



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA NA AMAZÔNIA

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS VIROLÓGICO E SOROLÓGICO PARA A
INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA**

JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES

Belém-Pará

2023

JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS VIROLÓGICO E SOROLÓGICO PARA A
INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador (a): Profa. Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros

Belém-Pará

2023

JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS VIROLÓGICO E SOROLÓGICO PARA A
INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária na Amazônia, da Universidade do Estado do Pará/Instituto Evandro Chagas, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador (a): Profa. Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros
 Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Banca Examinadora: Profa. Dra. Andrea Nazaré Monteiro Rangel da Silva
 Instituto de Ciências Biológicas, UFPA
 Prof. Dr. Carlos Alberto Marques de Carvalho
 Departamento de Patologia, CCBS-UEPA
 Profa. Dra. Daniele Freitas Henriques
 Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC
 Profa. Dra. Raimunda do Socorro Silva Azevedo
 Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC
 Profa. Dra. Jannifer Oliveira Chiang (Suplente)
 Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, IEC

Belém, 12 de maio de 2023

DEDICATÓRIA

A Deus pelos presentes dados ao longo dessa trajetória
ao meu amado esposo Bruno, companheiro de vida pessoal e acadêmica,
a minha orientadora, Daniele, com quem eu divido a autoria desse trabalho,
meus pais, João Guilherme e Arlete, sobrinha Manuela, irmãos, Jane e Jarbas, meu
refúgio e porto seguro.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que me foram dadas;

À Fapespa pelo custeio da bolsa de estudos e garantia de dedicação integral ao projeto, durante parte da vivência do fomento;

À Capes e ao CNPq, fontes de financiamento para aquisição de insumos, equipamentos utilizados;

Ao PPGBPA/IEC pela oportunidade de educação e formação acadêmica, solicitude e parcimônia nas avaliações e decisões inerentes ao projeto, em especial, ao IEC, celeiro da ciência regional, nacional e internacional;

À UTMB, na figura do Dr. Pei Yong Shi e Dr. Chao Shan, pela parceria com a etapa do vírus *reporter* e por todo conhecimento compartilhado;

Ao HUIBB, a Rafaela pela paciência em esclarecer minhas dúvidas, Dra. Simone Conde, pela cordialidade e solicitude. À UDM, Gertrudes e Me. Aide pela receptividade e disponibilidade;

A querida Cristina Sanches, pela paciência e atenção dispensadas em colaborar com o desenvolvimento deste trabalho. Por toda solicitude tantas vezes o quanto foi preciso. Meu respeito e reconhecimento;

A querida Sylvania, funcionária exemplar, cuja postura colérica e lealdade a pós-graduação mantém a disciplina dos alunos, meu carinho e estima. Sentirei saudades;

A minha querida orientadora, Dra. Daniele Medeiros, mentora intelectual desse trabalho, pela sabedoria, sagacidade em conduzir e adaptar, diante de tantas dificuldades enfrentadas nessa pesquisa. Pela paciência de me aceitar, compreender minhas falhas, ausências e me pegar pela mão nos últimos sete anos. Meu respeito, carinho, admiração de uma aluna-irmã;

Ao meu amado esposo Bruno, faltam palavras para agradecer toda a contribuição dada a este trabalho. Suas explicações cercadas de domínio e segurança complementam sua maneira didática de ensinar. Quero dizer que ele representa a

mais bela expressão da dualidade entre inteligência e humildade. Finalmente, por dividir seus dias comigo, por todo amor, o singelo agradecimento da admiradora mais apaixonada;

A minha família, por administrar à distância as saudades e os choros que todo reencontro nos causa. Meus amados pais, João Guilherme e Arlete Guedes por todo amor, compreensão, sabedoria, educação, zelo, cuidado, suporte, meu amparo espiritual, um casal com sinônimo de fé e esperança. Meus amados irmãos, Jane Cristina e Jarbas, linda sobrinha Manuela, por todo amor e desejo de querer estar perto, pelo apoio e admiração. Aos meus cunhados, Keyla e Manoel, pelo carinho. Cheia de gratidão por vir desse berço e de dizer que os amo muito;

As minhas avós, Leopoldina (*in memoriam*) e Rosa (*in memoriam*), exemplos de mulheres de força e coragem;

À família que vida me deu, Severina Nunes (*in memoriam*), Maria do Socorro, Roberto Nunes, Barbara Nunes. A todos membros da família Nunes e da família Diniz. Meu respeito e carinho;

As adoráveis amigas, Nahide e Amada. Pelo carinho e apoio emocional nos momentos de estresse e de saudades da família;

À família Arbovírus, por abraçar e acolher a todos que chegam, e repassar parte do respeito e da magnitude que esta casa representa a ciência;

Aos funcionários da Sorologia I, Dra. Milene Ferreira (meu carinho especial), Dra. Jannifer Chiang, Me. Eder Barros, Me. Liliane Leal, Me. Franko de Arruda, Jamila Augusta, por vestirem a camisa do trabalho, dando agilidade e prioridade aos testes, meu profundo carinho e respeito. Vocês estarão no meu coração;

Aos funcionários da Sorologia II, Dra. Daniele Henriques, Me. Camille Ferreira, Me. Franko de Arruda, Me. Walter Felix pela realização dos testes, mesmo diante de uma demanda alta de trabalho, escassez de reagente e de força de trabalho. O meu afável agradecimento;

À Biologia Molecular, meus amigos de longa data, em especial a Dra. Ana Cecília, Dra. Daniele Medeiros, Dr. Bruno Nunes, Dr. Sandro Patroça, Dra. Alessandra

Miranda, Dra. Alice Queiroz, Me. Ivy Tshuya, Me. Daniela Guerreiro, Me. Ana Alice e Maria Natividade que me acolheram como integrante do grupo e toda ajuda dada ao trabalho, muito obrigada;

Às estimadas alunas de iniciação científica, Taís Reis e Victória Lima, pela confiança, responsabilidade, principalmente, pelo suporte valioso, desde cedo, dado ao trabalho. Tive sorte em tê-las como colegas de profissão, nessa trajetória acadêmica. Toda minha admiração, respeito e carinho;

Ao Me. João de Deus e, em especial à amada Dra. Marielle Quaresma, pela amizade, parcimônia e empatia com uma funcionária-estudante durante suas gestões. Minha gratidão;

Aos amigos e parceiros profissionais da ULAC, o estimado Dr. Mauro Sérgio, o querido Me. Gabriel Cabral, a amada Josiane do Socorro, Me. Chester Darlan, Sandra Reis, Dra. Marielle Quaresma, Me. Fátima Rendeiro, Me. Sérgio França, Vilma Severina, Me. Maria Sueli, Zenilde da Silva, Aldir Pereira, Me. Hellen Souza, Kátia Lopes, Me. Heliomar Borralho que me ensinaram a respeitar a nobreza de um LCR. Muito obrigada por todo aprendizado, pela força, torcida e suporte despendido;

Aos colegas da ULAC e do Hemopa, pela torcida e apoio as minhas escolhas;

Ao Prof. Dr. Pedro Vasconcelos, Profa. Daniele Medeiros, Prof. Rommel Burbano, Dra. Socorro Azevedo, Dra. Daniele Henriques, Dra. Livia Casseb, Dr. Bruno Nunes, Dra. Jannifer Chiang, Dra. Livia Carício, Dra. Eliana Pinto, Dra. Maria Helena, Profa. Andrea Rangel, Prof. Carlos Marques, grandes mestres. Obrigada pela generosidade em ensinar e lapidar esse trabalho ao longo dessa caminhada. Foi uma grande honra;

Aos pacientes, participantes da pesquisa, que padeceram por sintomas de arbovírus ou outros comprometimentos, o meu respeitoso, muito obrigada;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1.	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1.2.	GENERALIDADE SOBRE FLAVIVÍRUS	19
1.2.1.	Taxonomia e Filogenia	19
1.2.2.	Morfologia e Ciclo Replicativo.....	21
1.2.3.	Manifestações clínicas e Imunopatogênese	23
1.2.4.	Infecção por flavivírus no sistema nervoso	25
1.2.5.	Flavivírus Neurotrópicos	27
1.2.5.1.	Vírus Dengue (<i>Orthoflavivirus denguei</i>).....	27
1.2.5.2.	Vírus Zika (<i>Orthoflavivirus zikaense</i>)	29
1.2.5.3.	Vírus do Nilo Ocidental (<i>Orthoflavivirus nilense</i>)	30
1.2.5.4.	Vírus da Encefalite de Saint Louis (<i>Orthoflavivirus louisense</i>).....	32
1.2.5.5.	Vírus Ilhéus (<i>Orthoflavivirus ilheusense</i>)	33
1.2.5.6.	Vírus Rocio	34
1.2.5.7.	Vírus da encefalite japonesa (<i>Orthoflavivirus japonicum</i>) e Vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (<i>Orthoflavivirus encephalitidis</i>)	34
1.2.6.	Epidemiologia das doenças neuroinvasivas por flavivírus no Brasil	35
1.2.7.	Diagnóstico laboratorial de flavivírus.....	37
1.2.8.	Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico de flavivírus	39
1.3.	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇA NERUROINVASIVA A PARTIR DE LCR.....	41
1.3.1.	Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	41

1.3.2. Critérios laboratoriais para avaliação do LCR	44
1.4. CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇA NEUROINVASIVA	46
1.5. JUSTIFICATIVA.....	47
2. OBJETIVOS	50
2.1. OBJETIVO GERAL.....	50
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. DESENHO DO ESTUDO.....	51
3.2. AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS	54
3.2.1. Padronização Protocolos RT-qPCR – Duplex WNV/SLEV e Quadriplex ILHV/ROCV/TBEV/JEV	54
3.2.1.1. Desenho de iniciadores e sondas.....	54
3.2.1.2. Extração de RNA.....	56
3.2.1.3. Produção e clonagem dos padrões de RNA sintético.....	56
3.2.1.4. Quantificação dos estoques virais por RT-qPCR.....	58
3.2.1.5. Reações de RT-qPCR	58
3.2.1.6. Otimização das condições ideais de reação.....	59
3.2.1.7. Especificidade Analítica.....	60
3.2.1.8. Sensibilidade Analítica.....	61
3.2.1.9. Acurácia Diagnóstica	61
3.3. AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO IMUNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS	62
3.3.1. Teste de Neutralização por Redução de Placas convencional – PRNT⁹⁰	62

3.3.2. Teste de Neutralização por Redução de Placas com Vírus Reporter (RVNT⁹⁰) – Plataforma CitationTM 5.0 BioTek.....	63
3.3.2.1. ZIKV Rluc e DENV2 Rluc	63
3.3.2.2. ZIKV mCherry	63
3.3.3. Teste de Neutralização por Redução de Placas com Vírus Reporter (RVNT⁹⁰) - Plataforma Glomax[®] Promega.....	64
3.3.3.1. Recuperação do Plasmídeo	64
3.3.3.2. Preparação do estoque vírus <i>reporter</i>	66
3.3.3.3. Qualidade do vírus <i>reporter</i>	67
3.3.3.4. Execução do RVNT ⁹⁰	688
3.4. DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS EM LCR	69
3.4.1. Análise física, bioquímica, citológica e microbiológica em LCR	69
3.4.2. Extração do RNA viral	70
3.4.3. Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (RT- qPCR).....	71
3.4.4. Teste de Inibição da Hemaglutinação (IH).....	71
3.4.5. Imunoensaio enzimático (ELISA)	72
3.5. ASPECTOS ÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DO PROTOCOLO IMUNOLÓGICO.....	722
3.6. ASPECTOS ÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS O INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS NEUROINVASIVAS NO ESTADO DO PARÁ EM LCR.....	733
3.6.1. Perfil das amostras.....	74
3.6.2. Critério de inclusão de amostras	74
3.6.3. Critério de exclusão de amostras	75

3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	755
4.	RESULTADOS.....	77
4.1.	RT-qPCR <i>DUPLEX</i> DE WNV/SLEV E <i>QUADRIPLEX</i> DE ILHV/ROCV/JEV/TBEV	77
4.1.1.	Desenho de iniciadores e sondas	77
4.1.2.	Produção e clonagem dos padrões de RNA sintético.....	82
4.1.3.	Otimização das condições ideais de reação	85
4.1.4.	Especificidade e Sensibilidade Analítica.....	90
4.1.5.	Acurácia Diagnóstica	91
4.2.	AVALIAÇÃO DO RVNT ⁹⁰ : PLATAFORMA CYTATION™ 5.0 BIOTEK.....	95
4.3.	PLATAFORMA GLOMAX® PROMEGA	100
4.4.	INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA.....	109
5.	DISCUSSÃO	117
6.	CONCLUSÃO.....	139
7.	REFERÊNCIAS.....	141
8.	ANEXO 1	183
9.	ANEXO 2.....	192

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gênero <i>Flavivirus</i> construída a partir da sequência completa de aminoácidos da poliproteína dos flavivírus listados. Dentro do <i>cluster</i> de vírus transmitidos por mosquitos observam-se nove clados.....	20
Figura 2 – Organização e estrutura dos flavivírus.....	21
Figura 3 - Ciclo de transmissão de WNV.....	31
Figura 4 - Marcos temporais e laboratórios de referência regional para o diagnóstico das manifestações neurológicas por flavivírus no Brasil.....	36
Figura 5 - Mecanismos envolvidos com a produção e composição de LCR no plexo coróide.....	43
Figura 6 - Fluxo da rotina diagnóstica de LCR	53
Figura 7 - Alinhamento das sequências de SLEV utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas.	78
Figura 8 - Alinhamento das sequências de JEV utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas.	81
Figura 9 - Mapa do plasmídeo utilizado para produção dos clones dos vírus WNV, TBEV e JEV.....	83
Figura 10 - Mapa do plasmídeo utilizado para produção dos clones do vírus SLEV.	84
Figura 11 - Placa de transformação das bactérias quimiocompetentes transformadas com os plasmídeos contendo as sequências dos vírus.....	85
Figura 12 - Gráfico de amplificação do teste de avaliação da matriz de concentração de iniciadores e sonda de SLEV.....	86
Figura 13 - Gráfico de amplificação da curva padrão dos vírus WNV e SLEV comparando os valores de Cts obtidos no formato <i>singleplex</i> e <i>duplex</i>	88
Figura 14 - Curvas padrão dos vírus WNV e SLEV nos formatos <i>singleplex</i> e <i>duplex</i> , mostrando os indicadores de performance de reação.....	89

Figura 15 - Comparação entre os títulos de anticorpos neutralizantes. (A) Títulos de anticorpos no RVNT ⁹⁰ DENV Rluc <i>versus</i> PRNT ⁹⁰ ; (B) RVNT ⁹⁰ ZIKV Rluc e mCherry <i>versus</i> PRNT ⁹⁰	98
Figura 16 - Comparação entre curvas ROC de desempenho dos ensaios RVNT ⁹⁰ DENV e ZIKV entre PRNT ⁹⁰ convencional.....	100
Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão enzimática de DENV Rluc e ZIKV Rluc.	101
Figura 18 – Detecção da sequência genética de DENV e ZIKV por RT-qPCR.....	102
Figura 19 – Confirmação da sequência de DENV Rluc e ZIKV Rluc por sequenciamento de nova geração.....	103
Figura 20 - Efeito citopático após infecção do vírus <i>reporter</i>	104
Figura 21 - Titulação de vírus <i>reporter</i> em unidade formadora de placa.....	104
Figura 22 - Amplificação de DENV Rluc e ZIKV Rluc por RT-qPCR.....	105
Figura 23 - IFI de células VERO transfectadas com RNA viral.....	106
Figura 24 - Valores de luminescência de (A) DENV Rluc e (B) ZIKV após transfecção em células VERO.....	107
Figura 25 - Centros Regionais de Saúde do estado Pará.....	110
Figura 26 - Padrões de LCRs e títulos de anticorpos anti-flavivírus no IH.....	113
Figura 27 – Análise física, química, citológica de LCR com anticorpos anti-flavivírus no IH.....	114

QUADROS

Quadro 1 - Manejo laboratorial das amostras colhidas com suspeita de doença neuroinvasiva.....	39
Quadro 2 - Técnicas e alvos virais testados utilizados no <i>screening</i>	52

Quadro 3 - Características dos iniciadores e sondas utilizados no desenvolvimento dos novos protocolos de RT-qPCR para flavivírus neuroinvasivos.....	55
Quadro 4 - Matriz de concentrações em nanomol de iniciadores e sondas.....	59
Quadro 5 - Vírus testados no painel de especificidade.....	60
Quadro 6 - Quadro com as concentrações testadas de iniciadores e sondas e os valores de Ct obtidos.....	87
Quadro 7 - Avaliação do limite de detecção do protocolo <i>duplex</i> WNV/SLEV.....	90
Quadro 8 - Resultados obtidos no painel de amostras positivas para WNV e SLEV.....	93
Quadro 9 - Comparação entre tempo de doença e ensaios de neutralização.....	96
Quadro 10 - Valores de Ct de DENV e ZIKV RLuc em diferentes dpt.....	105
Quadro 11 - Comparação entre os resultados dos ensaios de neutralização.....	108
Quadro 12 - Detecção de anticorpos anti-flavivírus no IH no LCR e soro.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SÍMBOLOS

