journal of tropical medicine**, v. 20, p. 471–472, 1940.
- SNOW, G. E. et al. Research on Dengue during World War II Revisited. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1203–1217, 2014.
- SOLOMON, T. Flavivirus encephalitis. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 4, p. 370–378, 2004.
- SPINSANTI, L. I. et al. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. **Journal of clinical virology**, v. 42, n. 1, p. 27–33, 2008.
- STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 6, p. 942–948, 2009.
- STEINMAN, A. et al. Clinical signs of West Nile virus encephalomyelitis in horses during the outbreak in Israel in 2000. **Veterinary record**, v. 151, n. 2, p. 47–49, 2002.
- STIASNY, K. et al. Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. **Journal of virology**, v. 80, n. 19, p. 9557–9568, 2006.
- STRAUSS, E. G. et al. Identification of antigenically important domains in the glycoproteins of Sindbis virus by analysis of antibody escape variants. **Journal of virology**, v. 65, n. 9, p. 4654–4664, 1991.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The Alphaviruses : gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 47, n. 3, p. 280–286, 2014.

TAKAHASHI, H. et al. Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM/M-E virus-like particles of West Nile virus. **Microbes and infection**, v. 11, n. 13, p. 1019–1028, 2009.

TANG, K. F.; OOI, E. E. Diagnosis of dengue: an update. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 10, n. 8, p. 895–907, 2012.

TBER, A. A. West Nile fever in horses in Morocco. **Bulletin de l'office international des epizooties**, v. 11, p. 867–869, 1996.

TEMPORÃO, J. et al. Dengue virus serotype 4, Roraima state, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 938–939, 2011.

TERZIAN, A. C. B. et al. Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector borne and zoonotic diseases**, v. 11, n. 3, p. 291–300, 2011.

TESH, R. et al. Immunization with heterologous flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 245–251, 2002.

TRAINOR, N. B. et al. Mutation analysis of the fusion domain region of St. Louis encephalitis virus envelope protein. **Virology**, v. 360, n. 2, p. 398–406, 2007.

TRIKI, H. et al. West Nile viral meningo-encephalitis in Tunisia. **Medicine tropicale**, v. 61, n. 6, p. 487–490, 2001.

TRIPATHI, N. K.; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2461–2471, 2014.

TSAI, T. et al. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. **Lancet**, v. 352, p. 767–771, 1998.

TSETSARKIN, K. A et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, 2007.

TWIDDY, S. S.; HOLMES, E. C. The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. **Journal of general virology**, v. 84, p. 429–440, 2003.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2011.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Advances in virus research**, v. 72, n. 08, p. 1–76, 2008.

VAUGHN, D. et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 1, p. 234–238, 1998.

VAZEILLE, M. et al. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS one**, v. 2, n. 11, p. e1168, 2007.

VENTER, M. et al. Lineage 2 West Nile virus as cause of fatal neurologic disease in horses, South Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 6, p. 877–884, 2009.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.

VRATI, S. et al. Location of a major antigenic site involved in Ross River virus neutralization. **Virology**, v. 162, p. 346–353, 1988.

WADE, N. Hybridomas: the making of a revolution. **Science**, v. 215, n. 4536, p. 1073–1075, 1982.

WARTER, L. et al. Chikungunya virus envelope-specific human monoclonal antibodies with broad neutralization potency. **Journal of immunology**, v. 186, n. 5, p. 3258–3264, 2011.

WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087–1101, 2012.

WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 789–801, 2004.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **The journal of biological chemistry**, v. 244, n. 16, p. 4406–4412, 1969.

WEBSTER, L. T.; FITE, G. L. A virus encountered in the study of material from cases of encephalitis in the St. Louis and Kansas city epidemics of 1933. **Science**, v. 78, n. 2029, p. 463–465, 1933.

WEINBERGER, M. et al. West Nile fever outbreak , Israel , 2000: epidemiologic aspects. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 686–691, 2001.

WINTACHAI, P. et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of medical virology**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 2012.

WISDOM, G. B. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. In: BURNS, R. (Ed.). **Methods in molecular biology immunochemical protocols**. 3. ed. Totowa: Human Press Inc., 2005. p. 127–130.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue. Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: WHO, 2009. p. 148

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests**. Geneva: World Health Organization, 2009b. v. 15p. 42

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Preparedness and response for Chikungunya virus: Introduction in the Americas**. Washington, DC: PAHO, 2011. p. 149

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chikungunya**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=343&Itemid=40931>. Acesso em: 25 abr. 2015.

WU, S. et al. Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, n. 4, p. 452–457, 1997.

YATHI, K. K. et al. Recombinant CHIK virus E1 coat protein of 11 KDa with antigenic domains for the detection of Chikungunya. **Journal of immunological methods**, v. 372, p. 171–176, 2011.

YOKOYAMA, W. M. et al. Production of monoclonal antibodies. In: COLIGAN, J. E. et al. (Eds.). **Current protocols in immunology**. New York: John Wiley & Sons, 2006. p. 2.5.1–2.5.25.

YOO, E. M. et al. Myeloma expression systems. **Journal of immunological methods**, v. 261, p. 1–20, 2002.

ZANLUCA, C. et al. Novel monoclonal antibodies that bind to wild and fixed rabies virus strains. **Journal of virological methods**, v. 175, n. 1, p. 66–73, 2011.

ZELLER, H. G.; SCHUFFENECKER, I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas.

European journal of clinical microbiology and infectious diseases, v. 23, p. 147–156, 2004.

APÊNDICE

Artigo "*Development, characterization and application of monoclonal antibodies against Brazilian Dengue virus isolates*"



Development, Characterization and Application of Monoclonal Antibodies against Brazilian Dengue Virus Isolates

Camila Zanluca^{1,2,9}, Giovanni Augusto Camacho Antevere Mazzarotto^{1,9}, Juliano Bordignon^{1*}, Claudia Nunes Duarte dos Santos^{1*}

1 Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz/PR), Curitiba, Paraná, Brasil, **2** Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil

Abstract

Dengue is the most prevalent human arboviral disease. The morbidity related to dengue infection supports the need for an early, quick and effective diagnostic test. Brazil is a hotspot for dengue, but no serological diagnostic test has been produced using Brazilian dengue virus isolates. This study aims to improve the development of immunodiagnostic methods for dengue virus (DENV) detection through the production and characterization of 22 monoclonal antibodies (mAbs) against Brazilian isolates of DENV-1, -2 and -3. The mAbs include IgG2 κ , IgG2 α and IgG1 κ isotypes, and most were raised against the envelope or the pre-membrane proteins of DENV. When the antibodies were tested against the four DENV serotypes, different reactivity patterns were identified: group-specific, subcomplex specific (DENV-1, -3 and -4 and DENV-2 and -3) and dengue serotype-specific (DENV-2 or -3). Additionally, some mAbs cross-reacted with yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV) and Saint Louis encephalitis virus (SLEV). None of the mAbs recognized the alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). Furthermore, mAbs D3 424/8G, D1 606/A12/B9 and D1 695/12C/2H were used to develop a capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for anti-dengue IgM detection in sera from patients with acute dengue. To our knowledge, these are the first monoclonal antibodies raised against Brazilian DENV isolates, and they may be of special interest in the development of diagnostic assays, as well as for basic research.

Citation: Zanluca C, Mazzarotto GACA, Bordignon J, Duarte dos Santos CN (2014) Development, Characterization and Application of Monoclonal Antibodies against Brazilian Dengue Virus Isolates. PLoS ONE 9(11): e110620. doi:10.1371/journal.pone.0110620

Editor: Nicholas J. Mantis, New York State Dept. Health, United States of America

Received: June 11, 2014; **Accepted:** September 15, 2014; **Published:** November 20, 2014

Copyright: © 2014 Zanluca et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors thank CNPq, CNPq/Prosiul, Fiocruz, Fundação Araucária and Fundo Paraná and CNPq/CAPEs PROCAD/Casadinho for financial support. CNDs is a CNPq fellowship recipient. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: clsantos@tecpa.br (CNDs); julianobordignon@fiocruz.br (JB)

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dengue is one of the most prevalent arboviral diseases in tropical and subtropical regions of the world. Over 40% of the world's population lives in areas at risk of transmission, and there are an estimated 390 million dengue infections each year, of which 96 million manifest disease symptoms [1]. Additionally, it is believed that ~500,000 cases result in severe disease and ~12,500 in death each year [2,3].

Dengue virus (DENV), the causative agent of dengue, is a positive-sense single-stranded RNA virus that belongs to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. The virus is transmitted by *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes and is classified into four antigenically distinct but closely related serotypes (DENV-1 to -4) [4]. All four DENV serotypes manifest in a wide spectrum of clinical presentations, including severe (hemorrhagic fever, DHF; or shock syndrome, DSS) and non-severe diseases (dengue fever, DF) [5]. DENV infection symptoms are not sufficiently specific to allow clinical differentiation from other acute febrile illnesses, especially in areas where multiple tropical diseases such as malaria, yellow

fever, West Nile disease and Saint Louis encephalitis are endemic [6]. There are several dengue vaccine candidates under development, but none is licensed and available [7]. Additionally, there is no specific treatment for dengue, and the most effective protective measures are those that lower the risk of mosquito bites. Thus, early diagnosis is crucial to reducing morbidity and mortality from DHF and DSS.

Laboratory diagnosis of dengue is based on viral isolation in cell culture, reverse-transcriptase/polymerase-chain reaction (RT-PCR) and serological assays [8,9,10,11]. Several immunoassays for DENV, such as enzyme immunoassays, immunochromatographic and dot-blot assays, are commercially available [10,12,13,14,15]. The IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) is the assay of choice for the serological diagnosis of primary dengue-virus infection [11]. Combined with IgG titers, this assay allows the diagnosis of secondary dengue infection. Furthermore, both IgM and IgG dengue ELISAs are useful tools for seroepidemiological dengue surveillance and can be applied in studies of DENV pathogenesis and host-pathogen relationships [16,17].

Antibodies have been used in recent decades to diagnose several viral diseases and in investigations of viral structure [18,19,20,21,22]; however, the heterogeneity of the polyclonal antibodies used in tests can lead to problems in the interpretation, reproducibility and standardization of the assays. To overcome these limitations, several monoclonal antibodies (mAbs) able to bind to specific antigens have been developed [20,23,24,25]. The first serotype-specific mAbs against DENV were developed by Dittmar et al. (1980) [26]. Monoclonal antibodies against DENV have been successfully used for the identification of viral serotypes, flavivirus differentiation and epidemiological studies, as well as for dengue diagnosis and immunotherapy studies [10,27,28,29,30,31,32,33,34,35].

This study reports the development and characterization of twenty-two mAbs against Brazilian DENV isolates. From this panel, three mAbs were tested in an IgM capture assay for the detection of acute dengue patients in Brazil. The monoclonal antibodies generated were group-specific, subcomplex-specific and serotype-specific, representing essential tools for dengue- and serotype-specific diagnosis. Thus, these antibodies have the potential to increase the specificity and sensitivity of dengue diagnosis in Brazil and throughout South America.

Animals and Methods

Cell lines and viruses

The mouse myeloma cell line P3x63Ag8.653 (kindly supplied by Dr. Carlos R. Zanetti, from Laboratório de Imunologia Aplicada, at Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ATCC CRL-1580) and hybridomas were maintained in RPMI-1640 medium (Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS—Gibco, Grand Island, USA), 23.8 mM sodium bicarbonate, 2.0 mM L-glutamine, 1.0 mM sodium pyruvate, 9.6 mM HEPES and antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B—Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. C6/36 *Aedes albopictus* cells (ATCC CRL-1660) were cultured in Leibovitz's L15 medium (Gibco) with 5% FBS, 25 µg/ml gentamicin (Gibco) and 0.27% tryptose at 28°C. Human-derived hepatoma cells (Huh7.5) (ATCC PTA-8561) and Vero E6 cells (Sigma, 85020206) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Ham F12 (DMEM F12—Gibco) with 10% FBS, 14.0 mM sodium bicarbonate and antibiotics (100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

The serotypes DENV-1 (BR/01-MR and BR/90), -2 (BR/01-01 and ICC 266), -3 (290-02) and -4 (TVP 360) were used in this study. DENV-4 TVP 360 is a World Health Organization reference strain, kindly supplied by Dr. Ricardo Galler from Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. DENV-1 BR/01-MR (GenBank AF513110.1) and BR/90 (GenBank AF226685.2); DENV-2 BR/01-01 (GenBank JX073928) and ICC 266 (not sequenced); and DENV3 290-02 (GenBank EF629369.1) are clinical isolates from dengue fever obtained in Brazil between 1990 and 2004. All viruses were amplified and titrated by the foci-forming assay in C6/36 cells [36]. The yellow fever virus (YFV) 17DD vaccine strain (BioManguinhos, Fiocruz, Brazil) was obtained after three passages and titration in Vero cells [37]. The Saint Louis encephalitis virus (SLEV) 78V6507 strain, isolated from *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquitoes from Santa Fé Province, Argentina [38]; West Nile virus (WNV) E/7229/06, isolated from a dead horse from Buenos Aires Province, Argentina [39]; and Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) TC38 vaccine strain [40] were kindly supplied by Dr. Marta S.

Contiginani from Instituto de Virologia Dr. J.M. Vanella, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Animals and immunization protocol

Ethics statements for all animal procedures were approved by the Ethical Committee on Animal Research of the Universidade Federal do Paraná under the protocol no. 23075.031314/2008-41. Four young adult (30- to 45-day-old) BALB/c mice were used in the immunization protocols for each DENV serotype. All animals were maintained at the Animal Facility of the Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR with water and food *ad libitum* and a light-dark cycle of 12 h/12 h.

Animals were bled by caudal puncture for extraction of pre-immune serum and then immunized with five doses of 1×10^6 flu_{C6/36}/dose/animal of DENV-1 (BR-01/MR), -2 (BR/01-01) or -3 (BR 290-02). Doses were administered via the intraperitoneal (doses 1 and 3), intradermal (doses 2 and 4) or intravenous route (dose 5), with 1-week intervals between doses. Complete Freund's adjuvant was used in dose 1 (Sigma-Aldrich), and Alu-Gel-S was used in doses 2 to 4 (Serva, Heidelberg, Germany). No adjuvant was used in the fifth dose.