CO₂: Dióxido de carbono

Ct: Cycle threshold

C: Proteína do Capsídeo

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DENV: *Orthoflavivirus denguei*

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

E: Proteína do Envelope

ECP: Efeito Citopático

FDL: faixa dinâmica linear

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

ILHV: *Orthoflavivirus ilheusense*

JEV: *Orthoflavivirus japonicum*

LCR: líquido cefalorraquidiano

LD: limite de detecção

M: Proteína de membrana

ELISA IgM: antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay

mCherry: Proteína fluorescente vermelha

NS: Proteína Viral Não-Estrutural

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato

PFU: Unidade Formadora de Placa

pH: Potencial hidrogeniônico

prM: Proteína precursora de Membrana

PRNT⁹⁰: Teste de Neutralização de Redução de Placas em noventa por cento

OD: densidade ótica

ORF: Matriz de leitura aberta

ROCV: vírus Rocio

Rluc: Renilla luciferase (Bioluminescente verde)

RNA: Ácido ribonucleico

RT-qPCR: *Real Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

RVNT⁹⁰: Testes de Neutralização utilizando Vírus Reporter em noventa por cento

SLEV: *Orthoflavivirus louisense*

VERO: Linhagem foi isolada de células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano

TBEV: *Orthoflavivirus encephalitidis*

5' UTR: Região 5' não-codificadora

WNV: *Orthoflavivirus nilense*

YFV: *Orthoflavivirus flavi*

YFV 17D: *Orthoflavivirus flavi* 17D, vírus da febre amarela 17D (cepa vacinal)

ZIKV: *Orthoflavivirus zikaense*

RESUMO

As últimas décadas foram marcadas por grandes epidemias causadas por flavivírus, associados a casos assintomáticos e oligossintomáticos até graves, com comprometimento do sistema nervoso. Ainda assim, o diagnóstico das doenças neuroinvasivas continua desafiador, pela dificuldade em detectar o agente viral ou anticorpos específicos. Dessa maneira, o objetivo desse trabalho foi padronizar protocolos virológicos e sorológico para a investigação de flavivírus em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), visando aumentar a sensibilidade do diagnóstico de doença neuroinvasiva (DNI). Para isso, foram padronizados protocolos de RT-qPCR, sendo um *duplex* de vírus do Nilo Ocidental (WNV) e vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), e outro *quadriplex* de vírus Ilheus (ILHV), vírus Rocio (ROCV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV) e vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos (TBEV); bem como foi realizado a avaliação de desempenho de Teste de Neutralização utilizando vírus *Reporter* (RVNT⁹⁰) para os vírus Dengue (DENV) e vírus Zika (ZIKV), nas plataformas Cytation™ 5.0 BioTek® e GloMax® Promega, utilizando amostras de soro com diagnóstico prévio que apresentavam padrão de resposta imune secundária para flavivírus. Outrossim, amostras de LCRs coletadas no hospital de referência para o diagnóstico de meningites no estado do Pará (HUJBB/UFGA/EBSEH), foram submetidas a análises bioquímicas e citológicas, e, aqueles que apresentaram resultados negativos para infecção bacteriana e fúngica, foram enviados para a SAARB/IEC/SVSA/MS e submetidos a técnicas de RT-qPCR, Inibição da Hemaglutinação (IH) e ELISA para captura de IgM para o diagnóstico de flavivírus. Soros também foram analisados. Quanto à padronização do protocolo *duplex* de RT-qPCR de WNV/SLEV, este apresentou ótimo desempenho com: LD = 2,8 cópias/μL (WNV) / 12,4 cópias/μL (SLEV); LQ = 10² cópias/μL (ambos); EF% = 97,3% (WNV)/ 97,9% (SLEV); e Esp Analítica = 100% para o painel de flavivírus. O *quadriplex* para ILHV/ROCV/TBEV/JEV apresentou avaliação *in silico* satisfatória e Esp Analítica = 100% para o painel de flavivírus, porém seu desempenho precisa ainda ser calculado. O RVNT⁹⁰ utilizando a plataforma Cytation™ 5.0 apresentou desempenho superior ao PRNT⁹⁰ convencional, entretanto, aquele não foi capaz de diferenciar as infecções causadas por ZIKV e DENV. Na avaliação da plataforma GloMax®, embora tenha conseguido captar luminescência produzida após transfeção de RNA viral de DENV e ZIKV Rluc, ele não foi capaz de manter captação, durante a execução do RVNT⁹⁰ de DENV e ZIKV Rluc. Quanto à investigação de flavivírus em amostras de LCR (n=85), não foram detectados os genomas dos flavivírus WNV/SLEV e ILHV/ROCV/TBEV/JEV. Nove LCRs apresentam detecção de anticorpos hemaglutinantes anti-flavivírus, porém o ELISA IgM não foi reagente. Por fim, este trabalho contribuiu com a avaliação de dois protocolos moleculares (RT-qPCR) para o diagnóstico de flavivírus em casos de DNI; muito embora o RVNT⁹⁰ tenha melhor desempenho do que as técnicas sorológicas convencionais, não foi eficiente para solucionar a questão das reações cruzadas entre os flavivírus; além disso, observou-se um baixo percentual de positividade para flavivírus na investigação de DNI entre as amostras analisadas.

Palavras-chave: *Flavivirus*; líquido cefalorraquidiano; diagnóstico molecular; diagnóstico sorológico

ABSTRACT

The last decades have witnessed large flaviviruses epidemics, with cases ranging from asymptomatic, oligosymptomatic to severe, with impairment of the nervous system. Even so, diagnosing neuroinvasive diseases remains a challenge, given the difficulty in detecting either the viral agent or specific antibodies. Thus, this study aims to develop new virological and immunological protocols for the diagnostics and investigation of neuroinvasive diseases caused by flaviviruses with increased sensitivity. For this, two new real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR) protocols were developed. One is a duplex protocol for West Nile virus (WNV) and Saint Louis virus (SLEV), and the other is a quadruplex protocol for the detection of Ilheus virus (ILHV), Rocio virus (ROCV), Japanese encephalitis virus (JEV) and Tick-borne encephalitis virus (TBEV). In addition, a new Reporter Virus Neutralization Test (RVNT) protocol for the detection of DENV and ZIKV antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) was developed, using Cytation™ 5.0 (BioTek®) and GloMax® (Promega) detection platforms. Furthermore, CSF and serum samples diagnosed in a reference hospital for meningitis diagnostics from Pará state (HUJBB/UFPA/EBSERH) were submitted to RT-qPCR, HI, ELISA assays for flavivirus diagnosis in SAARB/IEC/SVSA/MS. Those samples were previously submitted to biochemical and cytological analysis and presented negative results for bacterial and fungal infection. The WNV/SLEV duplex RT-qPCR protocol showed good diagnostic performance with LoD of 2,8 copies/μL (WNV)/ 12,4 copies/μL (SLEV); LoQ of 102 copies/μL (both); reaction efficiency of 97,3% (WNV) / 97,9% (SLEV) and analytical specificity of 100% using a flavivirus panel. As for the ILHV/ROCV/TBEV/JEV *quadruplex* RT-qPCR protocol, it showed good specificity in silico and 100% specificity with the flavivirus panel but its application in a diagnostic setting still needs to be better evaluated. The RVNT⁹⁰ evaluated in Cytation™ 5.0 showed sensitivity, specificity, and performance superior to the conventional PRNT⁹⁰. However, RVNT⁹⁰ showed difficulty in differentiating antibody titers produced between ZIKV and DENV infections. As for the evaluation of the RVNT⁹⁰ in the GloMax® platform, although it was able to capture luminescence produced after transfection of DENV and ZIKV Rluc viral RNA, it was not able to reliably sustain luminescence detection throughout the RVNT⁹⁰ procedure. Moving on to the CSF (n=85) screening tests, there was no genome detection of WNV/SLEV or IHLV/ROCV/TBEV/JEV by RT-qPCR. Nine CSF samples presented anti-flavivirus antibodies by HI albeit with no IgM-ELISA reaction. Finally, this work contributed to the evaluation of two molecular protocols (RT-qPCR) for the diagnosis of flaviviruses in cases of NID. Although RVNT⁹⁰ performed better than conventional serological techniques, it was not efficient in solving the issue of cross-reactions between flaviviruses. In Pará, a low percentage of positivity for flavivirus was observed in the investigation of DNI.

Keywords: Flavivirus; cerebrospinal fluid; molecular diagnosis; serological diagnosis

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As doenças emergentes e reemergentes transmitidas por vetores representam um importante problema de saúde pública em países tropicais e subtropicais (WHO, 2020; Araújo et al., 2021; Chala & Hamde, 2021; Yu & Cheng, 2022; WHO, 2022). Juntas, elas são responsáveis por 17% das doenças transmissíveis em todo o mundo, resultando em cerca de 700.000 mortes (WHO, 2020).

Os mosquitos, moscas, triatomíneos, flebotomíneos, carrapatos, ácaros, caramujos e piolhos são conhecidos como vetores de vírus, bactérias e parasitas ao homem (WHO, 2020; Backer et al., 2021; Chala & Hamde, 2021; Mubemba et al., 2022). Os vírus transmitidos por mosquitos destacam-se por causarem grandes epidemias urbanas. Estima-se que o vírus Dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV) - principais membros do gênero *Flavivirus* - infectam, anualmente, mais de 96 milhões de pessoas (Ali et al., 2017; Araújo et al., 2021).

No Brasil, essas epidemias podem ser justificadas pelas condições ambientais e sociais encontradas, que garantem a transmissão vetorial e manutenção desses arbovírus (Lima-Camara, 2016; Possas et al., 2017; Medeiros & Vasconcelos, 2019). A diversidade biológica de artrópodes hematófagos e de hospedeiros vertebrados suscetíveis, especialmente, devido à exploração do potencial econômico associado às ações antrópicas, como urbanização acelerada e desmatamento em regiões de floresta, acompanhada da falta de saneamento básico e abastecimento irregular de água, estão em destaque nessa problemática (Lima-Camara, 2016; Medeiros & Vasconcelos, 2019; Viglieta et al., 2021; Yu & Cheng, 2022).

Embora menos incidentes, o vírus Oropouche (OROV), o vírus da Encefalite Saint Louis (SLEV), o vírus Rocio (ROCV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e o vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV) são arbovírus com potencial de causar surtos, incluindo de infecções que comprometem o sistema nervoso de humanos (Lima-Camara, 2016; Mubemba et al., 2022). Os relatos envolvem meningite asséptica, encefalite, meningoencefalite, mielite transversa aguda, encefalomielite e polirradiculoneurite (síndrome de Guillain-

Barré), além de paralisia flácida aguda e de nervos cranianos (WHO, 2016; Vieira et al., 2017; Lyons, 2018; Vieira et al., 2018; Brasil, 2020).

Quando comparada à atenção voltada aos arbovírus, a rede de vigilância epidemiológica das suspeitas clínicas de doença neuroinvasiva por enterovírus, HIV, herpes vírus, varicela-zóster e citomegalovírus parece ser mais bem estabelecida (São Paulo, 2006; Brasil, 2019; Vieira, 2020; Tavakolian et al., 2021). Segundo Mello et al. (2021), cerca de 8,03% dos casos suspeitos de doença neuroinvasiva por DENV, ZIKV e CHIKV são diagnosticados.

De modo geral, os sinais e sintomas variam de cefaleia, fotofobia, febre, rigidez de nuca, náuseas, vômitos e irritabilidade a alteração da marcha e de nível de consciência. Tais manifestações clínicas podem desaparecer espontaneamente ou trazer sequelas neurológicas diversas, com comprometimento de força muscular, de movimento de membros inferiores e de equilíbrio do paciente, trazendo implicações econômicas e sociais ao indivíduo e ao grupo familiar dos acometidos (Vieira, 2020; Clé et al., 2020b).

O acesso ao tratamento e ao diagnóstico precoce podem minimizar o impacto ou, até o desfecho dos casos graves. Todavia, o diagnóstico das doenças neuroinvasivas (DNI) por arbovírus é ladeado de obstáculos, sobretudo no que tange às características do tipo amostral utilizado para o diagnóstico: o LCR (Vieira et al., 2018). É comum, nas infecções por flavivírus, observarem baixos títulos de anticorpos e carga viral reduzida no LCR, além do desafio de equilibrar o volume da amostra disponibilizada com o leque de técnicas necessárias para o diagnóstico de vírus, bactérias e fungos causadores das DNI. Não obstante, a fim de aperfeiçoar esse diagnóstico, os ensaios existentes necessitam ser adaptados, bem como novos protocolos moleculares e sorológicos necessitam ser desenvolvidos, visando ao aumento de sensibilidade/especificidade, emprego de múltiplos alvos (Santiago et al., 2018), redução do tempo de execução e otimização de recursos empregados nos testes que devem ser priorizados (Shan et al., 2017a; Shan et al., 2017b).

1.2. GENERALIDADE SOBRE FLAVIVÍRUS

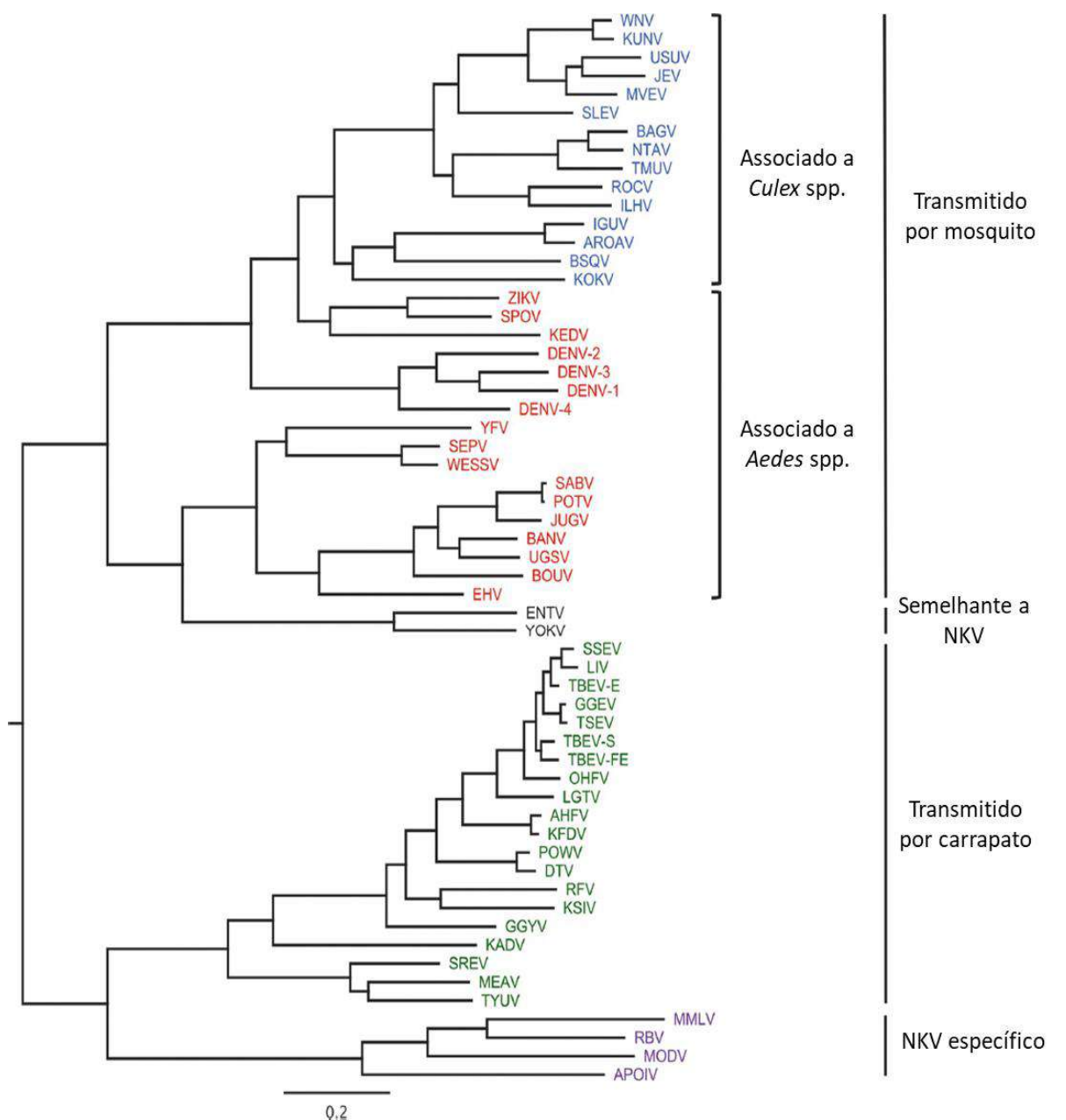
1.2.1. Taxonomia e Filogenia

O termo arbovírus tem origem da expressão *arthropod-borne virus*, que significa “vírus transmitidos por artrópodes” (Gubler et al., 2001; Go et al., 2014). Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos que envolvem hospedeiros vertebrados e vetores primários que podem ser carrapatos, flebotomíneos e mosquitos. Antes de serem veiculados por artrópodes hematófagos a seres humanos e não humanos, os arbovírus possuem parte do ciclo replicativo concluído nos insetos (Go et al., 2014; Lopes et al., 2014). Os arbovírus são classificados dentro de cinco famílias virais: *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* (Karabatsos 1985; Gubler et al., 2001).