Production of monoclonal antibodies

Three days after the final immunization, the mice were anesthetized with ketamine/xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) via the intraperitoneal route and bled by cardiac puncture to obtain post-immune sera. After post-immune sera were obtained, the animals were euthanized by cervical dislocation. Their spleens were removed aseptically, and splenocytes were fused with P3x63Ag8.653 cells using polyethylene glycol (MW 3000–3700; Sigma-Aldrich), as previously described [20]. Hybrid cells were selected by growth in RPMI-1640 (as described above) plus 100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin and 16 µM thymidine (HAT medium—Sigma-Aldrich) for 14 days. The hybridoma supernatants were screened by indirect immunofluorescence assay (IFA), as described below. Hybridomas whose supernatants showed positive results on IFA were stabilized by two successive freeze-thaw cycles. Cells that remained positive after two cycles were subjected to two rounds of the limiting dilution method and stored in liquid nitrogen. The immunoglobulin isotypes of the mAbs were determined using the SBA Clonotyping System/HRP (Southern Biotech, Birmingham, USA), following the manufacturer's instructions.

mAb screening

Hybridomas secreting antibodies against DENV were selected by IFA on DENV-infected C6/36 cells and on control uninfected C6/36 cells (MOCK). C6/36 cells (1.0×10^5 cells/well in 96-well plates) were infected with the corresponding DENV isolate at a multiplicity of infection (MOI) of 1. Cells were fixed 72 h post-infection with methanol:acetone (1:1 v/v) for at least 30 min at –20°C. Hybridoma supernatants (100 µL) containing the first antibodies were added and incubated for 30 min at 37°C. To detect reactive antibodies, the infected cells were incubated for 1 h at 37°C with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Sigma-Aldrich). Cell nuclei were labeled with 300 nM of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 minutes, followed by 3 washes with 1x PBS. The flavivirus-specific mAb 4G2 (hybridoma D1-4G2-4-15, ATCC HB-112) and a non-correlated mAb that recognizes hantavirus nucleoprotein (clone 572/7A) [20] were used as positive and negative controls, respectively. The immunofluorescence images were captured with a Leica AF6000 Modular System.

Table 1. Monoclonal antibody (mAb) designation and characterization.

mAb	DENV serotype for immunization	Isotype	Reactivity against				Virion protein
			DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	
D1 463/G6/H2	DENV 1	IgG1κ	+	-	+	+	E
D1 695/12C/2H	DENV 1	IgG1κ	+	+	+	+	E
D1 606/A12/B9	DENV 1	IgG1κ	+	+	+	+	prM
D2 646/9G	DENV 2	IgG2κ	-	+	-	-	N.D.
D2 658/9A	DENV 2	IgG2κ	-	+	-	-	N.D.
D2 332/2D	DENV 2	IgG2κ	-	+	-	-	E
D3 342/5G/G8	DENV 3	IgG2κ	-	-	+	-	E
D3 388/4A/G6	DENV 3	IgG1κ	-	-	+	-	E
D3 444/4G/H3	DENV 3	IgG2bκ	-	-	+	-	E
D3 389/F4/H10	DENV 3	IgG1κ	-	-	+	-	E
D3 441/D1/H2	DENV 3	IgG2bκ	-	-	+	-	E
D3 290/4C/G9	DENV 3	IgG2κ	-	-	+	-	E
D3 341/H9/F10	DENV 3	IgG2κ	-	-	+	-	E
D3 344/H1	DENV 3	IgG2bκ	-	-	+	-	E*
D3 442/4E/G8	DENV 3	IgG2bκ	-	-	+	-	E
D3 242/F1/H2	DENV 3	IgG2κ	-	+	+	-	E
D3 424/8G	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	E
D3 863/G7/H7	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	prM
D3 457/H7/H2	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	prM
D3 443/H12/H6	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	prM
D3 868/G7/H10	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	prM
D3 63/F2/G7	DENV 3	IgG2bκ	+	+	+	+	E**

N.D. not determined; - negative; + positive; E, envelope protein; prM, pre-membrane protein;

*Did not react in the western blot, but recognize recombinant DENV-3 E Δ₁₀₁ protein expressed on *Drosophila* S2 cells on IFA.

**Reacted in the western blot, but did not recognize recombinant DENV-3 E Δ₁₀₁ expressed on S2 cells on IFA.

doi:10.1371/journal.pone.0110620.t001

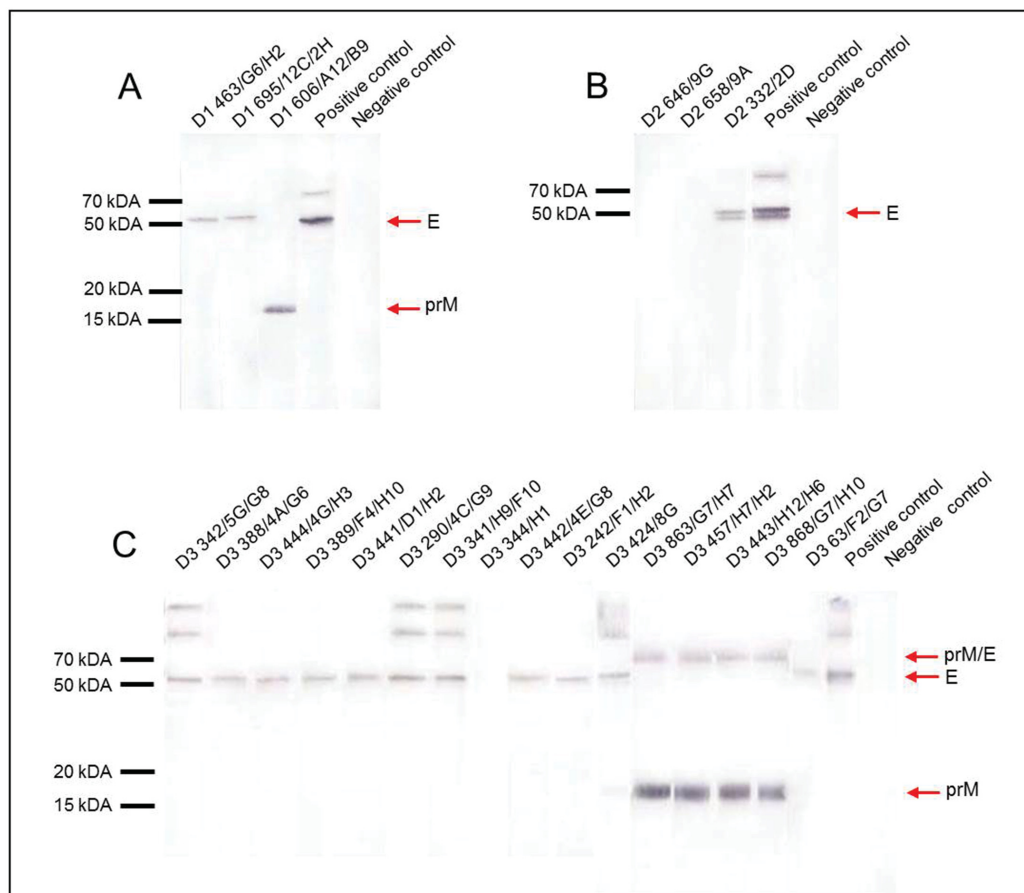


Figure 1. Western blot analysis of mAbs raised against the homologous DENV serotype. Purified gamma-irradiated DENV-1 BR/01-MR (A), DENV-2 BR/01-01 (B), and DENV-3 290-02 (C) were subjected to 13% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Proteins were stained with the mAbs, followed by anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase. The flavivirus-specific mAb 4G2 and a non-correlated mAb that binds to hantavirus nucleoprotein (clone 572/7A) were used as positive (+) and negative (−) controls, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0110620.g001

Specificity of anti-dengue virus mAbs

To investigate the specificity of mAbs to DENV proteins, mAbs were used in western blot (WB) assays with the corresponding DENV serotypes. Dengue viruses were obtained from the supernatant of C6/36 cells infected with a MOI of 0.01. Each virus serotype was concentrated by polyethylene glycol precipitation using PEG 8000 at a final concentration of 7%, and purified by sedimentation through a 30%/60% sucrose (in TNE – 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) cushion. Further, purified DENV were inactivated by gamma irradiation.

Viral proteins had previously been quantified with the Micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, USA). Three micrograms of purified gamma-irradiated DENV-1 BR/01-MR or DENV-2 BR/01-01, or 12 µg of DENV-3 290-02, were mixed with Laemmli sample buffer, boiled for 3 min and loaded into 13% SDS-PAGE gels [41]. Viral proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK). Membranes were incubated first with 5% non-fat milk in TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6, containing 0.05% Tween 20) and then with hybridoma supernatants. Monoclonal antibodies 4G2 and anti-hantavirus 572/7A were used as positive and negative controls, respectively. Anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (1:7,500; Sigma-Aldrich) was used as a secondary antibody. All incubation steps were conducted for 1 h at

room temperature. The reaction was developed using a solution of NBT (nitroblue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Promega, Madison, USA). mAbs produced against the DENV-2 isolate were also tested by WB with a recombinant domain III peptide from DENV-2 envelope protein (~12 kDa) expressed in a prokaryotic system. Furthermore, mAbs produced against DENV-3 were tested by IFA with a truncated recombinant E protein from DENV-3 (DENV-3 E Δ_{101}) expressed by transfected *Drosophila* S2 cells. S2 cells transfected with the plasmid pMt/Bip/V5-HisA containing the gene of the E protein from DENV-3 strain BR 290-02 (GenBank EF629369.1), deleted from the carboxy-terminal anchor (corresponding to the last 101 amino acids), were cultured in Schneider's medium (Gibco) with 10% FBS and 25 µg/mL of gentamicin (Gibco). Envelope protein expression was induced by 500 µM of CuSO₄ for 48 h. After protein induction 1×10^5 cells/well were added to a 96-well plate. After adhesion, cells were fixed with methanol:acetone, and IFA was performed as described above.

Reactivity of mAbs against the four DENV serotypes and other flaviviruses and alphaviruses

The reactivity of the mAbs against the four serotypes of DENV was determined using the IFA. C6/36 cells were infected with the DENV-1 (BR/90), -2 (ICC 266), -3 (290-02) or -4 (TVP 360)

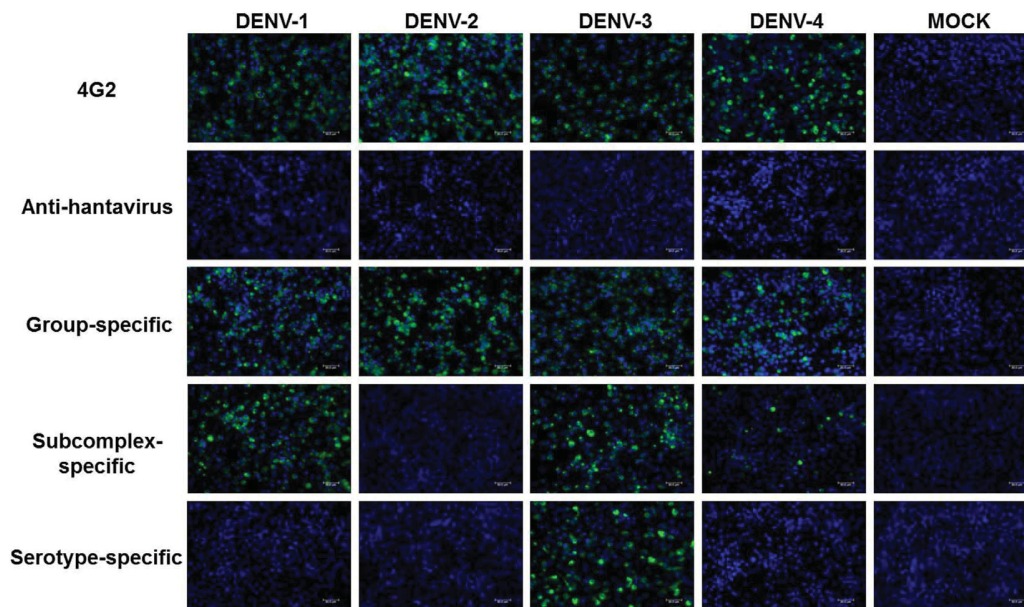


Figure 2. Representation of the reactivities of major groups of monoclonal antibodies. Indirect immunofluorescence of C6/36 cells uninfected (MOCK) or infected with DENV-1 (BR/90), DENV-2 (ICC 266), DENV-3 (290-02) and DENV-4 (TVP 360) isolates. Cells were fixed in methanol:acetone and stained with different mAbs, followed by Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse immunoglobulin. Monoclonal antibody 4G2 and a non-correlated anti-hantavirus mAb (clone 572/7A) were used as positive and negative controls, respectively. Distinct groups of mAbs were raised against DENV: 1) group-specific (D3 424/8G); 2) subcomplex-specific (Anti-DENV-1, anti-DENV-3 and anti-DENV-4; clone D1 463/G6/H2); and 3) serotype-specific (anti-DENV-3 D3 290/4C/G9) mAbs. Images were produced in a Leica AF6000 Modular System. Scale bars are 30 μm . doi:10.1371/journal.pone.0110620.g002

isolates at a MOI of 1. After 72 h of infection, the cells were fixed in methanol:acetone and assayed by IFA, as previously described. The reactivity of each mAb against the Huh7.5 cells infected with the YFV 17DD strain, the SLEV 78V6507 isolate and the VEEV TC83 strain and Vero E6 cells infected with the WNV E/7229/06 isolate at MOIs of 1 (2.0×10^4 cells/well) was also assayed by IFA after 72 h, as previously described.

Conjugation of mAb to horseradish peroxidase (HRP) and application to the development of a capture ELISA

The antibodies were coupled with horseradish peroxidase (HRP) according to a modified periodate procedure [42]. Briefly, mAbs D3 424/8G, D1 606/A12/B9 and D1 695/12C/2H were purified on a protein-G column (GE-Healthcare) according to the manufacturer's instructions. HRP was structurally modified by sodium periodate and dialyzed against sodium-acetate buffer (pH 4.4) over 16 h at 4°C. The purified mAb diluted in sodium carbonate was added to the HRP solution and mixed for 2 h at room temperature, followed by the addition of a sodium borohydride solution. After 2 h, conjugated antibodies were purified by ammonium sulfate precipitation [43]. The performance of the mAbs D3 424/8G-HRP, D1 606/A12/B9-HRP and D1 695/12C/2H-HRP conjugate was evaluated by an in-house MAC-ELISA using gamma-irradiated purified DENV particles. A MAC-ELISA was performed as described by Takasaki et al. (2002) [44], with minor modifications. A total of twenty-two human serum samples from patients with dengue fever and twenty-four dengue-negative human sera kindly supplied by State Central Laboratory LACEN/PR were tested (Fiocruz Research Ethics Committee under protocol 617-11). A dengue IgM capture ELISA from PanBio (PanBio, Queensland, Australia) was used to diagnose samples for comparison with the results of the in-house assay.

Results

The fusion experiments (one for DENV-1, one for DENV-2 and another for DENV-3) generated a total of 1,100 hybridomas, which were screened by IFA to evaluate the presence of anti-DENV antibodies. One hundred forty-seven hybridomas (13.4%) were positive for antibody secretion against the corresponding DENV isolate, with different fluorescence levels. The clones were stabilized through two freeze-thaw cycles, resulting in 22 stable hybridomas. Three of these hybridomas produced antibodies against DENV-1 BR/01-MR; three produced antibodies against DENV-2 BR/01-01; and sixteen produced antibodies against DENV-3 BR 290-02. Antibody isotyping revealed ten IgG2b mAbs, seven IgG2a and five IgG1, all possessing kappa light chains (Table 1).

Western blot analysis with purified DENV particles showed that fourteen mAbs recognized the envelope protein (E) and five recognized the pre-membrane protein (prM; Figure 1; Figure S1). Additionally, mAbs D2 646/9G, D2 658/9A, and D3 344/H1 showed no reaction to the viral structural proteins on western blot assays (Figure 1). Monoclonal antibodies against DENV-2 were also tested against a recombinant peptide from domain III of the DENV-2 E protein. D2 332/2D reacted specifically to domain III of the E protein while D2 646/9G and D2 658/9A did not (Figure S1). Additionally, on IFA, mAb D3 344/H1 bound the recombinant E protein of DENV-3 expressed on *Drosophila* S2 cells, suggesting that it is directed to a conformational epitope of the E protein (Figure S2).