Os flavivírus pertencem à família *Flaviviridae*. Além do gênero *Flavivirus*, a família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*. O termo “flavi” vem do latim “*flavus*”, que significa amarelo, em referência ao protótipo da família: o vírus da Febre Amarela (YFV) (Stapleton et al., 2011).

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 50 espécies, dentre as quais, destacam-se, quanto à sua importância em saúde pública, DENV, ZIKV, YFV, WNV, vírus da Encefalite Japonesa (JEV), SLEV, ROCV, vírus Ilheus (ILHV) e vírus da Encefalite Transmitida por Carrapatos (TBEV) (Lindenbach et al., 2003). Filogeneticamente, o gênero *Flavivirus* organiza-se em uma árvore monofilética, com dois ramos maiores emergindo a partir de um ancestral comum. Um ramo contém vírus não transmitidos por vetor e, o outro, vírus transmitidos por vetor. Deste último ramo, emergiram dois *clusters*, um de vírus transmitidos por mosquitos e outro de vírus transmitidos por carrapatos (Kuno et al., 1998; Lanciotti et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gênero *Flavivirus* construída a partir da sequência completa de aminoácidos da poliproteína dos flavivírus listados. Dentro do *cluster* de vírus transmitidos por mosquitos, observam-se nove clados.

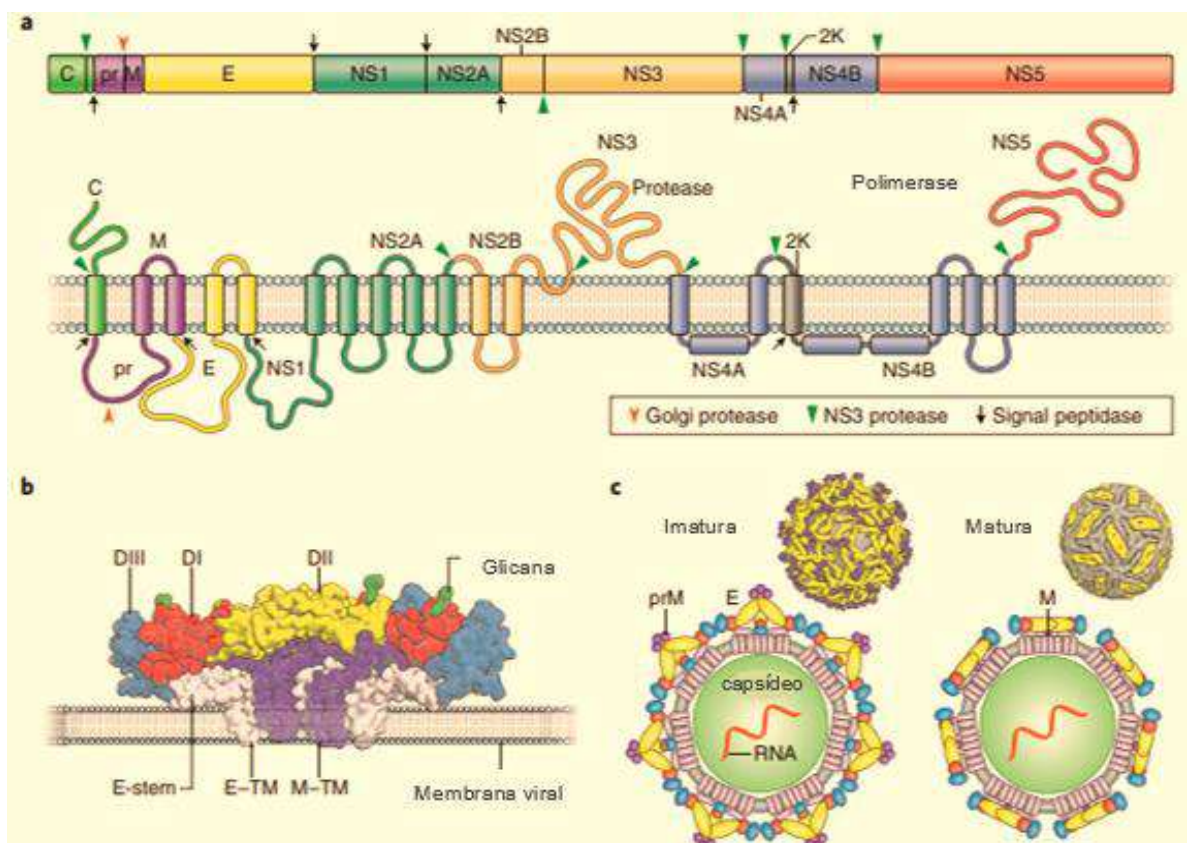


Legenda: NKV: Flavivírus sem vetores conhecidos. Fonte: Adaptado de Howley et al., 2020.

1.2.2. Morfologia e Ciclo Replicativo

Quanto às características morfológicas, os flavivírus são vírus envelopados, apresentando nucleocapsídeo icosaédrico que protege o genoma de RNA de fita simples de sentidopositivo (+ssRNA), com, aproximadamente, 11 kb de comprimento. O genoma viral é linear codifica três proteínas estruturais, proteína do capsídeo (C), pré-proteína de membrana (prM) e proteína de envelope (E) e sete não estruturais proteínas (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Rice et al., 1985; Gubler et al., 2007; Neufeldt et al., 2018, Cordero-Rivera et al., 2021) (Figura 2). O nucleocapsídeo é formado pela associação entre as proteínas C e o genoma viral, e está inserido no interior de uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, onde estão dispostos dímeros da proteína E, e cópias da proteína prM. A prM compõe a partícula viral imatura, enquanto, que a proteína M, integra a partícula viral madura após a liberação da célula (Lindenbach et al., 2003) (Figura 2).

Figura 2 - Organização e estrutura do genoma dos flavivírus.



Fonte: Adaptado de Pierson & Diamond, 2020.

O ciclo infeccioso envolve etapas de ligação e entrada do vírus na célula, seguidas de tradução, replicação, montagem e liberação que garantem a geração de novos vírus (Fishburn et al., 2022). O vírion é internalizado por endocitose após a ligação da proteína E a receptores, por heparana-sulfato inespecífico (Chen et al., 1997; Germi et al., 2002; Fishburn et al., 2022), incluindo lectinas do tipo C (Miller et al., 2008), DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) da célula hospedeira (Pereira et al., 2019; Carbaugh & Lazear, 2020). No endossomo, em um ambiente levemente ácido, a membrana endossomal se funde ao envelope viral liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, em uma reação também guiada pela proteína E. O RNA viral é, então, traduzido em uma poliproteína pela maquinaria de tradução da célula hospedeira e inserida na membrana do retículo endoplasmático (Morita et al., 2021; Fishburn et al., 2022).

A poliproteína é, posteriormente, clivada por proteases do hospedeiro e proteases virais para gerar as três proteínas estruturais e as sete proteínas não estruturais supracitadas. Essas proteínas não estruturais formam o complexo de replicação viral. Após a replicação viral inicial, as proteínas virais auxiliam na geração de organelas de replicação em vesículas associadas ao retículo endoplasmático, protegendo os vírions imaturos do citosol (Knyazhanskaya et al., 2021; Morita et al., 2021).

O +ssRNA será replicado a partir de um intermediário de polaridade negativa, e transportado para o sítio de montagem de novos nucleocapsídios em uma vesícula de invaginação no retículo endoplasmático (RE). A proteína C se acumula e complexa em gotículas lipídicas, e esse complexo, é então recrutado, para tal vesícula juntamente com o +ssRNA (Fishburn et al., 2022). Logo, os heterodímeros de prM e E são recrutados e trimerizados na membrana, formando um vírion imaturo (Hasan et al., 2018; Carbaugh et al., 2020). Os vírions se acumulam nas cisternas do RE antes do transporte para maturação, através da via secretora do hospedeiro dependente de *GBF1* (fator 1 de brefeldina A do complexo Golgi) ou através da autofagia secretora, e são, então, transportados para o complexo de Golgi (CG) e liberados por exocitose (Ferlin et al., 2018).

As partículas seguem no tráfico de vesículas no CG, onde sofrem maturação em duas etapas: primeiro, mudanças conformacionais irreversíveis nas proteínas E e

prM são desencadeadas pelo pH baixo da rede trans-Golgi. Essa mudança conformacional então expõe o sítio de clivagem da proteína prM que é então clivada por furina dando origem a proteína M. As partículas maduras são então secretadas na superfície da célula via rota de secreção celular (Mukhopadhyay et al., 2005). Finalmente, os vírions livres são liberados em membranas derivadas de autofagossomos e do conteúdo lipídico, como de ésteres de colesterol, derivado da bicamada da membrana celular do hospedeiro (Echavarría-Consuegra et al., 2019; van Leur et al., 2021).

1.2.3. Manifestações clínicas e imunopatogênese

Mesmo que a maioria dos casos de infecções por flavivírus sejam assintomáticos, os sintomáticos variam de apresentações leves, que incluem febre, cefaleia, exantema, artralgia, mialgia e dor retro orbital, a sintomas moderados e graves. As manifestações clínicas graves típicas podem se apresentar categorizadas em febre hemorrágica, com aumento da permeabilidade e extravasamento vascular, e complicações neurológicas (Van Leur et al., 2021).

A replicação de vírus induz, primeiramente, a resposta imune inata, com produção de interferon e outras citocinas que irão induzir a resposta imune adaptativa (Seth et al., 2006; Van Leur et al., 2021). A célula hospedeira apresenta receptores de reconhecimento padrão (PRRs) distribuídos nos compartimentos endossomais e no citoplasma, que são capazes de detectar e responder ao +ssRNA e a células infectadas por flavivírus. Três classes de PRRs participam nesse processo de detecção: receptor *toll-like* (TLR), gene induzível por ácido retinoico I (RIG-I) e sintase GMP-AMP cíclica (cGAS). Os PRRs ativam, ainda, as cascatas de sinalização de proteínas que regulam a síntese e a secreção de interferons (IFN) do tipo I (Echavarría-Consuegra et al., 2019).

Notadamente, os IFN-I ocupam um papel importante na resposta antiviral a flavivírus (García-Sastre, 2017). O tratamento com IFN-I pode inibir a infecção por DENV e por ZIKV. Entretanto, esses vírus desenvolveram estratégias para superar as barreiras imunológicas do indivíduo e estabelecer a infecção. A inibição do sinal

de IFN-I se dar através do bloqueio de NS4B a IRF3 (fator regulador de interferon 3) e da proteína serina-treonina-quinase ligadora de TANK 1 (TBK1) (Muñoz-Jordán et al., 2005; Dalrymple et al., 2015; Pan et al., 2022), enquanto, que a NS5 se liga e degrada STAT2 através da via do proteassoma (Ashour et al., 2009; Bowen et al., 2017; Parisien et al., 2022). NS1 tanto pode inibir IFN- α em resposta mediada por CD303 (Bos et al., 2020) como inibir a ativação de IFN- β mediada pela via RIG-I, em infecção por ZIKV (Xia et al., 2018).

Quanto à resposta celular a partir da infecção natural ou por imunização por vacina de DENV, NS3, NS5 e NS4B estimulam, preferencialmente, resposta pelas células T CD8⁺, enquanto proteínas estruturais e NS1 estimulam resposta T CD4⁺ (Duangchinda et al., 2010; Weiskopf et al., 2015; Van Leur et al., 2021). A produção de anticorpos pelas células B é crucial para desenvolvimento de imunidade viral e a participação dos anticorpos neutralizantes, que têm papel importante tanto na proteção vacinal como no diagnóstico confirmatório da infecção por flavivírus (Xia et al., 2018).

Os flavivírus compartilham sequências antigênicas semelhantes, por isso, muitas vezes levam à reatividade cruzada de anticorpos direcionada as contra proteínas E (determinante imunogênico principal do vírion), prM e NS1, sobretudo entre DENV e ZIKV, o que pode aumentar a proteção ou exacerbar a doença durante uma infecção secundária por uma cepa relacionada, mecanismo conhecido como ADE (*antibody-dependent enhancement*) (Mongkolsapaya et al., 2003; Duangchinda et al., 2010; Culshaw et al., 2017; Van Leur et al., 2021).

A imunopatologia clássica das infecções é dependente de células T e B, conferindo, às infecções secundárias, uma montagem de resposta imune mais rápida que a infecção primária e com altos títulos de anticorpos da classe IgG. Todavia, a resposta do sistema imune do hospedeiro ao vírus também pode vir acompanhada de um processo conhecido como *original antigenic sin*, ou pecado antigênico original, caracterizado como infecções sequenciais por vírus relacionados que geram ativação de células de memória e uma resposta de anticorpos e de células T menos potentes que a exposição primária (Mongkolsapaya et al., 2003). O evento pode ser observado em casos graves de Dengue, nos quais a resposta imune parece ser ineficaz, acompanhado de produção de clones de baixa avides,

ativação de células T aberrantes e “tempestade de citocinas” (Mongkolsapaya et al., 2003; Duangchinda et al., 2010; Culshaw et al., 2017; Van Leur et al., 2021). O fenômeno não é observado apenas entre os flavivírus e foi, primeiramente, observado em crianças na resposta produzida à vacina do vírus influenza, como relatado por Vatti et al. (2017) e Henry et al. (2018).

1.2.4. Infecção por flavivírus no sistema nervoso

Comparada às etiologias bacterianas, fúngicas e por outros vírus, a mortalidade das doenças neurológicas por flavivírus ainda é considerada baixa, inferior a 1% (Lyons, 2018). Entretanto, a morbidade associada a essas infecções pode persistir mesmo após alta hospitalar, com sequelas motoras de paresia, paralisia, fraqueza muscular, dificuldade para deambular, ataxia, dor neuropática e doença autoimune (Bentes, 2020).

A ocorrência de encefalite viral aguda pode variar entre 1-13 casos/100.000 habitantes, e estimar a incidência exata desse agravo é muito difícil, porque muitos casos são diagnosticados como meningite indeterminada com complicações neurológicas ou podem ser confundidos como encefalopatias metabólicas, vasculares ou transtornos psiquiátricos agudos (Vieira, 2020).

Ao invadir o sistema nervoso do hospedeiro por disseminação hematogênica ou a partir de terminações nervosas, os flavivírus atingem regiões anatômicas distintas, como as meninges (levando à meningite), o córtex cerebral (provocando encefalite) e a medula espinhal (causando mielite), ou, até, simultaneamente em múltiplas regiões, tal como na meningoencefalite e na encefalomielite (Sousa Jr et al., 2021).

Estudos neurológicos de infecção por DENV, em camundongos, demonstraram infiltração leucocitária no interior da pia-máter e replicação do vírus em células endoteliais do SNC, astrócitos, micróglia e oligodendrócitos (Lee et al., 2016; Amorim et al., 2019). A replicação e montagem do vírus podem aumentar a apoptose do tecido cerebral infectado. Outrossim, estudos *in vivo* utilizando modelo murino, mostraram que mutações de três aminoácidos nas proteínas E e no domínio da helicase NS3 do DENV-1 foram associadas ao aumento da neurovirulência e causando danos extensos com leptomeningite e encefalite (Bordignon et al., 2007)

Esse perfil de resposta do DENV, também foi observado em infecção por ZIKV, levando a prejuízos de nutrição e diferenciação de neurônios, resposta pró-inflamatória no tecido cerebral e perda de força ou paralisia nos membros inferiores e superiores em modelo animal (Shao et al., 2017; Amorim et al., 2019; Alcantara et al., 2021). Além disso, O ZIKV exibe um tropismo por células progenitoras neuronais e, por esse motivo, pode trazer prejuízos permanentes no neurodesenvolvimento do indivíduo (Azevedo et al., 2018; Alcantara et al., 2021).

As alterações neurológicas deixadas por WNV são consonantes para a presença de vacuolização e inflamação do parênquima cerebral com degeneração e morte neuronal (Sejvar & Marfin, 2006; Peng & Wang, 2019). A morte dos neurônios, ocorre, predominantemente, via apoptose após a ativação de vias das caspase-9, caspase-3, pela indução da resposta ao estresse no RE, e pela ubiquitinação de proteínas durante à replicação do WNV (Peng & Wang, 2019). Além do domínio helicase e protease de NS3, o aminoácido na posição 30 da proteína NS2A aumenta o efeito citopático de WNV em cultura de célula (Rossi et al., 2007; Clarke et al., 2021).