Interestingly, mAb D3 63/F2/G7 recognized the E protein in the western blot but not in the IFA against recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein. From twelve mAbs that reacted against the E protein of DENV-3 by WB only D3 63/F2/G7 does not recognize E protein expressed on *Drosophila* S2 cells, suggesting that this mAb recognizes an epitope located on the carboxi-terminal of the

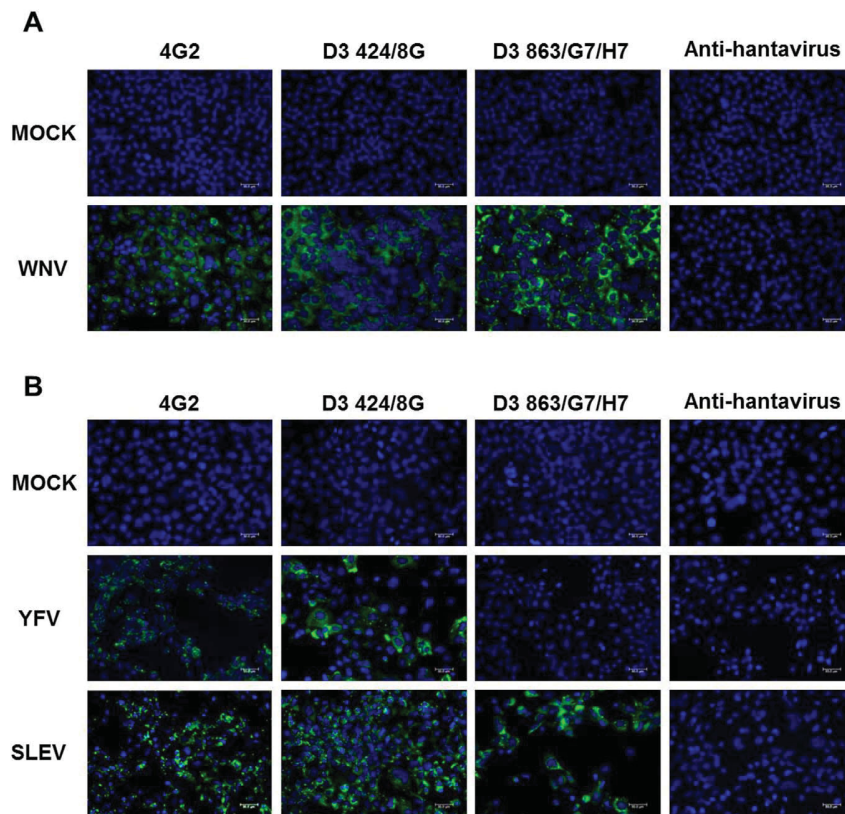


Figure 3. Cross-reactivity of mAbs D3 424/8G and D3 863/G7/H7 against WNV, SLEV and YFV. Vero E6 cells were infected with WNV (A), whereas Huh7.5 cells were infected with YFV and SLEV (B). Cells were fixed in methanol:acetone and stained with mAbs, followed by Alexa-Fluor 488-conjugated anti-mouse immunoglobulin. Monoclonal antibody 4G2 and a non-correlated anti-hantavirus mAb (572/7A) were used as positive and negative controls, respectively. Images were obtained with a Leica AF6000 Modular System. Scale bars are 30 μm . doi:10.1371/journal.pone.0110620.g003

E protein or alternatively, different epitopes conformations are available in the antigens preparations (Figure S2 and Table S1). The positive control 4G2 recognized the E protein in IFA and western blots. No reaction was observed to the anti-hantavirus mAb, which was used in both assays as a negative control (Figure 1; Figure S2).

To investigate whether the mAbs could be used for diagnostic and epidemiological purposes, the mAbs were assessed for specificity to the different DENV serotypes and to other flaviviruses. The mAbs were assayed against the DENV-1 (BR/90), -2 (ICC 266), -3 (290-02) and -4 (TVP 360) isolates. Several recognition patterns were identified: group-specific (DENV-1, -2, -3 and -4), subcomplex-specific (DENV-1, -3 and -4, and DENV-2 and -3) and serotype-specific (DENV-2 or -3). Eight mAbs recognized the four DENV serotypes. One mAb reacted with DENV serotypes 1, 3 and 4, and one reacted with serotypes 2 and 3. Three mAbs reacted specifically to serotype 2 and nine reacted to serotype 3 (Table 1 and Figure 2). All mAbs showed the same characteristic staining pattern in IFA in C6/36 infected cells, with a strong perinuclear stain, as illustrated in the reaction with mAb D3 424/8G (Figure 2).

Moreover, the reactivity of the mAbs was also tested against YFV 17DD, the SLEV 78V6507 isolate, the WNV E/7229/06 isolate and the VEEV TC38 strain. D3 424/8G recognized SLEV, WNV and YFV and did not cross-react with the alphavirus VEEV, suggesting that it is flavivirus-specific (Figure 3 and Table 2). Monoclonal antibodies directed against prM from

DENV, D3 443/H12/H6, D3 457/H7/H2, D3 863/G7/H7 and D3 868/G7/H10 recognized the four DENV serotypes, SLEV and WNV but did not react against YFV or VEEV (Table 2). The positive control 4G2 reacted with all dengue serotypes (Figure 2) and other flaviviruses (Figure 3). As expected, anti-hantavirus mAb (572/7A) did not react with any of the viruses tested (Figures 2 and 3).

Finally, mAbs D3 424/8G, D1 606/A12/B9 and D1 695/12C/2H were successfully conjugated to HRP for use in diagnostic assays. The three monoclonal antibodies were used to detect dengue virus antigen in human serum samples using an in-house MAC-ELISA (Figure 4). These results are consistent with those from the commercially available PanBio IgM capture assay kit. This method could thus be used to differentiate between negative and positive samples.

Discussion

Dengue is hyperendemic to tropical and subtropical regions of the world. In Brazil, more than seven million dengue cases have been confirmed since 1986, causing more than two thousand deaths [45]. The co-circulation of the four DENV serotypes and the wide distribution of the mosquito vector *Aedes aegypti* are most likely responsible for the increased incidence and distribution of dengue. Severe clinical manifestations have also increased in recent years, suggesting that dengue should remain a public health priority in Brazil [46]. Therefore, early and accurate diagnosis is essential to reducing morbidity and mortality related to dengue.

Table 2. Cross-reactivity of anti-dengue virus monoclonal antibodies against YFV, SLEV, WNV and VEEV.

mAb	Reactivity against			
	YFV	SLEV	WNV	VEEV
D1 463/G6/H2	-	-	-	-
D1 695/12C/2H	-	-	-	-
D1 606/A12/B9	-	-	-	-
D2 646/9G	-	-	-	-
D2 658/9A	-	-	-	-
D2 332/2D	-	-	-	-
D3 342/5G/G8	-	-	-	-
D3 388/4A/G6	-	-	-	-
D3 444/4G/H3	-	-	-	-
D3 389/F4/H10	-	-	-	-
D3 441/D1/H2	-	-	-	-
D3 290/4C/G9	-	-	-	-
D3 341/H9/F10	-	-	-	-
D3 344/H1	-	-	-	-
D3 442/4E/G8	-	-	-	-
D3 242/F1/H2	-	-	-	-
D3 424/8G	+	+	+	-
D3 863/G7/H7	-	+	+	-
D3 457/H7/H2	-	+	+	-
D3 443/H12/H6	-	+	+	-
D3 868/G7/H10	-	+	+	-
D3 63/F2/G7	-	-	-	-

-: negative;
+: positive.

doi:10.1371/journal.pone.0110620.t002

Commercial kits for dengue diagnosis must be imported at great expense to the Brazilian Ministry of Health.