Como efeito, a infecção pode vir acompanhada de ataxia cerebelar, instabilidade troncular e distúrbios extrapiramidais, que, inicialmente, manifesta-se como alteração de estado mental, e posteriormente, culminam em distúrbios da marcha levando a quedas, instabilidade postural, tremores de membros superiores, e movimentos anormais que se assemelham a sinais parkinsonianos. Quando casos de paralisia são observados, é provável o envolvimento de WNV com os neurônios motores inferiores na região que compreendem as células do corno anterior da medula espinhal, como visto na poliomielite, infecção causada pelo poliovírus (Sejvar & Marfin, 2006; Donadieu et al., 2013, Santini et al., 2022).

Embora sejam escassos estudos sobre imunopatologia dos flavivírus, nas infecções do SNC pelo ZIKV, o vírus invade esse sistema, primariamente, ao penetrar às células endoteliais do cérebro e, então, infectar astrócitos, sem romper a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) (Papa et al., 2017; Mustafá et al., 2019; Clé et al., 2020a). Entretanto, Kim et al. (2020), com experimentos em camundongos, sugere que há participação da barreira hematoliquórica (BHL) em estágio anterior a chegada do vírus à BHE, uma vez que as células infectadas pelo

ZIKV apareceram, inicialmente, nas regiões periventriculares do cérebro, incluindo o plexo coroide e as meninges, antes da infecção do córtex, e que a infecção cerebral pode ser atenuada pela neutralização do vírus no LCR (Mustafá et al., 2019; Clé et al., 2020a).

O WNV tem tropismo pelo córtex, corpo estriado, tronco cerebral, cerebelo, e hipocampo, a depender da cepa infectante (Donadieu et al., 2013), com presença, nessas regiões, de neuroniofagia, uma destruição de neurônios por células microgлияis. Mesmo entendendo que as células-alvo para infecção de WNV no SNC sejam os neurônios e as células gлияis, esse vírus pode chegar a essas áreas por diversas maneiras, seja por uma infecção direta do endotélio vascular, ou atravessando a barreira hematoencefálica, ou pelo mecanismo de “cavalo de Troia” por um transporte por células imunes infectadas, ou pela infecção dos neurônios olfativos, ou transporte retrógrado axonal direto (Peng & Wang, 2019). Esses mecanismos, embora conhecidos e compartilhados em outras infecções por flavivírus, ainda precisam de melhor compreensão.

1.2.5. Flavivírus Neurotrópicos

1.2.5.1. Vírus Dengue (*Orthoflavivirus denguei*)

Os relatos de infecção pelo DENV vêm desde o século XVII, porém não há consenso quanto à origem geográfica do vírus. A hipótese de origem na África sugere que o comércio marítimo e o tráfico negreiro foram os caminhos para a chegada do DENV às Américas. No Brasil, os primeiros casos registrados aconteceram por volta de 1845, no Rio de Janeiro, acompanhados de sucessivas epidemias de 1851 a 1853 e 1916 a 1923 (Gubler, 1997; Holmes & Twiddy, 2003).

Em 1981, uma grande epidemia foi documentada no estado de Roraima, onde foram identificados os sorotipos DENV-1 e DENV-4. Posteriormente, em 1990, o sorotipo DENV-2 e, em 2000, o DENV-3 foi detectado no Rio de Janeiro (Câmara et al., 2007; Figueiredo, 2010; Zanotto & Leite, 2018).

Assim, o DENV apresenta quatro sorotipos antígenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Harapan et al., 2020), todos transmitidos por

mosquito do gênero *Aedes*. A transmissão de DENV envolve um ciclo silvestre e um ciclo urbano. O ciclo silvestre está relacionado com a circulação do vírus entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes* sp. em florestas, enquanto o ciclo urbano está relacionado com a transmissão entre mosquito *Aedes* sp. e seres humanos nas cidades (Weaver et al., 2018; Ferreira-de-Lima & Lima-Camara, 2018). O período de incubação intrínseco da infecção pelo DENV é de quatro a dez dias após a picada de um mosquito infectado (WHO, 2009; WHO, 2022).

O espectro da infecção varia de casos assintomáticos a sintomáticos. A classificação dos casos de dengue proposta pela OMS, em 1997, era dividida em três categorias clínicas: dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do choque da dengue (SCD), entretanto essa classificação mostrou não ser suficiente na triagem de pacientes com dengue grave (DG). Até que, em 2009, a OMS definiu uma nova classificação para a doença, DC e DG, sendo a DC com ou sem sinais de alarme (WHO, 2009; Htun et al., 2021).

O DENV infecta, principalmente, monócitos e macrófagos, que podem transportar o vírus para o sistema nervoso. Além disso, neurônios dos cornos anteriores (motores), hipocampo e córtex cerebral, em modelos experimentais, são permissivos à infecção por DENV, mantendo a replicação viral ativa. Esse fator é importante para o diagnóstico da doença, uma vez que a detecção de RNA ou antígeno viral, bem como a presença de infiltrado celular inflamatório no LCR e a síntese intratecal de anticorpos específicos do tipo IgM, confirmam a invasão do SNC pelo DENV (Bentes et al., 2019).

Estima-se que 0,5-20% dos pacientes com dengue podem desenvolver manifestações neurológicas (Sanguanserm Sri et al., 1976; Li et al., 2017). Além dos relatos de envolvimento SNC e SNP, infecções por DENV podem levar a comprometimentos oculares como uveíte, hemorragia subconjuntival e síndromes imunomediadas pós-dengue (Solbrig & Perng, 2015; Maurya et al., 2016; Li et al., 2017).

Até a Semana Epidemiológica 13 de 2023, foram registrados 562.306 casos prováveis de dengue (taxa de incidência de 264,0 casos por 100 mil habitantes notificados no Brasil, em 4.193 municípios com casos), com 5.266 casos apresentando gravidade e com sinais de alarme. Essa taxa de incidência representa

um aumento de 35% de casos registrados para o mesmo período em 2022. Durante o período, foram registrados 148 óbitos confirmados e 228 em investigação, representando uma taxa de letalidade de 2,8% (Brasil, 2023).

1.2.5.2. Vírus Zika (*Orthoflavivirus zikaense*)

O ZIKV foi isolado, pela primeira vez, em 1947, na floresta de Zika, Uganda. O neurotropismo desse vírus foi evidenciado por edema cerebral e degeneração neuronal após inoculação experimental de ZIKV em ratos, ainda em 1952 (Dick et al., 1952). Embora tenha sido associado à infecção sem gravidade por décadas, em 2015, o ZIKV teve sua importância global reconhecida, após associação com microcefalia, calcificações subcorticais, hipoplasia cerebelar, contraturas congênitas, artro gripose, alterações retiniais e, até perda fetal (Bentes et al., 2019). Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e outras complicações neurológicas também têm sido descritas para o ZIKV (Pinheiro et al., 2016; WHO, 2016; Evangelista et al., 2021).

Três linhagens distintas baseadas na origem geográfica foram propostas entre as cepas de ZIKV. A linhagem do Leste Africano, representada pela cepa protótipo de Uganda; a Linhagem do Oeste Africano, contendo as cepas do Senegal; e a linhagem Asiática, compreendendo as cepas circulantes no sul da Ásia e a que causou o surto na ilha de Yap, outras ilhas do Pacífico e nas Américas (Lanciotti et al., 2008; Calvet et al., 2016; Enfissi et al., 2016; Hadow et al., 2012).

De modo semelhante ao DENV, a principal forma de transmissão de ZIKV é vetorial, principalmente pelas espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Essa via sustenta a prevalência da doença durante as epidemias urbanas. Vale a pena ressaltar que, além do ciclo urbano, o ZIKV possui um ciclo silvestre, que ocorre na África, tendo os seres humanos como hospedeiros acidentais. O DENV e o ZIKV são transmitidos para os seres humanos através da picada da fêmea dos mosquitos *Aedes* spp. (Suwanmanee & Luplertop, 2017; Brasil, 2021).

Outra possibilidade de transmissão é a sexual, que trouxe preocupação, principalmente, em viajantes originários de países onde não há circulação vetorial, retornando de áreas epidêmicas de ZIKV (Foy et al., 2011). A transmissão vertical pela via transplacentária em mulheres grávidas, especialmente no primeiro trimestre

de gestação, representa o maior impacto social da infecção por ZIKV (Besnard et al., 2014; Oliveira & Vasconcelos, 2016; Azevedo et al., 2018). Menos frequentes, a transfusão sanguínea (Musso et al., 2014) e a exposição laboratorial também foram relatadas (Evangelista et al., 2021).

Quanto aos dados epidemiológicos, até a Semana Epidemiológica 13 de 2023, ocorreram 4.946 casos prováveis de ZIKV, estando esses casos em 493 municípios, correspondendo a uma taxa de incidência de 2,3 casos por 100 mil habitantes, um aumento de 312% comparado a 2022 no Brasil, com 394 gestantes infectadas (Brasil, 2023).

1.2.5.3. Vírus do Nilo Ocidental (*Orthoflavivirus nilense*)

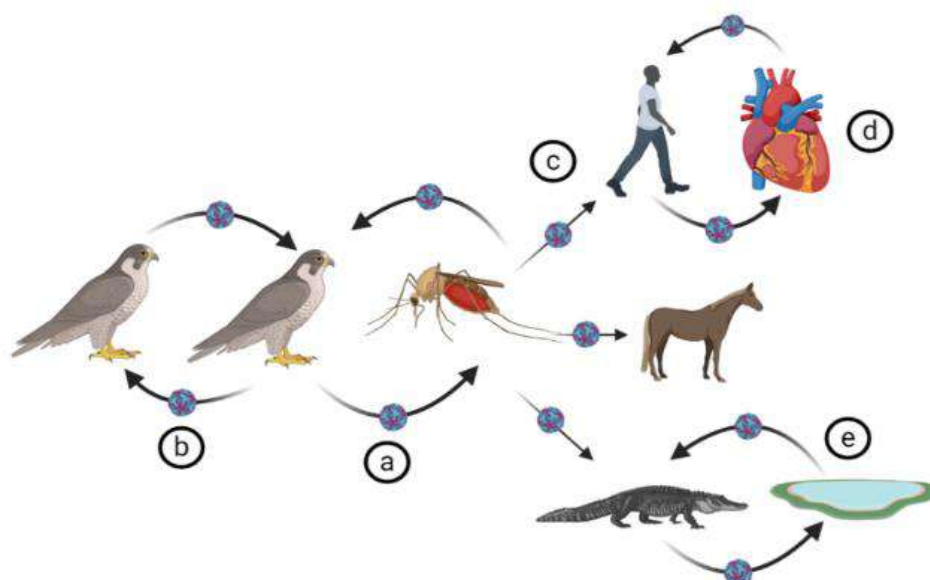
O WNV foi identificado pela primeira vez na província do Nilo Ocidental de Uganda, em 1937, em um paciente febril. Nessa época, o WNV foi considerado de menor importância humana, pois causava apenas infecções leves. Em 1953, foi identificado em aves (corvos e columbiformes) na região do delta do Nilo. Em 1999, um surto de encefalite humana concomitante à extensa mortalidade de aves em um zoológico na mesma área dos Estados Unidos acendeu a emergência em saúde para esse vírus (Costa et al., 2021).

Filogeneticamente, o WNV é agrupado em nove linhagens. As cepas das linhagens 1 e 2 são virulentas e têm sido responsáveis por diversos surtos e de doença neurológica grave (Bakonyi et al., 2006). A linhagem 1 é subdividida em 3 sub-linhagens, 1a, 1b e 1c, que abrangem isolados amplamente distribuídos pelo mundo (África, EUA, Europa, Oriente Médio, Austrália e Índia) (Murray et al., 2010; Habarugira et al., 2020). Os isolados da linhagem 2 são considerados menos virulentos entre os neurotrópicos e causaram vários surtos em humanos, cavalos e aves na África Subsaariana, Madagascar e Europa. A linhagem 7, ou Koutango, parece ser mais patogênica e apresenta curto início dos sintomas neurológicos. O vírus Koutango foi inicialmente classificado como uma espécie independente do gênero *Flavivirus*, mas, posteriormente, foi classificado como uma cepa de WNV. Essa linhagem é limitada à África (Senegal, Somália e Niger) (Fall et al., 2021).

Na América do Norte, a incidência de WNV é sazonal, variando conforme a região analisada. Na América do Sul, a dispersão do WNV é pouco compreendida, e a participação de aves migratórias vindas do Hemisfério Norte pode sustentar a ainda silenciosa circulação desse vírus (Costa et al., 2021). Há relatos de soropositividade em equinos na Colômbia, Argentina e Brasil, neste último incluindo casos de epizootias. A partir de uma epizootia em equinos no estado do Espírito Santo, obteve-se o primeiro isolamento do vírus no país (Silva et al., 2019). A infecção humana pelo WNV foi descrita em um caso de encefalite no estado do Piauí (Vieira, 2015).

O WNV tem, como principais vetores, *Culex pipiens* e *Culex quinquefasciatus*, sendo mantido na natureza em um ciclo mosquito-aves (Figura 3). Além de humanos, o WNV pode infectar equinos, ovinos, felinos, roedores, aves e répteis. Os equinos são considerados espécies sentinelas para surtos de WNV com potencial propagação na comunidade. Os demais hospedeiros parecem ter menor potencial de espalhar a infecção (Habarugira et al., 2020).

Figura 3 - Ciclo de transmissão de WNV.



Legenda: (a) mosquito vetor competente, (b) via direta entre aves, (c) para vários hospedeiros (humano, cavalo e crocodilo) através da picada de mosquito, (d) via transfusão de sangue e transplante de órgãos em humanos, (e) crocodilo através da água contaminada pelo WNV. Fonte: Adaptado de Habarugira, 2020.

Aproximadamente 80% das infecções por WNV em humanos são assintomáticas. Os casos sintomáticos leves incluem febre, dor de cabeça, cansaço e vômitos, enquanto a doença grave pode invadir o SNC e causar febre alta, coma, convulsões e paralisia (Costa et al., 2021). Indivíduos de todas as idades parecem ser igualmente suscetíveis à infecção por WNV, mas as taxas de morbidade e mortalidade aumentam com a idade, especialmente a partir dos 60 anos (Petersen, 2019).

A transmissão vertical do WNV (CDC, 2002; Colpitts et al., 2012), bem como por transfusão de sangue e transplante de órgãos, também foi relatada em humanos (Rhee et al., 2011; Cervantes et al., 2015).

1.2.5.4. Vírus da Encefalite de Saint Louis (*Orthoflavivirus louisense*)

O SLEV foi isolado pela primeira vez em 1933 durante uma grande epidemia que ocorreu em Saint Louis, Missouri, EUA. Ao longo do século XX, mais de 50 surtos com casos de encefalite por SLEV foram registrados nos EUA (Reisen, 2003), além de relatos ao sul do Canadá, México, América Central e América Sul. No Brasil, áreas da Amazônia (Salvaterra e Bragança/PA, Macapá/AP, Rio Branco/AC) e do Pantanal (Maracaju/MS) revelaram ser endêmicas em regiões de zona rural, com alta prevalência de anticorpos neutralizantes (50,9%) com base em inquéritos sorológicos em equinos (Rodrigues et al., 2010b).

O SLEV apresenta oito linhagens filogenéticas (I a VIII), sendo a linhagem tipo VIII identificada pelo IEC/PA. Nesse estudo, Rodrigues et al. (2010a) ainda demonstraram que os genótipos V e VII são amplamente distribuídos na Amazônia brasileira, enquanto os genótipos II e III circulam em área restrita do estado de São Paulo.

Como ocorre com o WNV, o ciclo mosquito-aves mantém a transmissão do SLEV. Os mosquitos culicídeos das espécies *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* e *Culex nigripalpus* podem transmitir o SLEV às aves passeriformes, humanos e mamíferos domésticos. Em equinos, a ausência de epizootias em regiões de elevada prevalência sugere que a infecção por SLEV seja subclínica ou oligossintomática (Rodrigues et al., 2010b).

Espécies pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Mansonia* e *Sabethes* são consideradas vetores potenciais, e, uma vez infectados, podem transmitir o SLEV a outros hospedeiros vertebrados. Assim, é provável existirem ciclos secundários do vírus, resultando na participação de outros animais em áreas de floresta, como roedores e marsupiais no solo e primatas não humanos na copa das árvores (Hervé et al., 1986).

A infecção por SLEV pode ser classificada em três síndromes clínicas: doença febril com cefaleia e mialgia, meningite asséptica e encefalite. A gravidade da doença aumenta conforme a idade do paciente (Moraes et al., 2021). Em pacientes que desenvolvem doença grave, um quadro febril agudo pode preceder sinais e sintomas neurológicos, incluindo rigidez da nuca, desorientação, marcha instável, apatia, sonolência, coma e morte. A taxa de letalidade varia de aproximadamente 2%, em jovens, a 22% em idosos, acima dos 75 anos.

1.2.5.5. Vírus Ilhéus (*Orthoflavivirus ilheusense*)

O ILHV foi descrito pela primeira vez em 1944, a partir do isolamento de uma mistura de mosquitos *Aedes* spp. e *Psorophora* spp. capturados durante investigação epidemiológica de febre amarela, em Ilhéus, Bahia (Karabastos, 1985). No mesmo período, infecções em humanos também foram identificadas por sorologia (Karabastos, 1985; Venegas et al., 2012; Henriques et al.; 2016).

O ILHV foi incluído no grupo antigênico de vírus Ntaya pelo Comitê Internacional de Taxonomia viral (CITV). O vírus tem como principal vetor *Psorophora ferox*, que apresenta hábitos silvestres, embora tenha sido isolado em mosquitos das espécies *Culex coronator*, *Haemagogus spegazzinii*, *Sabethes chloropterus*. Há descrições de isolamento viral e detecção de anticorpos anti-ILHV em aves silvestres, primatas não humanos e morcegos (Henriques et al., 2016; Reis & Neto, 2021).

Em humanos, o ILHV causa infecções assintomáticas, com raros relatos de encefalite em países da América Central e do norte da América do Sul, como Trinidad, Panamá, Colômbia, Guiana Francesa, Brasil, Equador e Bolívia. O percentual de positividade sorológica nas áreas endêmicas pode variar de 3,4 a 36%

(Cruz et al., 1997) e, mesmo assim, os casos clínicos observados sugerem que as infecções sejam, em sua maioria, brandas ou inaparentes (Pauvolid-Corrêa et al., 2013).

Um modelo experimental indica neurotropismo e persistência de até 30 dias do ILHV em tecido cerebral de hamsters dourados, *Mesocricetus auratus* (Henriques, 2009).

1.2.5.6. Vírus Rocio

O ROCV foi descrito, pela primeira vez, em 1975, em uma epidemia com 465 casos notificados na zona rural de São Paulo. Meses após o início dos casos, o vírus foi isolado de cerebelo e medula espinhal a partir de um caso fatal de encefalite em um morador do bairro de Rocio, localizado no município de Iguape/SP (Lopes, 1986). O ROCV também foi responsável por mais de uma centena de óbitos por meningoencefalite em comunidades costeiras. Em 2011, ROCV ressurgiu, causando surto no estado de Goiás (Saivish et al., 2020).

É provável que a transmissão do ROCV ocorra através do gênero *Aedes*, *Psorophora* e *Culex*, e que pássaros silvestres - como da espécie *Zenothrichia capensis* - tenham participação na manutenção do ciclo do ROCV, como reservatórios naturais. Infecções em cavalos também foram descritas e ressaltam o papel desses animais na vigilância epidemiológica do ROCV (Neves & Machado, 2016).

Assim como o ILHV, o ROCV também demonstrou neurotropismo e persistência de até 3 meses em tecido cerebral de hamsters dourados (Henriques, 2009). Embora com relatos fatais, acredita-se que a grande maioria das infecções por ROCV seja subclínica.

1.2.5.7. Vírus da encefalite japonesa (*Orthoflavivirus japonicum*) e Vírus da encefalite transmitida pelo carrapato (*Orthoflavivirus encephalitidis*)

O JEV é a principal causa de encefalite viral na Ásia (Mackenzie et al., 2022). Em 2022, a OMS chamou atenção para a possibilidade de dispersão do JEV pela

Oceania, com casos de infecção na Austrália, e em países do pacífico ocidental (Austrália, 2023).

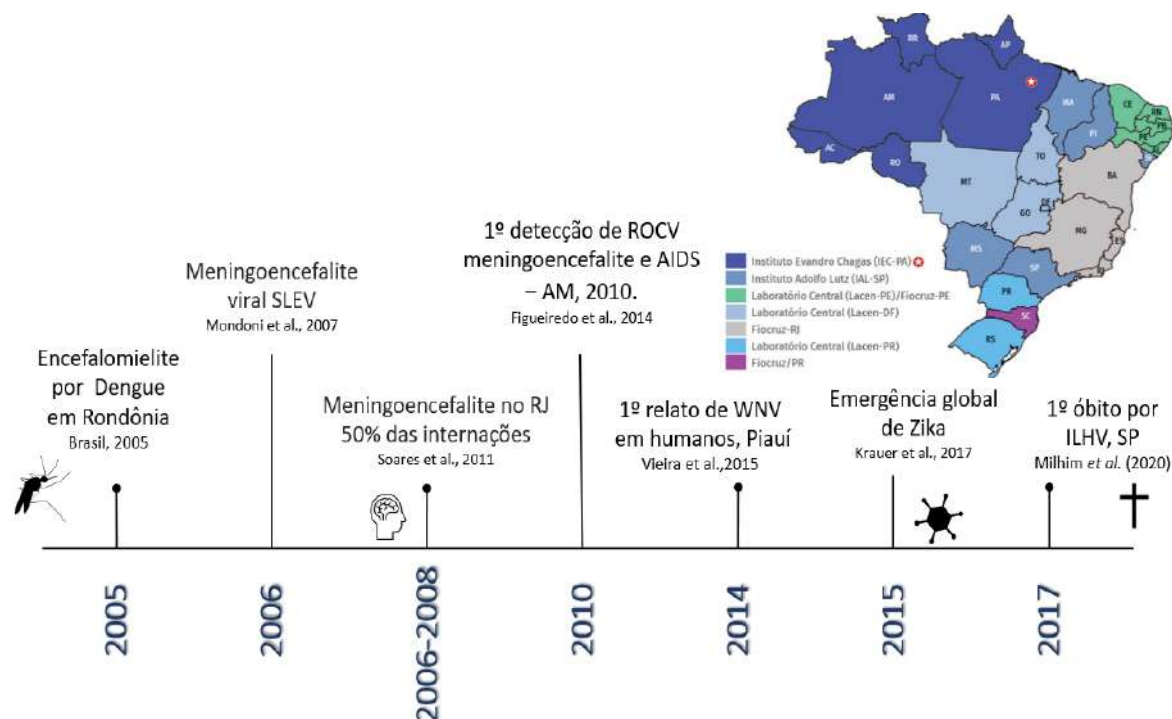
O TBEV tem ampla distribuição mundial, com descrição de casos em diversos países na Europa e Ásia. No continente europeu, a doença é transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes* spp., também encontrados no Brasil (Goonawardane et al., 2022).

Até meados de 2023, não foi identificada a circulação dos vírus JEV e TBEV em território brasileiro.

1.2.6. Epidemiologia das doenças neuroinvasivas por flavivírus no Brasil

A preocupação com os casos de infecções neurológicas causadas por flavivírus tem se tornado cada vez mais evidente nas últimas décadas (Figura 4). Em 2005, um surto de encefalomielite relacionada à Dengue ocorrido no estado de Rondônia, resultou na emissão, pelo Ministério da Saúde (MS), de uma nota técnica alertando para a possibilidade de complicações neurológicas da infecção pelo DENV (BRASIL, 2017). Um ano depois, o SLEV foi detectado em seis pacientes diagnosticados com meningoencefalite, durante uma epidemia de DENV no estado de São Paulo (Mondoni et al., 2007).

Figura 4 - Marcos temporais e laboratórios de referência regional para o diagnóstico das manifestações neurológicas por flavivírus no Brasil.



Fonte: Autoria própria, baseada no Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por Arbovírus, 2017.

Entre 2006 e 2008, infecções causadas também pelo DENV levaram preocupação ao Rio de Janeiro, com a etiologia associada a 50% das internações por meningoencefalite durante o período (Brasil, 2017).

Em 2010, o ROCV foi detectado no LCR de dois pacientes do estado do Amazonas com meningoencefalite, em coinfeções pelo HIV (Figueiredo & Figueiredo, 2014). Posteriormente, foram relatados outros quadros neurológicos associados a membros do gênero flavivírus. Em 2014, o WNV foi descrito pela primeira vez, causando infecção neuroinvasiva em humanos no Brasil, no estado do Piauí (Vieira et al., 2015), o que foi confirmado por técnica sorológica pelo Laboratório de Referência Nacional (apontado em vermelho no mapa da Figura 4). O IEC também confirmou, um ano depois, a associação entre o ZIKV e os casos de microcefalia observados no Nordeste do Brasil (Brasil, 2017). Em 2017, um paciente procedente de São Paulo foi a óbito, após complicações neurológicas graves de uma infecção pelo ILHV (Millhim et al., 2020).

1.2.7. Diagnóstico laboratorial de flavivírus

O diagnóstico de flavivírus segue o padrão do curso da doença. Na fase aguda, com até cinco dias após o início dos sintomas, a técnica de RT-qPCR é a mais empregada para detecção do RNA viral (LACEN-GO, 2017; PAHO, 2017; Henriques et al., 2020; Piantadosi & Kanjilal, 2020). A depender da integridade da partícula viral encontrada na amostra, o isolamento de vírus em cultura de célula de vertebrado (VERO) ou invertebrado C6/36 também podem ser utilizados como ferramentas viáveis na confirmação diagnóstica. A pesquisa de antígeno viral de NS1, particularmente em DENV, pode ser escolhida como triagem para isolamento de DENV em cultura de célula (LACEN-GO, 2017) e nas situações de epidemias nas quais o acesso aos serviços de referência é mais dispendioso. Técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS) estão cada mais sendo usadas na prática dos laboratórios de referência para auxiliar resultados inclusivos ou amostras com dificuldade de recuperação, como em LCR (Wilson et al., 2017; Mello et al., 2021; Piantadosi et al., 2021).

Após cinco dias de doença, o diagnóstico de escolha são os métodos sorológicos. O teste de Inibição da Hemaglutinação (IH) é reservado à rotina de Laboratório de Referência Nacional para o Diagnóstico de Arboviroses (Seção de Arbovírus e Febre Hemorrágicas do Instituto Evandro Chagas) e é valioso tanto para a triagem dos arbovírus, a partir de uma reação sorogrupo específica e direcionamento aos testes confirmatórios, quanto para a avaliação da resposta imune primária e secundária a infecções por arbovírus. Os testes confirmatórios de rotina para o diagnóstico de arbovírus são o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura de IgM. Para flavivírus, o teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT⁹⁰) é considerado padrão-ouro, e devido à especificidade, usado para confirmar o resultado de amostras positivas do ELISA (LACEN-GO, 2017; PAHO, 2017; Henriques et al., 2020).

Para aumentar a sensibilidade e a praticidade do PRNT⁹⁰, foram introduzidas técnicas de engenharia reversa para o desenvolvimento do teste de neutralização utilizando vírus *reporter* (RVNT⁹⁰). A priori, a padronização do RVNT⁹⁰ foi feita em amostras de soro com perfil de resposta primária, procedentes dos Estados Unidos,

e, em testes de avaliação de imunoproteção vacinal (Shan et al., 2017a; Shan et al., 2017b). Além disso, esse o RNVT⁹⁰ é útil para testar amostras com volume reduzido de coleta e com uma concentração menor de anticorpos como encontrado no LCR.

Na elucidação de casos agudos de infecção por flavivírus, é recomendada a solicitação de amostras pareadas de soro. A coleta deve ser realizada entre a fase aguda e a fase convalescente, em um intervalo entre a primeira e a segunda coleta de pelo menos dez dias (PAHO, 2017). Essa conduta é valorosa, principalmente, nas ocasiões de reatividade cruzada com outros membros do gênero, comumente observada no Brasil.

A resposta imune primária é observada nos indivíduos que não apresentam infecção prévia por flavivírus e é caracterizada por baixos títulos de anticorpos IgM. A IgM é o primeiro isotipo de imunoglobulina a aparecer, aproximadamente, três a cinco dias após o início dos sintomas. Os níveis de IgM atingem um pico duas semanas após o início da febre, e subsequentemente, declina a níveis não detectáveis, após dois ou três meses (Martin et al., 2000; Guzman et al., 2010). Já a imunoglobulina G (IgG) específica é detectável apenas no final da primeira semana da doença, crescendo gradativamente e perdurando por meses (Guzman et al., 2010).

Na resposta imune secundária, o estímulo da resposta imune celular de memória traz, como consequências, uma robustez na produção de anticorpos, com títulos de anticorpos IgM e IgG mais altos, e reconhecimento de estruturas antigenicamente compartilhadas por vírus de mesmo gênero a partir de uma infecção anterior (Henriques et al., 2020).

A suspeita clínica e epidemiológica pode orientar o diagnóstico de flavivírus, como observado no Quadro 1.

Quadro 1 - Manejo laboratorial das amostras colhidas com suspeita de doença neuroinvasiva.

Soro – 1ª amostra (fase aguda)

- ELISA-IgM para DENV, CHIKV e ZIKV: independente do intervalo entre o início dos sintomas e a coleta

- RT-PCR para DENV, CHIKV e ZIKV: se amostra colhida até o quinto dia de início dos sintomas

Soro – 2ª amostra (fase de convalescença)

- ELISA-IgG/IgM para DENV, CHIKV e ZIKV: independente do intervalo entre o início dos sintomas e a coleta

LCR (amostra única)

- ELISA-IgM para DENV, CHIKV e ZIKV: independente do intervalo entre o início dos sintomas e a coleta

- RT-PCR para DENV, CHIKV e ZIKV: se amostra colhida até o 30º dia de início dos sintomas

Urina

- RT-PCR para ZIKV: se amostra colhida até o 15º dia de início dos

Fonte: Adaptada de Brasil, 2017.

1.2.8. Padronização de técnicas moleculares para o diagnóstico de flavivírus

A RT-qPCR quantitativa em tempo real é baseada em sondas fluorescentes que acompanham a amplificação de RNA durante cada ciclo de reação (Grygorczuk et al., 2022), e que tornou capaz a detecção de quantidades mínimas de ácido nucleico em uma variedade de espécimes clínicos (Calvet et al., 2018; Santiago et al., 2018; Nunes et al., 2019; Queiroz et al., 2021; Grygorczuk et al., 2022).

A técnica é conhecida por ser sensível, específica e aliar rapidez na entrega dos resultados. Atendendo a essa proposta de agilidade, as reações multiplex detectam mais de um patógeno em único tubo de reação (Queiroz et al., 2021; Songjaeng et al., 2022), sendo razoável, pelo menos, a inclusão de corantes fluorescentes diferentes, conforme os alvos pesquisados. A ferramenta de

bioinformática é um importante recurso para o desenho dos *primers*, na qual a adequada identificação de regiões genômicas de patógenos contribui diretamente para o aumento da sensibilidade e especificidade da reação (Daidoji et al., 2021).

Durante a padronização de uma RT-qPCR, parâmetros envolvendo qualidade e integridade do RNA, eficiências da reação e sensibilidade analítica devem ser analisados (Queiroz et al., 2021). A sensibilidade está relacionada com o limite de detecção, a qual é a concentração de RNA viral que pode ser detectada com razoável certeza, certeza essa, que é igual a 95% de probabilidade. Outro parâmetro crítico durante a avaliação, é o uso de controle interno e/ou externo fundamental para analisar a qualidade do RNA extraído, que é inerente a característica e ao método de conservação da amostra (aspecto pré-analítico) (Nunes et al., 2019; Grygorczuk et al., 2022).

À medida que os flavivírus ganham importância em saúde pública, causando surtos irrestritos às áreas geográficas delimitadas, (Elizalde et al., 2020; Tomar et al., 2021) aumenta o interesse em desenvolver protocolos, capazes de garantir um diagnóstico precoce, inclusive nas infecções, em que o vírus cause baixa viremia no hospedeiro. A técnica de RT-qPCR cumpre, sobremaneira, essa necessidade (Queiroz et al., 2021; Elizalde et al., 2020).

Já foram descritos diversos protocolos de RT-qPCR *singleplex* para PandENV (Songjaeng et al., 2022), para WNV (Tomar et al., 2021), para JEV (Bharucha et al., 2018), gênero específico (Daidoji et al. 2021), reações *duplex* de EEEV e SLEV (Hull et al., 2008), JEV e soro complexo Ntaya em pássaros (Elizalde et al., 2020), YFV (Queiroz et al., 2021), triplex de ZIKV, DENV e CHIKV (Santiago et al., 2018).

A genética reversa é uma ferramenta importante na confecção de produtos empregados em pesquisa de propriedades biológicas como virulência, sítios de replicação, patogenicidade a estudos preliminares de vacinas em modelos animais, possibilitando a distinção entre imunizados e não imunizados, bem como, método de triagem de antivirais (Chen et al., 2022; Sergeeva et al., 2022). Dentro das aplicabilidades, uma sequência *reporter* pode ser um marcador no rastreamento de vírus recombinantes, podendo estar sob regulação de promotor viral ou fusionadas estrutura gênica viral (Kassar et al., 2017; Shan et al., 2018; Nouda et al., 2021).

Os vírus *reporter* são produzidos a partir de uma sequência de DNA de interesse inserida no vetor de clonagem, e o produto amplificado, é transcrito e transferido para células hospedeiras. A replicação do vírus *reporter* é avaliada através da mensuração da atividade da proteína na forma de fluorescência ou bioluminescência que em condições ideais aumentam sensibilidade dos testes usados (Allard & Kopish, 2008; Shan et al., 2018).