In this report, we describe the production and characterization of 22 mAbs against Brazilian DENV from the clinical isolates of DENV serotypes 1 (BR-01/MR), 2 (BR/01-01) or 3 (BR 290-02).

All of the mAbs showed the same characteristic staining pattern in IFA, with a strong perinuclear stain tending to spread throughout the cytoplasm in fluorescent granules. This observation is consistent with the distribution of DENV-2 proteins observed by Cardiff et al. (1973) [47], who observed an intense perinuclear

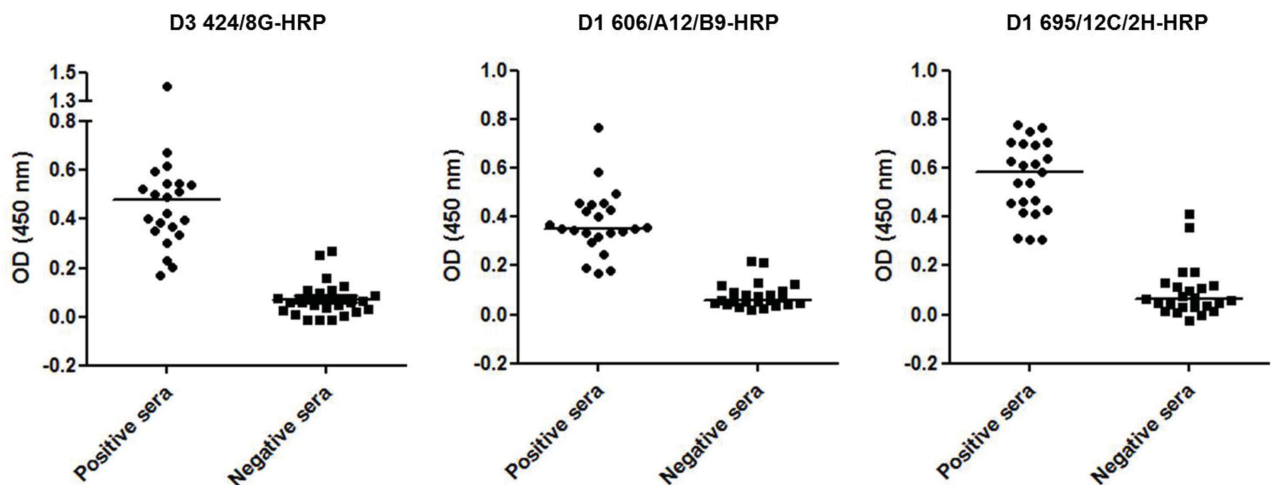


Figure 4. Application of antibodies to the development of MAC-ELISA. HRP-conjugated D3 424/8G, D1 606/A12/B9 and D1 695/12C/2H mAbs were used in an in-house MAC-ELISA assay to detect anti-dengue virus IgM in the sera of infected (N = 22) and non-infected patients (N = 24).
doi:10.1371/journal.pone.0110620.g004

fluorescence radiating into the cytoplasm in a granular pattern of decreasing intensity. Henchal et al. (1982) found the same fluorescence pattern with monoclonal antibodies after infecting LLC-MK2 cells with a different flavivirus [29]. Both structural and non-structural proteins may localize in the perinuclear region before virus release, causing intense perinuclear staining in this region, whereas cytoplasmic fluorescence is associated with virion antigens [47].

Western blot and IFA analyses showed that most of the mAbs produced in this study are specific to the E or the prM proteins of DENV. The mice were immunized with the virion particle, and DENV does not replicate well in immunocompetent mice [48,49]. Usually, structural proteins are the major antigens that stimulate the immune response [50]. In humans, proteins E and prM, together with the non-structural protein 1 (NS1), are the major targets of the antibody response during DENV infection, especially in primary infection [51,52].

The envelope protein from DENV-2, recognized by both the mAbs D2 332/2D and the positive control 4G2, appeared as two bands in the WB, which may represent different glycosylation patterns of the E protein [53]. The other antibodies raised against DENV-2 (D2 646/9G and D2 658/9A) did not recognize DENV antigens in the IFA and WB assays. These mAbs may recognize a non-structural protein or a conformational epitope in structural proteins. D3 342/5G/G8, D3 290/4C/G9, D3 341/H9/F10, D3 424/G8 and the positive control, 4G2, recognized bands that may represent dimeric and trimeric forms of the DENV E protein, suggesting the presence of epitopes exposed in the three different forms of dengue E protein [54]. Also, variability on band intensities observed in WB could be due to differences in mAbs concentration since unpurified supernatants have been used in the assays.

Additionally, mAb D3 63/F2/G7 recognized DENV-3-E protein only in the WB assay and not recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein. Since the recombinant E protein lacks the last 101 amino acids corresponding to the juxtamembrane stem region and the transmembrane anchor [55], the mAb D3 63/F2/G7 would recognize an epitope located at this domain. Also, this finding is consistent with reports describing flavivirus mAbs directed to cryptic epitopes of E protein [25,56,57]. Some epitopes are readily available on the surface of mature DENV, whereas others are partially or completely inaccessible. Denaturation of viral particles renders the cryptic epitopes accessible, allowing the antibodies to bind. Stiasny et al. (2006) isolated cross-reactive antibodies directed to a cluster of epitopes that are partially occluded in the cage-like assembly of E proteins located at the surface of infectious virions of tick-borne encephalitis virus (TBEV) [56]. Austin et al. (2012) and Chan et al. (2012), respectively, reported the isolation of a mAb able to bind to cryptic epitopes located at a CC' loop epitope on domain III (DIII) of the E protein from two different DENV-1 genotypes and the isolation of a human prM-specific antibody that bound a cryptic epitope located in the DI/DII junction on the DENV E glycoprotein [25,57].

Some flavivirus epitopes are also shared by other viruses in this family. mAbs raised against JEV E protein cross-reacted against Murray Valley encephalitis (MVE), WNV, SLE and DENV-1 and -2 [58]. Aside from the four dengue serotypes, the monoclonal antibody D3 424/8G generated in this study recognizes WNV, SLE and YFV. It thus represents a candidate for the development of flavivirus diagnostic assays. Henchal et al. (1982) developed antibodies that recognize flavivirus group-specific viruses, the four DENV serotypes, YFV, WNV, SLEV, Ntaya virus (NTA), Langat virus (LGT), Kunjin virus (Kun), Japanese encephalitis virus (JEV), Ilheus virus (ILH), Banzi virus (BAN) and Zika virus [29].

Additionally, dengue complex-specific (four DENV serotypes), subcomplex-specific (DENV-1, DENV-3) and serotype-specific mAbs were raised [29].

Serological diagnosis of flavivirus infections is difficult due to the extensive antigenic cross-reactivity among these viruses [58]. Well-characterized dengue-specific mAbs are thus powerful tools. To evaluate the applicability of mAbs to the development of immunoassays for dengue virus detection, dengue group-specific anti-E D1 695/12C/2H, anti-prM D1 606/A12/B9 and a flavivirus-specific anti-E D3 424/8G were used in an in-house IgM-capture assay. HRP-conjugated mAbs were successfully used in an anti-IgM capture immunoassay for dengue [59]. Additionally, serotype-specific mAbs (Table 1) could be valuable in an ELISA for serotyping dengue infections [60]. Furthermore, murine mAbs have also been used to detect DENV by immunohistochemistry [31], indicating another possible use for dengue mAbs conjugated to HRP. Finally, mAbs could also be labeled with other molecules such as fluorochromes or colloidal gold for routine dengue diagnosis in other formats.