Esse ganho de sensibilidade pode ser observado quando o vírus *reporter* é usado no teste de neutralização (Shan et al., 2018). O PRNT⁹⁰ é reconhecidamente usado na rotina e indicado como padrão-ouro para diferenciação espécie-específica de flavivírus em amostras positivas com reação cruzada no IH e ELISA (CDC, 2019; Henriques et al., 2020). E mesmo no PRNT⁹⁰, há necessidade da solicitação de duas amostras na fase convalescente para acompanhar o aumento de título de anticorpo. Este teste fundamenta-se na inibição da infecção viral a partir da redução na formação de placas em monocamada celular (Cordeiro et al., 2016). No entanto, a praticidade do PRNT⁹⁰ é questionada, por ser tecnicamente complexo e laborioso, limitando sua aplicação em situações de grande demanda (como em surtos e epidemias), propensão à variabilidade no padrão de placa formada, necessidade de manipulações sucessivas do cultivo celular para se obter uma densidade de células ideal e visualização e contagem subjetiva das placas de infecção (Panning et al., 2017).

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇA NEUROINVASIVA A PARTIR DE LCR

1.3.1. Líquido Cefalorraquidiano (LCR)

O LCR é considerado um líquido nobre que serve como um meio para o fornecimento de nutrientes às células neuronais e às gliais, garantindo um ambiente eletrolítico ao tecido nervoso. Também, é atribuída, ao LCR, função semelhante ao sistema linfático para o SNC, uma vez que participa da eliminação de resíduos metabólicos, transporta hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos. Finalmente, o líquido produz uma barreira mecânica de atenuação de traumas sobre o cérebro e a medula espinhal (Morrison, 2009; Tumani, 2015b).

Os espaços de circulação do LCR compreendem os ventrículos intracerebrais, os espaços subaracnoides cerebrais e espinais, como cisternas e sulcos, e o canal central da medula espinhal (Davson et al., 1970). A maior parte desse fluido é produzida nos ventrículos do cérebro pelo plexo coroide (Spector et al., 2015a). No entanto, as células endoteliais que revestem os ventrículos produzem uma porção menor de LCR (Davson et al., 1987; Davson & Segal, 1996). Após a produção, o fluido viaja através dos ventrículos e, em seguida, ao redor do cérebro e da medula espinhal. É, então, reabsorvido diretamente no sangue por meio de estruturas na membrana aracnoide chamadas de vilosidades aracnoides (Felgenhauer, 1995).

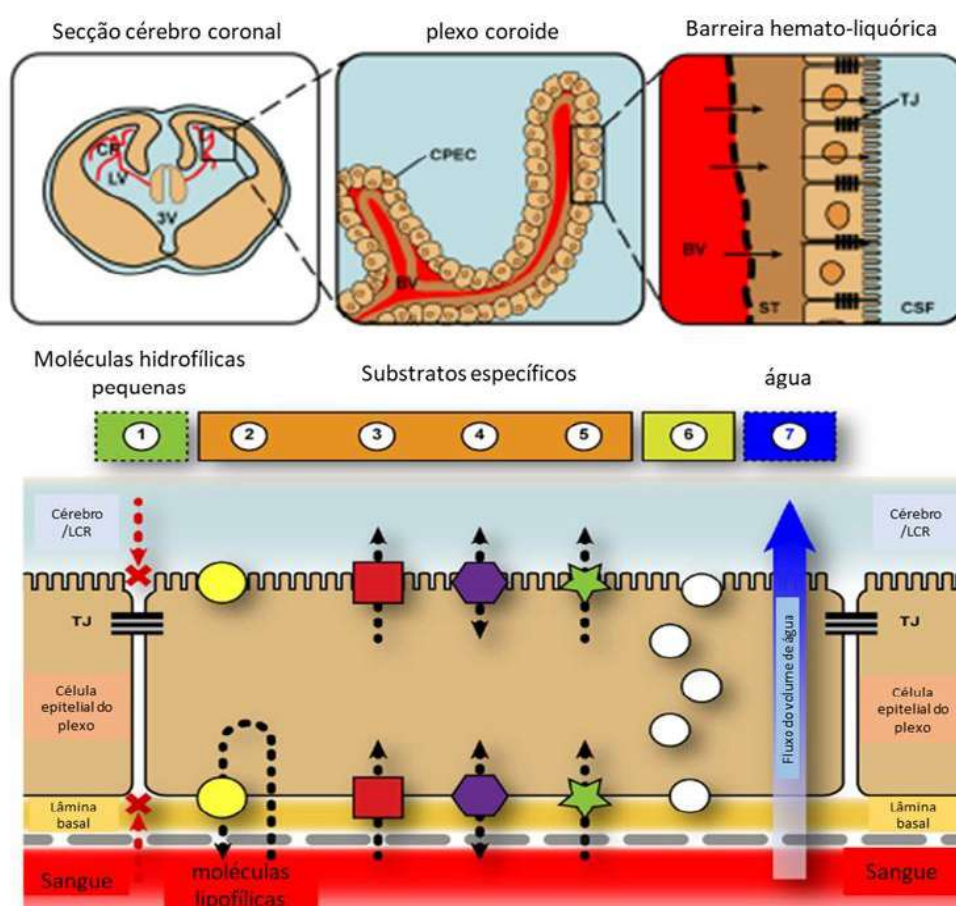
Em condições fisiológicas normais, o LCR lombar apresenta-se como um líquido límpido e incolor, conhecido como “água de rocha” (Puccioni-Sohler & Soares, 2013; Brasil, 2019b). Entre os constituintes moleculares, é derivado principalmente de sangue (80%), enquanto o restante dos constituintes, são sintetizados pelo plexo coroide nos ventrículos cerebrais e parênquima cerebral, ou seja, por moléculas produzidas no ambiente intratecal (20%) (Thompson, 2005, Tuman, 2015b). A síntese intratecal de proteína pode ser determinada indiretamente pelo tamanho molecular e concentração sanguínea do analito, e o resultado obtido pode indicar, produção local, e conseqüentemente, alteração na fisiologia do LCR, seja de imunoglobulinas ou de citocinas (Reiber & Peter, 2001; Freedman et al., 2005).

A transferência de proteínas para o LCR ocorre por difusão, por canais semelhantes a poros para proteínas menores, e por pinocitose, em proteínas maiores. Após esse fluxo, a concentração líquida de proteína no soro (~7 g de proteína/100 mL) é cerca de 200 vezes maior do que no LCR (~0,025 g de proteína/100 mL) (Cutler et al., 1970; Spector et al., 2015b; Thompson, 2005).

Já a transferência de glicose se dá por transporte ativo, via co-transportadores de sódio na região basolateral (*glucose transporter 1*). Outro mecanismo de regulação, é o transporte integrado de Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻ mediado por carreador basolateral e apical via condutância do canal iônico, seguindo o gradiente osmótico. Os íons translocados, juntamente com a água, difundem-se pelo potencial de gradiente através dos canais de aquaporina 1 (Figura 5) (Johansson et al., 2005; Liddel, 2015; Spector et al., 2015b; McCabe & Zhao, 2021).

A transferência de moléculas é seletivamente regulada e exercida pelos sistemas de barreiras - hematoencefálica e hemato-liquórica, que diferem em propriedades morfológicas e funcionais quanto à permeabilidade e fluxo (Tumani, 2015a). Essas barreiras restringem a livre passagem de moléculas, inclusive de substâncias tóxicas e células do sangue arterial, para o parênquima cerebral e para o espaço do LCR, mantendo o funcionamento neuronal (Teunissen & Zetterberg, 2021).

Figura 5 - Mecanismos envolvidos com a produção e composição de LCR no plexo coroide.



Legenda: TJ: junções apertadas; BV: vaso sanguíneo; CP: plexo coroide; CPEC: célula epitelial do plexo coroide; CSF: fluido cerebrospinal; LV: ventrículo lateral; NU: núcleo; ST: estroma/ membrana basal; 3V: terceiro ventrículo. Fonte: Adaptado de Liddelow 2015.

A barreira hematoencefálica (BHE) consiste nas células endoteliais dos capilares cerebrais que separam o sangue do tecido parenquimatoso cerebral. Também fazem parte da BHE os astrócitos, pericitos e membrana basal e a micróglia (Abbott et al., 2010; Kadry et al., 2020; Lange & Udenaes, 2022). As células endoteliais que compõem a BHE, diferentemente das demais, não possuem nem frenebrações, nem atividade picnótica. Elas utilizam de mecanismos de transporte ativo para regular a passagem de moléculas, além de expressarem proteínas de junções apertadas (*Claudin-5*, *Occludins* e *Junctional Adhesion Molecules* [JAMs]) (Saitou et al., 2000; Ebnet et al., 2003; Umeda et al., 2006; Vermette et al., 2018; Castro Dias et al., 2019) que selam o espaço de células endoteliais adjacentes, para impedir o movimento livre de moléculas hidrofílicas entre sangue e cérebro (Abbott et al., 2010; Kadry et al., 2020; Lange & Udenaes, 2022).

A barreira hematolíquorica (BHL) refere-se ao espaço formado por vasos sanguíneos e células epiteliais do plexo coroide voltadas para o LCR. Ao contrário dos vasos sanguíneos que formam o BHE, os capilares do plexo coroide são fenestrados e sem junções para conectar às células endoteliais, permitindo o movimento de moléculas maiores para o plexo coroide. Além disso, leucócitos, macrófagos e células dendríticas podem migrar pela camada de células fibroblásticas semelhante às mesenquimais do estroma do plexo coroide antes de serem transportados através da camada epitelial para o cérebro (Johanson et al., 2011; Hofman & Chen, 2016; Wojcik et al., 2011; Strominger et al., 2018).

Outra característica da BHL é a presença na região apical das células epiteliais de microvilosidades com borda em escova que aumentam a área de superfície e facilita o transporte de moléculas para o ventrículo (Brown et al., 2004) (Figura 2). Mesmo que mais permeável, a BHL apresenta mecanismos de controle de permeabilidade, como a BHE (Wong & Gumbiner, 1997; Steinemann et al., 2016; Szczepkowska et al., 2019; Solar et al., 2020).

1.3.2. Critérios laboratoriais para avaliação do LCR

Uma análise completa do LCR através de punção lombar pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de distúrbios de SNC (Piantadosi & Kanjilal, 2020; Otto et

al., 2022) e do sistema nervoso periférico (SNP). As indicações envolvem desde casos urgentes de suspeita de infecção do SNC (meningite, meningoencefalite ou encefalite), na ocorrência de febre inexplicável em criança ou adulto com imunodeficiência que apresente demência com progressão rápida e convulsões recorrentes, além de acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia subaracnoidea, hipertensão intracraniana idiopática, meningite carcinomatosa e possíveis distúrbios neuroimunológicos (Otto et al., 2022) e desmielinizantes, como esclerose múltipla (Tomas-Ojer et al., 2022), mielite transversa e síndrome de Guillian-Barré (Oliveira et al., 2020).

É importante que a real necessidade para realização da punção lombar seja avaliada pelo profissional médico, proporcionando benefício terapêutico, frente aos riscos e às complicações envolvidas com o procedimento. Inclusive que o paciente e/ou acompanhante sejam informados quanto às razões e às particularidades da realização (Turtzo, 2009).

Técnicas menos invasivas como tomografia computadorizada de cabeça são muitas vezes consideradas. Entretanto, a punção lombar acaba sendo utilizada como primeira opção de procedimento diagnóstico quando há suspeita de meningite bacteriana. Uma vez que, a antibioticoterapia de amplo espectro deve ser iniciada imediatamente, devido à alta taxa de morbidade e mortalidade associada a esse agravo na ausência de tratamento (Turtzo, 2009).

De forma geral, as meningites bacterianas e virais desenvolvem sintomas agudos que podem se estender por até cinco dias, enquanto, que meningites tuberculoides, criptocóccicas podem apresentar-se de forma crônica, com mais de 30 dias de seguimento (Poplin et al., 2020).

A avaliação do LCR envolve citologia, bioquímica, microbiologia, imunologia e biologia molecular. A etapa pré-analítica começa desde a punção lombar, com o registro da pressão de abertura medida no início da coleta. Parâmetros como aspecto, cor e turbidez são avaliados, preferencialmente, em quatro tubos estéreis coletados em série. Após a coleta, o material deve ser acondicionado e encaminhado imediatamente para seguimento analítico (Oliveira et al., 2020).

A continuidade da etapa analítica envolve contagem de eritrócitos, contagem global e diferencial de leucócitos, concentração de glicose e proteínas totais

(albumina, imunoglobulinas das classes IgG, IgA e IgM), determinação de lactato (Süssmuth & Tumani, 2021), pesquisa de bactérias pela bacterioscopia através da coloração de Ziehl-Neelsen coloração de Gram, cultura inespecífica de bactérias, cultura de micobactérias, cultura de fungos, contra-coloração de cápsula fúngica (tinta Nanquim), reação em cadeia da polimerase (Taherkhani & Farshadpour, 2021; Wang et al., 2021), citometria de fluxo (Dossou et al., 2022; Otto et al., 2022; Tomas-Ojer et al., 2022) avaliação de bandas de IgG oligoclonais (Süssmuth & Tumani, 2021).

Na rotina laboratorial, com poucas horas de análise, alguns dos testes supracitados, podem direcionar a conduta médica. Embora a presença de polimorfonucleares não esteja descartada, a predominância de linfócitos é típica de infecções virais do SNC, aliada à elevada concentração de proteínas totais, ou valores normais dentro da referência de proteínas e glicose. Para concluir o diagnóstico viral em LCR, a pesquisa de patógeno viral pode ser realizada através da presença de anticorpos específico do tipo IgM ou ácidos nucleicos virais (Tyler et al., 2006; Kanjilal et al., 2019; Solomon, 2020).

A detecção de anticorpos neutralizantes foi recomendada por instituições de referência de maneira a confirmar testes imunoenzimáticos em soros de pacientes infectados para ZIKV (WHO, 2016; Henriques et al., 2020; Shan et. al., 2017a; Shan et. al., 2017b) e WNV (Vieira et al., 2015). Além disso, mesmo de alto custo e limitadas a centros de pesquisa, técnicas de metagenômica, podem ajudar a elucidar casos de doença neuroinvasiva por microrganismo que não sejam cultiváveis, raros ou que não tenham protocolos de padronização definidos (Wilson et al., 2019; Hasan et al., 2020; Piantadosi et al., 2021).

1.4. CLASSIFICAÇÃO DE DOENÇA NEUROINVASIVA

O MS brasileiro orienta que a investigação das doenças neuroinvasivas siga critérios ou níveis de certeza diagnóstica baseada na classificação de Brighton, que utiliza aspectos clínicos, radiológicos e laboratoriais para definição do caso (Brasil, 2017). Baseado nos achados laboratoriais, os casos de arbovirose neuroinvasiva

podem ser definidos como suspeito, provável, confirmado e descartado (Brasil, 2017).

O caso suspeito pode se apresentar como um caso agudo de encefalite, mielite, encefalomielite, polirradiculoneurite (síndrome de Guillain-Barré) ou de outras síndromes neurológicas centrais, ou periféricas diagnosticadas por médico especialista, na ausência de explicação clínica provável. Um caso provável, é aquele cujo caso suspeito, apresenta anticorpos IgM para arbovírus na primeira amostra de soro, através da metodologia ELISA (Brasil, 2017).

Já um caso confirmado é um caso suspeito que responda a um ou mais dos critérios abaixo (Brasil, 2017):

- I) Detecção viral por isolamento ou RT-PCR em tecidos, sangue, LCR ou outros líquidos corporais;
- II) Detecção de aumento de pelo menos quatro vezes nos títulos de anticorpos específicos da classe IgG entre amostras pareadas de soro, colhidas com intervalo de 10 a 21 dias, através de métodos quantitativos ou semiquantitativos (ELISA ou IH);
- III) Detecção de anticorpos da classe IgM (ELISA) no LCR;
- IV) Detecção de conversão sorológica para IgM (ELISA) entre amostras pareadas de soro (não reagente no soro de fase aguda e reagente no soro de fase de convalescença);
- V) imuno-histoquímica positiva.

Finalmente, um caso descartado é aquele caso suspeito cuja evolução clínica ou exames diagnósticos mostraram outra explicação provável para o comprometimento neurológico ou cujos exames laboratoriais para arbovírus, DENV, Chikungunya (CHIKV) e ZIKV tiveram resultados negativos (Brasil, 2017).

1.5. JUSTIFICATIVA

Diante da circulação do ZIKV, a partir de 2015, e o crescente aumento de manifestações neurológicas graves associado a flavivírus (BRASIL, 2017), bem como, da elaboração do “Protocolo de Vigilância dos Casos de Manifestações Neurológicas de Infecção Viral Prévia”, tornou-se ação prioritária, o fortalecimento da

rede de unidades sentinelas para a suspeita, a notificação, a investigação e outras condutas de vigilância para os casos de doenças neuroinvasivas por flavivírus (BRASIL, 2017).

Como parte dessa rede de unidades sentinelas e sob a expertise do IEC, Vieira e colaboradores, em 2015, fizeram a primeira descrição de infecção humana por WNV no sertão do Piauí, em LCR. A infecção por WNV também foi relatada em achados sorológicos no estado do Ceará. Além disso, três epizootias de WNV em equídeos foram confirmadas nos estados do Espírito Santo (2018), Ceará (2019) e São Paulo (2019). Ainda segundo Vieira, no Piauí, há associação de 0,6 a 3 casos de comprometimento neurológico a cada 1.000 notificações de arboviroses envolvendo DENV, ZIKV e/ou CHIKV (Vieira et al., 2015).

A permanente exposição da população a vetores de flavivírus, como *Aedes* e *Culex*, o incremento do número de casos de engue no Brasil, acompanhados de elevada incidência em estados da região Norte, como Acre e Rondônia, com incidência superior a 300 casos por 100 mil habitantes, cada, e Tocantins apresentando, acima de 100 casos para cada 100 mil habitantes de incidência. A atual circulação de DENV-1 e DENV-2, e os achados de WNV em anos anteriores no Piauí reforçam a necessidade de fortalecimento da vigilância epidemiológica dos agravos causados pelos flavivírus, especialmente dos casos clínicos graves atendidos na capital do estado do Pará (Brasil, 2023).

A partir de amostras biológicas provenientes do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), em Belém-PA, instituição coparticipante deste estudo. Franco et al. (2006) analisaram a prevalência de meningite em crianças em, entre 1995 e 2004, e verificaram que, aproximadamente, 20% tinham origem viral, mas não houve a inclusão de teste para o diagnóstico de arbovírus nesse estudo. Adicionalmente, pesquisas disponíveis na plataforma institucional da Universidade Federal do Pará (UFPA), que foram realizadas no HUJBB, evidenciam publicações envolvendo doenças do SNC causadas por criptococos (Almeida, 2012; Carneiro, 2016).

Embora haja no Pará, hospital de referência em doenças infecciosas (HUJBB) com unidade diagnóstico de meningites com atendimento por livre demanda (UDM) e a rede de laboratórios de referência regional (LACEN-PA) e nacional

(IEC/SVSA/MS) para diagnóstico de DENV, ZIKV e CHIKV e outras arboviroses, o maior quantitativo de notificações deve-se aos estados anteriormente citados neste tópico.

A disponibilidade de recursos humanos, clínico, técnico e científico, e infraestrutura, já existentes, alinhados à implantação de fluxos adequados, pode ser a chave para mudar a realidade dessas subnotificações. Buscar tecnologias de padronização de novos protocolos, de validação de técnicas já existentes, que aumentem a sensibilidade de testes e que detectem vírus que estejam tanto em circulação endêmica ou em introdução de novos casos, ainda é o caminho para o fortalecimento da infraestrutura laboratorial de forma mais ampla.

Os protocolos que envolvem LCR precisam sofrer adaptações, uma vez que esse é um espécime que apresenta uma quantidade menor de proteína, glicose e células comparado às amostras de soro. Dobrar o volume do que é testado é a estratégia simples e imediata a ser adotada, quando se manipula amostras diluídas. Mas tem execução desafiadora, na prática, tendo em vista que esse espécime é considerado “nobre”, cuja coleta por punção lombar, normalmente, traz quantidades reduzidas do material coletado, a menos que o paciente tenha pressão intracraniana elevada.

Além dessas dificuldades, os laboratórios de referência são ambientes em que as amostras enviadas já apresentam volume prévio consumido durante uma etapa inicial de triagem no local de origem. Portanto, esse trabalho tem como proposta, padronizar e validar dois protocolos, um molecular e sorológico, atendendo, assim, a duas estratégias de detecção diferentes, de RNA viral e de anticorpos em LCR, respectivamente. Em comum, ambos contemplam aumento de sensibilidade das técnicas e redução do volume de amostras testadas comparados a protocolos usados na rotina diagnóstica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar protocolos virológicos e imunológico para a investigação de flavivírus em casos de doença neuroinvasiva.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar uma reação *duplex* de RT-qPCR de WNV e SLEV;
- Padronizar uma reação *quadriplex* de RT-qPCR para ILHV, ROCV, TBEV e JEV;
- Validar um ensaio de RVNT⁹⁰ para DENV e ZIKV utilizando a plataforma Citation 5.0 BioTek comparado ao PRNT⁹⁰ convencional;
- Avaliar o desempenho do RVNT⁹⁰ para diferenciação entre os membros do gênero *Flavivirus* em comparação ao PRNT⁹⁰, utilizando amostras com perfil de infecção secundária para *Flavivirus*;
- Avaliar o RVNT⁹⁰ na plataforma Glomax® Promega frente ao desempenho no equipamento Citation 5.0 BioTek;
- Realizar o diagnóstico diferencial de agentes causadores de doenças neuroinvasivas, selecionando os pacientes suspeitos de infecção viral;
- Detectar o genoma de *Flavivirus* circulantes no Brasil em LCR de pacientes suspeitos de doenças neuroinvasivas;
- Detectar anticorpos anti-flavivírus em amostras LCR e/ou soro de pacientes suspeitos de doenças neuroinvasivas;
- Relacionar os dados bioquímicos e citológicos em LCR com a infecção por flavivírus.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DESENHO DO ESTUDO

Foram avaliados três protocolos laboratoriais, sendo dois de biologia molecular e um sorológico para diagnóstico de flavivírus neuroinvasivos utilizando amostras de LCR. O protocolo molecular partiu de uma padronização de três ensaios de reação de RT-qPCR multiplex, sendo: (i) o *duplex* WNV e SLEV, e o (ii) *quadriplex* de RT-qPCR para ILHV, ROCV, TBEV e JEV.

O protocolo sorológico baseou-se na validação do ensaio de RVNT para DENV e ZIKV em duas plataformas de detecção: Citation 5.0 BioTek e Glomax® Promega. O teste RVNT⁹⁰ na plataforma Citation 5.0 BioTek foi comparado ao PRNT⁹⁰ convencional. Para DENV, RVNT⁹⁰ DENV Rluc foi comparado a PRNT⁹⁰ convencional. E para ZIKV, RVNT⁹⁰ ZIKV Rluc e RVNT⁹⁰ ZIKV mCherry a PRNT⁹⁰ convencional. A técnica de RVNT⁹⁰ com a sequência fluorescente (mCherry) também foi testada, dessa vez, tomando a técnica com sequência luminescente (Rluc). Outrossim, visando o princípio da economicidade e a implantação multicêntrica do RVNT⁹⁰, avaliou-se a plataforma Glomax® Promega a partir do desempenho de RVNT⁹⁰ no equipamento Citation 5.0 BioTek apenas para os testes DENV Rluc e ZIKV Rluc.

A avaliação do protocolo imunológico foi realizada com soros de pacientes sintomáticos de Dengue e/ou Febre do Zika com diagnóstico previamente confirmado para infecções por DENV e ZIKV, respectivamente, na rotina diagnóstica de flavivírus da SAARB/SVSA/IEC, a fim de viabilizar a aplicabilidade do RNTV⁹⁰ na rotina diagnóstica em soros controles, antes do emprego no diagnóstico das doenças neuroinvasivas.

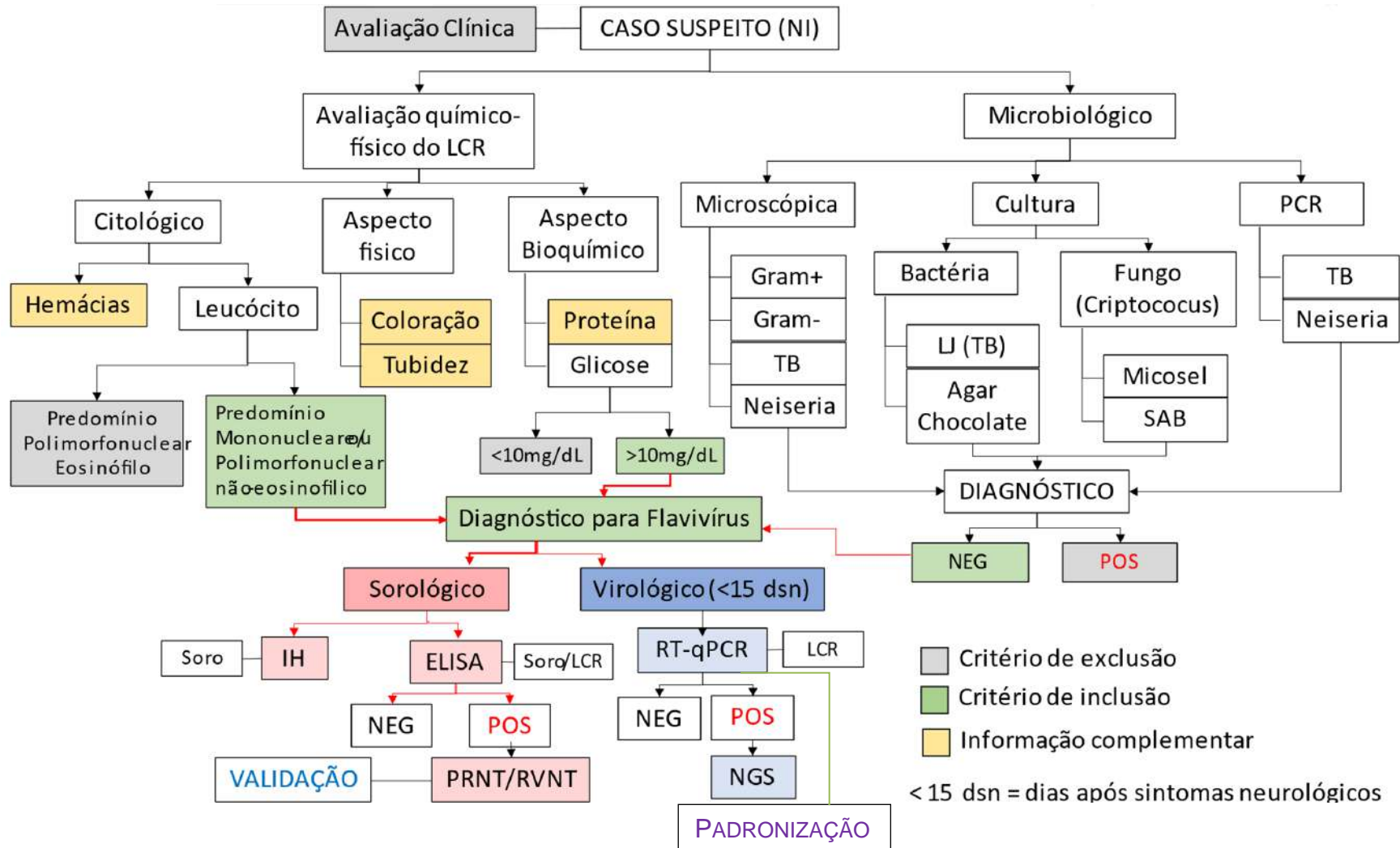
Amostras de LCR e soro foram selecionadas para testar o protocolo em amostras por cegamento para diagnóstico de doenças neuroinvasivas por flavivírus. Os LCRs e soros de pacientes com suspeita clínica de doença neuroinvasiva oriundos do estado do Pará (Figura 6) foram testados para as técnicas singleplex de RT-qPCR, IH e ELISA adaptadas da rotina diagnóstica padrão de vírus testados na SAARB/SVSA/IEC como detalhado na Quadro 2. Esses espécimes clínicos também

compuseram o painel de amostras para etapa de validação do protocolo molecular das reações *duplex* e *quadriplex*.

Quadro 2 - Técnicas e alvos virais testados utilizados no *screening*.

<p style="text-align: center;">RT-qPCR</p> <p style="text-align: center;">DENV, ZIKV, CHIKV, WNV, SLEV, JEV, ILHV, ROCV, TBEV, MVEV, RVFV, TOSV, OROV, EEEV, WEEV, VEEV</p> <p style="text-align: center;">IH</p> <p style="text-align: center;">EEEV, WEEV, MAYV, MUCV, TCMV, CHIKV, WNV, YFV, 17D, ILHV, DENV, SLEV, ROCV, ZIKV, OROV</p> <p style="text-align: center;">ELISA</p> <p style="text-align: center;">DENV, ZIKV, YFV, WNV, SLEV, CHIKV, OROV</p>
--

Figura 6 – Fluxo da rotina diagnóstica de LCR.



3.2. AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS

3.2.1. Padronização Protocolos RT-qPCR – *Duplex WNV/SLEV e Quadriplex ILHV/ROCV/TBEV/JEV*

3.2.1.1. Desenho de iniciadores e sondas

Neste estudo, foram desenhados novos conjuntos de iniciadores e sondas para SLEV, ILHV, ROCV e JEV. Já para os vírus TBEV e WNV, foram utilizados iniciadores e sondas disponíveis na literatura (Schwaiger Cassinotti, 2003; Xu et al., 2022). Para o desenho dos iniciadores e sondas, foram realizados alinhamentos das sequências de genoma completo de cada vírus disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando o programa Geneious pro R11 v. 11.0.3, (Biomatters Ltda., Auckland, Nova Zelândia). Foi feita avaliação das regiões mais conservadas de cada vírus e foi gerada uma sequência consenso. Foram evitadas regiões com altas taxas de repetição de nucleotídeos, bem como, regiões de alto risco de formação de estruturas secundárias de RNA, identificadas com o auxílio da ferramenta de predição de estrutura secundária de RNA Mfold (Zuker, 2003).

As sequências consenso obtidas foram utilizadas como base para o desenho dos conjuntos de iniciadores e da sonda, específicos, utilizados nas reações de RT-qPCR no formato TaqMan®. Todos os iniciadores e sondas foram desenhados utilizando uma versão modificada do programa Primer3 v. 2.3.7 (Untergasser et al., 2012) disponível no pacote do programa Geneious. Todas as sequências dos iniciadores e sondas foram analisadas no programa Auto Dimer (Vallone & Butler, 2004) para avaliar a formação de dímeros e *hairpins*. Todos os iniciadores e sondas foram sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA).

A lista contendo as características de cada um dos iniciadores e sondas utilizados no desenvolvimento dos protocolos de RT-qPCR *Duplex WNV/SLEV e Quadriplex ILHV/ROCV/TBEV/JEV* estão disponíveis no Quadro 3.

Quadro 3 - Características dos iniciadores e sondas utilizados no desenvolvimento dos novos protocolos de RT-qPCR para flavivírus neuroinvasivos.

Vírus	Nome	Sequência	Posição	GenBank #	Referência
WNV	WNV NS2A F	ATG ATT GAY CCT TTT CAG YTG GGC	3538-3561	NC_009942	Xu et al., 2022
	WNV NS2A R	CTR ATC TTG GCI GTC CAC CTC TT	3623-3601		
	WNV NS2A Probe	FAM/TCT GGT YGT GTT CTT GGC CAC C/BHQ1	3564-3585		
SLEV	SLEV NS5 10059F	CGY ACY ACA TGG TCA ATT CAT GG	10059-10081	NC_007580	Este estudo
	SLEV NS5 10214R	TCT CTC TTT CCT AGR TAK GGA ATG TC	10213-10188		
	SLEV NS5 10114 Probe	HEX/TGA GYG TCT GGA ACC GYG TGT GGA TTG AAG A/BHQ1	10114-10144		
ILHV	ILHV 2157 F	CAA GAC TGG CAG CAC AAT TGG	2141-2161	NC_009028	Este estudo
	ILHV 2253 R	GAA AAT TCC ACC CAC AGA ACC A	2252-2231		
	ILHV 2184 Probe	FAM/TTG GAA GGG AGC TCA AAG GTT TGC TGT CCT/BHQ1	2180-2209		
ROCV	ROCV E 2139F	TGG CAT AAG TCT GGT AGT GTG ATC	2136-2159	AY632542	Este estudo
	ROCV E 2295 R	TCC TCC GAA GAG TCC ATG AAT TC	2291-2269		
	ROCV E 2193 Probe	HEX/CAA CGC ATG GCC GTG CTA GGT GAA ACT G/BHQ1	2193-2220		
TBEV	F-TBE 1	GGG CGG TTC TTG TTC TCC	10069-10088	NC_001672	Schwaiger et al., 2003
	R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT	10262-10243		
	TBE-Probe-WT	Texas Red/TGA GCC ACC ATCA CCC AGA CAC A/BHQ2	10112-10142		
JEV	JEV 10711 F	CCA AGC CTC GTC TAR GAT GCA	10711-10731	NC_001437	Este estudo
	JEV 10871 R	ATT CCC AGG TGT CAA TAT GCT GTT	10805-10840		
	JEV 10805 Probe	Cy5/AAG CTG TAG AGG AGG TGG AAG GAC TAG AGG TTA GAG/BHQ2	10884-10861		

Fonte:

Autoria

própria.

3.2.1.2. Extração de RNA

O RNA viral de SLEV e WNV utilizado nas etapas de padronização foi extraído a partir de sobrenadante de cultura de células Vero infectadas com os respectivos vírus, utilizando o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Para isso, foi usado um volume de 280 µL de sobrenadante de cultura e o procedimento de extração seguiu conforme as recomendações do protocolo do fabricante.