In conclusion, twenty-two mAbs raised against Brazilian dengue virus isolates, including flavivirus cross-reactive, dengue-group specific, dengue subcomplex-specific and dengue serotype-specific mAbs, may be useful for the development of immunoassays such as ELISA, immunochromatographic assays, dot-blot assays and immunofluorescence assays [10,14,44]. To our knowledge, these are the first mAbs against dengue virus isolates circulating in Brazil to be developed and characterized. These mAbs thus have the potential to increase the specificity of dengue diagnosis in this region.

Supporting Information

Figure S1 Western blot analysis of DENV-2 mAbs reactivity against Domain III of E protein expressed in *E. coli*. Recombinant Domain III of E protein was subjected to 15% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Domain III (~12 kDa) were stained with the mAbs D2 332/2D, D2 658/9A and D2 646/9G, followed by anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase. A mouse polyclonal anti-DENV-2 serum was used as positive control. (TIF)

Figure S2 Monoclonal reactivities on immunofluorescence assay (IFA) against recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein expressed on *Drosophila* S2 cells. Indirect immunofluorescence of *Drosophila* S2 cells expressing or not (Mock) recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein with mAbs D3 388/4A/G6, D3 344/H1 and D3 63/F2/G7. Monoclonal antibody 4G2 and a non-correlated anti-hantavirus mAb (clone 572/7A) were used as positive and negative controls, respectively. Images were produced in a Leica AF6000 Modular System. Scale bars are 75 μ m. (TIF)

Table S1 Reactivity with recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein expressed on *Drosophila* S2 cells against twelve mAbs anti-DENV-3/E. (PDF)

Acknowledgments

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities (RPT07C, Microscopy Platform at the Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Brazil).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CZ GACAM JB CNDS. Performed the experiments: CZ GACAM JB. Analyzed the data: CZ

GACAM JB CNDS. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB CNDS. Contributed to the writing of the manuscript: CZ GACAM JB CNDS.

References

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496(7446): 504–507.
2. Guzman A, Istúriz RE (2010) Update on the global spread of dengue. *Intern J Antimicrob Agents* 36: S40–S42.
3. WHO (2014) Available: <http://www.who.int/topics/dengue/en/>. Accessed 2014 March 30.
4. Calisher CH (1988) Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virol* 32(5): 469–478.
5. Halstead SB (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476–481.
6. Pierson TC, Diamond MS (2013) Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*, 6th edition. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 747–794.
7. Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, et al. (2013) Current progress in dengue vaccines. *J Biomed Sci* 20(37): 2–9.
8. Singh KR, Paul SD (1969) Isolation of Dengue viruses in *Aedes albopictus* cells cultures. *Bull. World Health Organ* 40(6): 982–983.
9. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(3): 545–551.
10. Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C, Osterhaus AD (2000) Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(6): 867–871.
11. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, et al. (1989) An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40(4): 418–427.
12. Lam SK, Devine PL (1998) Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibody production during dengue infection. *Clin Diagn Virol* 10: 75–81.
13. Palmer CJ, King SD, Cuadrado RR, Perez E, Baum M, et al. (1999) Evaluation of the MRL Diagnostics dengue fever virus IgM ELISA and the PanBio rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue fever in Jamaica. *J Clin Microbiol* 37: 1600–1601.
14. Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanarooj S, Solomon T, Dung NM, et al. (1998) Evaluation of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 36: 234–238.
15. Wu SJ, Hanson B, Paxton H, Nisalak A, Vaughn DW, et al. (1997) Evaluation of a dipstick enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 452–457.
16. Vazquez S, Valdes O, Pupo M, Delgado I, Alvarez M, et al. (2003) MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* 110: 179–184.
17. Guzman MG, Kouri G (2004) Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis* 8: 69–80.
18. Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS, et al. (2005) Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437(7059): 764–769.
19. Kobayashi Y, Hasegawa H, Yamauchi T (1985) Studies on the antigenic structure of Japanese encephalitis virus using monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* 29(11): 1069–1082.
20. Mazzarotto GACA, Raboni SM, Stella V, Carstensen S, de Noronha L, et al. (2009) Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*. *J Virol Methods* 162: 96–100.
21. Chiang C-F, Lo MK, Rota PA, Spiropoulou CF, Rollin PE (2010) Use of monoclonal antibodies against Hendra and Nipah viruses in an antigen capture ELISA. *Virol J* 7: [115].
22. Lelli D, Moreno A, Broochi E, Sozzi E, Capucci L, et al. (2012) West Nile virus: characterization and diagnostic applications of monoclonal antibodies. *Virol J* 9: [81].
23. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, et al. (2000) Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* 53(3): 111–117.
24. Sukupolvi-Petty S, Brien JD, Austin SK, Shrestha B, Swayne S, et al. (2013) Functional Analysis of Antibodies against Dengue Virus Type 4 Reveals Strain-Dependent Epitope Exposure That Impacts Neutralization and Protection. *J Virol* 87(16): 8826–8842.
25. Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, Edeling MA, Johnson S, et al. (2012) Structural Basis of Differential Neutralization of DENV-1 Genotypes by an Antibody that Recognizes a Cryptic Epitope. *PLoS Pathogens* 8(10): e1002930.
26. Dittmar D, Haines HG, Castro A (1980) Monoclonal antibodies specific for dengue virus type 3. *J Clin Microbiol* 12(1): 74–78.
27. Romero-Vivas CM, Leake CJ, Falconar AK (1998) Determination of dengue virus serotypes in individual *Aedes aegypti* mosquitos in Colombia. *Med Vet Entomol* 12(3): 284–288.
28. Kang X, Li Y, Fan L, Lin F, Wei J, et al. (2012) Development of an ELISA-array for simultaneous detection of five encephalitis viruses. *Virol J* 9: [56].
29. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 31: 830–836.
30. Xu H, Biao Di, Yu-xian Pan, Li-wen Qiu, Ya-di Wang, et al. (2006) 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. *J Clin Microbiol* 44(8): 2872–2878.
31. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez A, Guzman M (2007) Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* 40: 50–54.
32. Qiu LW, Di B, Wen K, Wang XS, Liang WH, et al. (2009) Development of an Antigen Capture Immunoassay Based on Monoclonal Antibodies Specific for Dengue Virus Serotype 2 Nonstructural Protein 1 for Early and Rapid Identification of Dengue Virus Serotype 2 Infections. *Clin Vaccine Immunol* 16(1): 88–95.
33. Brien JD, Austin SK, Sukupolvi-Petty S, O'brien KM, Johnson S, et al. (2010) Genotype-specific neutralization and protection by antibodies against dengue virus type 3. *J Virol* 84(20): 10630–10643.
34. Shrestha B, Brien JD, Sukupolvi-Petty S, Austin SK, Edeling MA, et al. (2010) The Development of Therapeutic Antibodies That Neutralize Homologous and Heterologous Genotypes of Dengue Virus Type 1. *PLoS Pathog* 6(4): e1000823.
35. Trainor NB, Crill WD, Roberson JA, Chang GJ (2007) Mutation analysis of the fusion domain region of St. Louis encephalitis virus envelope protein. *Virology* 360(2): 398–406.
36. Desprès P, Frenkiel MP, Deubel (1993) Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology* 196: 209–219.
37. Post PR, Carvalho R, Freire MS, Galler R (2001) The early use of Yellow Fever virus strain 17D for vaccine production in Brazil – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(6): 849–857.
38. Mitchell CJ, Monath TP, Sabattini MS, Cropp CB, Daffner JF, et al. (1985) Arbovirus investigations in Argentina, 1977–1980. II. Arthropod collections and virus isolations from Argentine mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 34(5): 945–955.
39. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, Garcia JB, Vissani A, et al. (2006) West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis* 12(10): 1559–1561.
40. Berge TO, Banks IS, Tiggert WD (1961) Attenuation of Venezuelan equine encephalitis virus by in vitro cultivation in guinea-pig hearts cells. *Am J Epidemiol* 73(2): 209–218.
41. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
42. Wisdom GB (2005) Conjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase. In: Burns R, editor. *Methods in molecular biology immunochemical protocols*. 3 ed, Humana Press Inc., Totowa, NJ. 127–130.
43. Perrin P (1996) Techniques for the preparation of rabies conjugates. In: Meslin, FX; Kaplan, MM; Koprowski, H (Ed.). *Laboratory techniques in rabies* 4. ed. Geneva: World Health Organization. 433–444.
44. Takasaki T, Nawa M, Yamada KI, Harada M, Takeda A, et al. (2002) Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *J Virol Methods* 102: 61–66.
45. Brasil. Ministério de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Resultados preliminares da avaliação dos determinantes para ocorrência de óbitos por dengue em 2010. Available: www1.saude.ba.gov.br/entomologiahah/dengue/apres8.ppt. Accessed 2014 May 19.
46. Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G (2013) Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7(12): [e2520].
47. Cardiff RD, Russ SB, Brandt WE, Russell PK (1973) Cytological localization of dengue-2 antigens: an immunological study with ultrastructural correlation. *Infect Immunity* 7(5): 809–816.
48. Johnson AJ, Roehrig JT (1999) New mouse model for dengue virus vaccine testing. *J Virol* 73(1): 783–786.
49. Schul W, Liu W, Xu HY, Flamand M, Vasudevan SG (2007) A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. *J Infect Dis* 195(5): 664–674.
50. Huang KJ, Li SY, Chen SC, Liu HS, Lin YS, et al. (2000) Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice. *J Gen Virol* 81(Pt 9): 2177–2182.
51. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375: 291–298.

52. Rothman AL (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11(8): 532–543.
53. Mondotte JA, Lozach P-Y, Amara A, Gamarnik AV (2007) Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *J Virol* 81(13): 7136–7148.
54. Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura ER, Duquerroy S, et al. (2004) Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J* 23: 728–738.
55. Klein DE, Choi JL, Harrison SC (2013) Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *J Virol* 87(4): 2287–2293.
56. Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX (2006) Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *J Virol* 80(19): 9557–9568.
57. Chan AH, Tan HC, Chow AY, Lim AP, Lok SM, et al. (2012) A human prM antibody that recognizes a novel cryptic epitope on dengue E glycoprotein. *PLoS One* 7(4): e33451.
58. Kuroda JK, Yasui K (1986) Antigenic Comparison of Envelope Protein E between Japanese Encephalitis Virus and Some Other Flavivirus Using Monoclonal Antibodies. *J Gen Virol* 67: 2663–2672.
59. Chong CF, Hgoh BL, Tan HC, Yap EH, Singh M, et al. (1994) A shortened dengue IgM capture ELISA using simultaneous incubation of antigen and peroxidase-labeled monoclonal antibody. *Clin Diagn Virol* 1(5–6): 335–341.
60. Kuno G, Gluber DJ, Santiago de Weil NS (1985) Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. *J Virol Methods* 12(1–2): 93–103.

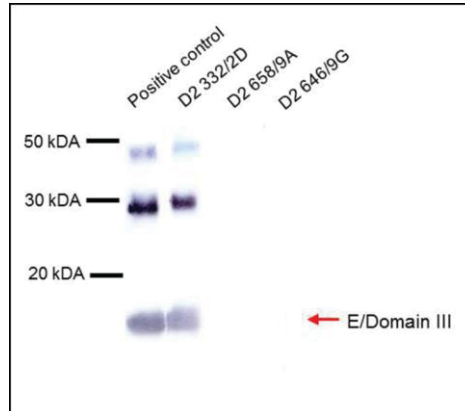


Figure S1. Western blot analysis of DENV-2 mAbs reactivity against Domain III of E protein expressed in *E. coli*. Recombinant Domain III of E protein was subjected to 15% SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Domain III (~12kDa) were stained with the mAbs D2 332/2D, D2 658/9A and D2 646/9G, followed by anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase. A mouse polyclonal anti-DENV-2 serum was used as positive control.

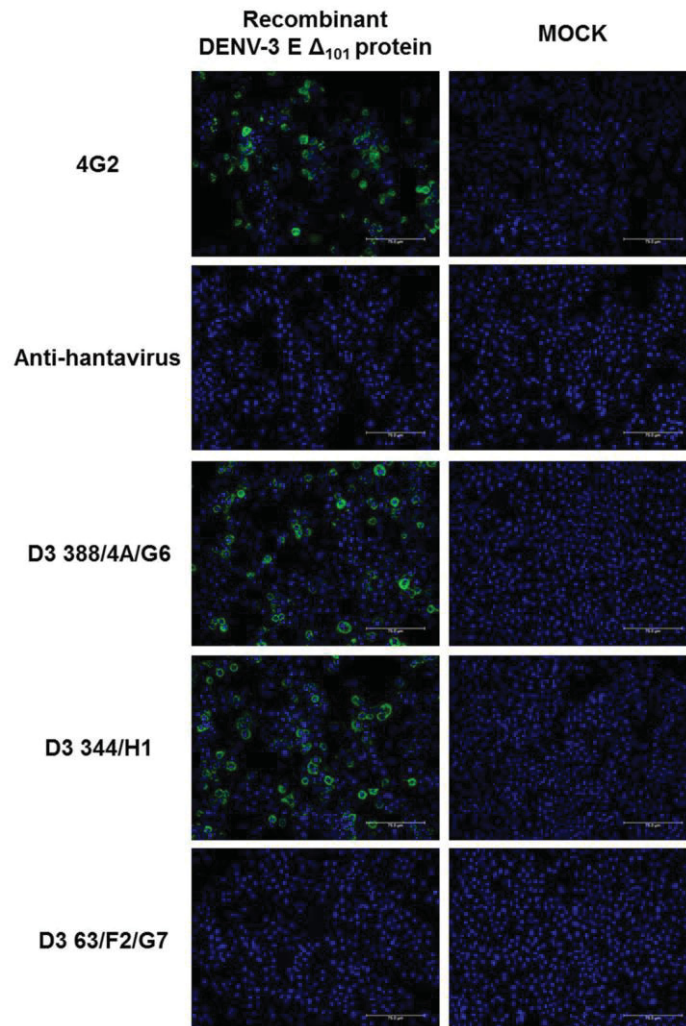


Figure S2. Monoclonal reactivities on immunofluorescence assay (IFA) against recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein expressed on *Drosophila* S2 cells. Indirect immunofluorescence of *Drosophila* S2 cells expressing or not (Mock) recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein with mAbs D3 388/4A/G6, D3 344/H1 and D3 63/F2/G7. Monoclonal antibody 4G2 and a non-correlated anti-hantavirus mAb (clone 572/7A) were used as positive and negative controls, respectively. Images were produced in a Leica AF6000 Modular System. Scale bars are 75 μ m.

Table S1. Reactivity with recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein expressed on *Drosophila* S2 cells against twelve mAbs anti-DENV-3/E.

mAb	Reactivity with recombinant DENV-3 E Δ_{101} protein
D3 342/5G/G8	+
D3 388/4A/G6	+
D3 444/4G/H3	+
D3 389/F4/H10	+
D3 441/D1/H2	+
D3 290/4C/G9	+
D3 341/H9/F10	+
D3 344/H1	+
D3 442/4E/G8	+
D3 242/F1/H2	+
D3 424/8G	+
D3 863/G7/H7	-
D3 457/H7/H2	-
D3 443/H12/H6	-
D3 868/G7/H10	-
D3 63/F2/G7	-