3.2.1.3. Produção e clonagem dos padrões de RNA sintético

Para padronização dos protocolos de RT-qPCR, foi necessária a produção de padrões de RNA sintetizado *in vitro* para construção das curvas padrões para os vírus WNV, SLEV, TBEV e JEV. Para isso, três plasmídeos (PUCIDT-AMP) contendo sequências nucleotídicas de 920 pb dos vírus WNV (região NS5/3'NTR, posição no genoma de 10.048-10.968, isolado NY99, GenBank: MZ605381), TBEV (região NS5/3'NTR, posição no genoma de 10.221-11.141, isolado de referência, GenBank: NC_001672) e JEV (região NS5/3'NTR, posição no genoma 10.031-10.951, isolado JEV/mosq/YN/2016, GenBank: MH385014) foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA).

Para SLEV, o plasmídeo foi produzido *in house*. A sequência do isolado de SLEV pertencente à coleção da SAARB, com genoma completo disponível no GenBank (cepa BeAr23379, GenBank #EF158048) foi usado como base para o desenho de um par de iniciadores flanqueando a região alvo do RT-qPCR: SLEV Clone Sall-9781F (GTCGACCACAATTGGCAGGAGGTG) e SLEV Clone KpnI-10629R (GGTACCCAGACAGCACCTTTAGCATG). Esses iniciadores foram utilizados para amplificação de um fragmento de 860pb a partir do RNA viral extraído de sobrenadante de cultivo celular, usando o kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), conforme instruções do fabricante.

Em seguida, o produto do RT-PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1%, 45 min a 120 V) para observação da banda correspondente. O produto de PCR que apresentou a banda de tamanho correto foi selecionado para clonagem.

Primeiro, o fragmento de DNA passou por um processo de adenilação de suas extremidades 3', favorecendo sua inserção em um vetor de clonagem plasmidial pela técnica de clonagem do tipo TA. Um volume de 5 µL de produto de PCR foi misturado a 1,5 µL de dATPs (50 µM), 3 µL de Platinum Taq DNA polimerase (3 U, Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA), 1,5 µL de tampão (1x – 250 mM Tris-HCl pH 8.3, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA), 2,25 µL de cloreto de magnésio (1,5 mM) e água livre de RNase e Dnase para um volume total de 15 µL. A mistura foi incubada a 70 °C por 30 minutos. Para a inserção do produto de PCR adenilado no vetor de clonagem, foi utilizado o kit TOPO TA cloning (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA), conforme instruções do fabricante.

Em seguida, tanto o plasmídeo produzido *in house* (SLEV) quanto os adquiridos comercialmente (WNV, TBEV e JEV) foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* quimiocompetentes TOP10 (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA). Brevemente, 2,5 µL de plasmídeo ligado foram adicionados a 50µL de bactérias que foram, então, incubadas em gelo por 30 min. Posteriormente, foi realizado um choque térmico com incubação de 30 seg a 42 °C, seguida de incubação de 2 min em gelo. Depois, 250 µL de meio nutritivo SOC foram adicionados à reação de transformação e as bactérias foram incubadas em *shaker* a 37 °C por 1 h sob agitação de 525 RPM. Por fim, as bactérias foram semeadas em placas contendo meio estéril Luria-Bertani (LB) com ampicilina por 16 h para crescimento das colônias.

Posteriormente, o plasmídeo foi extraído das células utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os plasmídeos foram então linearizados e submetidos ao processo de transcrição *in vitro* utilizando o kit Megascript T7 (Thermo-Fisher Scientific, Ambion, Waltham, MA, EUA). O produto da reação de transcrição foi purificado e concentrado com o auxílio do kit MegaClear (Thermo-Fisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, depois, quantificado utilizando o kit Qubit RNA BR Assay (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA), analisado no fluorímetro digital Qubit 2.0 (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA) e, posteriormente, armazenado a -80 °C até o uso.

3.2.1.4. Quantificação dos estoques virais por RT-qPCR

Para WNV e SLEV, foi utilizado o RNA viral quantificado para as etapas seguintes da padronização dos protocolos. A quantificação do RNA viral extraído dos isolados foi realizada por meio de uma quantificação absoluta por RT-qPCR utilizando curvas padrão preparadas a partir do RNA transcrito *in vitro* produzido na etapa anterior. Para WNV e SLEV, foram utilizados protocolos de RT-qPCR de referência, conforme descrito previamente (Lanciotti et al., 2000; Lanciotti Kerst, 2001).

A reação foi realizada com uso do kit Superscript III® Platinum® One-Step Quantitative RT-qPCR System (Invitrogen) com um volume total de 25 µL, contendo 12,5 nanomols de cada iniciador, 5 nanomol de sonda (marcada com FAM e BHQ1) e 5 µL do RNA viral. As corridas foram realizadas no equipamento 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). As condições de ciclagem foram 50 °C durante 30 minutos, seguida de um ciclo de 2 minutos a 95 °C e, após, por 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A concentração de genoma de WNV e SLEV foi determinada, em cópias/µL de RNA, pela análise da curva padrão realizada pelo programa 7500 Software versão 2.3.

3.2.1.5. Reações de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o kit Luna® Probe One-Step RT-qPCR 4X Mix with UDG (No ROX) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Cada reação foi composta de volume de 5 µL de RNA, 5 µL de mistura de reação, 8 µL de água livre nucleases e 2 µL de mistura de iniciadores e sondas, resultando em um volume total de reação de 20 µL. Foi adicionado, à mistura de reação, o corante de referência passiva ROX (Thermo-Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham, MA, EUA) para as reações que não continham sonda de TBEV, para uma concentração final de ROX de 50 nM. As concentrações finais de iniciadores e sondas para cada alvo foram definidas conforme descrito a seguir. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Thermo-Fisher Scientific, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). As condições de ciclagem foram 25 °C por 30 segundos para eliminação de contaminação; 55 °C durante 10

minutos para transcrição reversa; seguida de um ciclo de 1 minutos a 95 °C para desnaturação inicial e, após, por 45 ciclos de 10 segundos a 95 °C (desnaturação) e 1 minuto a 60 °C (anelamento/extensão com captura).

3.2.1.6. Otimização das condições ideais de reação

A padronização das concentrações ideais de iniciadores e sondas foram seguidas consoante as recomendações dos fabricantes dos kits. Para isso, foi testada uma matriz 4x4 de concentrações de iniciadores e sondas para cada alvo (WNV, SLEV, IHLV, ROCV, TBEV e JEV) (Figura 4).

Quadro 4 – Matriz de concentrações em nanomol de iniciadores e sondas.

		Iniciador			
		1000	750	500	250
S o n d a	250	1000/250	750/250	500/250	250/250
	200	1000/200	750/200	500/200	250/200
	150	1000/150	750/150	500/150	250/150
	100	1000/100	750/100	500/100	250/100

Para cada combinação de concentração, foram testados um controle negativo (CN), um controle sem alvo (NTC – *non template control*) e um controle positivo (CP) para cada vírus com valores de Ct entre 20-25. Foram selecionadas as concentrações de iniciadores e sondas que obtiveram o menor valor de Ct e maior valor de ΔR_n nos controles positivos, além de não apresentar amplificação nos controles negativos.

A avaliação da eficiência de reação, coeficiente de linearidade (R^2) e *slope* foi realizada utilizando uma curva padrão para cada alvo, construída a partir do RNA viral quantificado (WNV, SLEV, ILHV e ROCV) ou a partir do RNA transcrito *in vitro* (TBEV e JEV). Cada curva padrão foi composta de diluições de 1:10 com concentrações variando de 10^8 cópias/ μL até 10^1 cópias/ μL . O intervalo das diluições no qual os protocolos apresentaram os melhores valores de R^2 (coeficiente de linearidade) e de eficiência foi definido como faixa dinâmica linear (FDL) e o valor da última diluição detectável foi definido como o limite de quantificação (LQ).

Foi analisada a performance de cada protocolo separado (em *singleplex*) e depois comparada com a performance dos protocolos juntos (em *multiplex*), no formato *duplex* para WNV e SLEV e *quadriplex* para ILHV, ROCV, TBEV e JEV.

3.2.1.7. Especificidade Analítica

A especificidade analítica dos protocolos, *duplex* WNV/SLEV e *quadriplex* ILHV/ROCV/TBEV/JEV foi avaliada através do teste de um painel de amostras positivas para diversos vírus (Quadro 5).

Quadro 5 - Vírus testados no painel de especificidade.

Patógeno	Tipo de Amostra
Vírus Dengue Tipo 1	Sangue
Vírus Dengue Tipo 2	Soro
Vírus Dengue Tipo 3	Sangue
Vírus Dengue Tipo 4	Soro
Vírus da Febre Amarela cepa H111	Cérebro de camundongo infectado
Vírus da Febre Amarela cepa 17D	Cérebro de camundongo infectado
Vírus Mayaro	Sobrenadante de cultivo celular
Vírus da Encefalite Equina do Oeste	Sobrenadante de cultivo celular
Vírus da Encefalite Equina do Leste	Sobrenadante de cultivo celular
Vírus da Encefalite Equina Venezuelana	Sobrenadante de cultivo celular
Vírus Oropouche	Sobrenadante de cultivo celular
Vírus Chikungunya	Cérebro de camundongo infectado

Fonte: Autoria própria.

3.2.1.8. Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica dos protocolos, *duplex* WNV/SLEV e *quadriplex* ILHV/ROCV/TBEV/JEV foi definida como a menor quantidade de alvo (RNA viral ou *in vitro*, em cópias/ μ l) capaz de ser detectada com mais de 95% de intervalo de confiança (IC). Para isso, foram testadas 11 diluições seriadas de 1:5 dos RNAs padrão de cada vírus com concentrações variando de 1×10^5 cópias/ μ L até $1,02 \times 10^{-2}$ cópias/ μ L. Cada diluição foi testada em oito replicatas em uma única corrida. As replicatas que obtiveram valor de Ct inferior a 38 foram consideradas positivas. Por fim, os resultados obtidos foram utilizados para calcular o limite de detecção para cada vírus por meio de uma análise de regressão linear de *probit* usando o programa SPSS® Statistics, versão 25 (IBM®, Armonk, NY, USA).

3.2.1.9. Acurácia Diagnóstica

Para avaliar a acurácia diagnóstica do protocolo de RT-qPCR *duplex* WNV/SLEV na detecção do genoma viral em amostras de LCR humano, foi realizado um teste com um painel de amostras com resultados conhecidos (sem cegamento). Foram incluídas, na avaliação, 20 amostras de LCR de pacientes com suspeita de meningite/encefalite viral das previamente testadas como negativas para WNV e SLEV por RT-qPCR. Como não havia amostras clínicas positivas para WNV e SLEV disponíveis, foram incluídas na análise 20 amostras de LCR humano infectadas artificialmente por inoculação de quantidades variáveis de vírus WNV e SLEV. Todas as amostras foram testadas para o protocolo *duplex* WNV/SLEV desenvolvido nesse estudo e para os protocolos de RT-qPCR de referência utilizados pelo MS para diagnóstico molecular de WNV e SLEV. Todas as reações foram realizadas em duplicata e foram incluídos, NTC, CN e CP em cada corrida. Os resultados obtidos no painel foram comparados utilizando os protocolos do MS como ensaio de referência.

3.3. AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO IMUNOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS

3.3.1. Teste de Neutralização por Redução de Placas convencional – PRNT⁹⁰

Os soros dos pacientes foram inativados por calor através da incubação em banho-maria a 56 °C por 30 min, e, em seguida, foi feita uma diluição seriada com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Gibco™ - Life Technologies) contendo 2% de albumina de soro de bovino e 1% de penicilina/estreptomicina a partir de 1:20 a 1:20480. Para o volume de 300 µL de soro em cada frasco da diluição, um volume igual de ZIKV e DENV (testados separadamente) foi adicionado contendo 100 PFU/poço. A mistura foi incubada a 37°C durante 1h, numa placa de 96 poços.

Após incubação às alíquotas de 100 µL de soro, foram acrescentados vírus selvagem e inoculadas sobre a monocamada confluenta de células Vero na ordem de 200.000 céls/mL em uma placa de cultura de célula de 24 poços, e então colocadas num agitador rotativo. E, em seguida, a placa foi incubada por 1h a 37 °C. Passado o período de incubação, o meio foi removido, e acrescentado 500 µL de carboximetilcelulose a 0,8%. As células foram incubadas durante 4-5 dias a 37 °C numa mistura de ar umidificado contendo 5% de CO₂. As placas de vírus foram fixadas com solução de formaldeído a 3,7%, e seguida, coradas com 500 µL de Cristal Violeta por 5 min. O excesso de Cristal Violeta foi removido com água filtrada. Um controle positivo e controle negativo foram acrescentados ao teste. A metodologia seguiu as orientações realizadas por Castanha et al. (2013).

A porcentagem de redução no número de placas foi calculada em comparação com o controle de crescimento do vírus, e a diluição mais elevada do soro que resultou na redução de 90% no número de placas em comparação com o controle de crescimento do vírus foi determinada.

3.3.2. Teste de Neutralização por Redução de Placas com Vírus *Reporter* (RVNT⁹⁰) – Plataforma Citation™ 5.0 BioTek

3.3.2.1. ZIKV Rluc e DENV2 Rluc

Os soros dos pacientes foram inativados por calor através da incubação em banho-Maria a 56 °C por 30 min, e, em seguida, foi feita uma diluição seriada com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Gibco™ - Life Technologies) contendo 2% de albumina de soro de bovino e 1% de penicilina/estreptomicina a partir de 1:20 a 1:51200. Após a diluição, adicionou-se 25 µL/poço de vírus *reporter* ZIKV Rluc e DENV Rluc, testados separadamente. A mistura foi incubada a 37 °C durante 2 h, numa placa de 96 poços.

Após incubação, 50 µL de soro mais o vírus *reporter* foram inoculados sobre a monocamada confluyente de células Vero na ordem de 15.000 céls/mL em uma placa de cultura de célula de 96 poços (previamente cultivada). E, em seguida, a placa foi incubada por 48 h a 37 °C numa mistura de ar umidificado contendo 5% de CO₂. Então, com auxílio de um leitor de multidetecção e captura de luminescência (Cytation™ 5.0 - BioTek), a atividade da luciferase, foi quantificada como a luminescência produzida acima dos valores de *background*. Consoante a metodologia descrita por Deng et al. (2016), os valores de *background* produzidos na ausência de Renilla luciferase são baixos, e a atividade de luciferase é diretamente proporcional à luminescência total, ou seja, a quantidade de anticorpos neutralizantes presentes no soro do paciente.

3.3.2.2. ZIKV mCherry

Quatro soros por placa de 96 poços foram testados em duplicata. Os soros foram diluídos de forma seriada partindo de um título de 1:100 em meio DMEM com 2% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina. Os soros diluídos foram incubados a 37 °C por 1 h com ZIKV mCherry. Após a incubação, os complexos soro-vírus foram adicionados a uma placa de poliestireno de 96 poços na cor preta (µclear® - greiner bio-one), para infectar as células Vero por 48 h. As células infectadas por ZIKV mCherry produziram fluorescência vermelha, leitor de multidetecção e captura de

imagem celular (Cytation™ 5.0 - BioTek). A porcentagem de células positivas de fluorescência no poço controle sem soro de paciente foi de até 100%. Os poços com soro dos pacientes que apresentavam células positivas de fluorescência foram normalizados conforme os poços controles. Os títulos de neutralização foram calculados tomando quatro parâmetros no software GraphPad Prism 7 (Shan et al., 2017c).

3.3.3. Teste de Neutralização por Redução de Placas com Vírus *Reporter* (RVNT⁹⁰) - Plataforma Glomax® Promega

3.3.3.1. Recuperação do Plasmídeo

A tecnologia do RVNT⁹⁰ foi cedida por Pei-Yong Shi (UTMB) por meio de plasmídeo de DENV e ZIKV contendo a sequência *reporter* Rluc. Esse mesmo vírus foi encaminhado a SAARB, para auxiliar o projeto de produção da vacina de ZIKV realizado em parceria com o MS do Brasil/Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS)/University of Texas Medical Branch (UTMB).

Portanto, as etapas subsequentes relacionadas à padronização o RVNT⁹⁰ na Plataforma Glomax® Promega foram realizadas para os dois vírus.

Para isso, a recuperação desse plasmídeo iniciou pela etapa de transformação bacteriana, na qual foram adicionados, em tubos de 0,5 mL, 25 µL de tampão de transformação (Tris-HCl 5mM e MgCl₂ 5 mM, pH 7,4), 2,5 µL de cada plasmídeo e 50 µL da bactéria quimiocompetente *Escherichia coli* TOP 10 (One Shot® - Invitrogen), colocados em gelo por 30 min. Logo, o conteúdo sofreu choque térmico por 30 segundos em banho-maria a 42 °C, e em seguida, foi mantido em gelo por dois minutos. Em seguida, foi adicionado ao conteúdo, 250 µL de meio SOC (*Super Optimal broth with Catabolite Repression*) e incubado por uma hora a 37 °C sob rotação de 225 rpm/min. Depois, o conteúdo foi semeado em placas de Petri com meio LBA com 100 mg/µL de ampicilina e incubados a 37 °C por 16 a 18 horas.

Após a etapa de transformação, o plasmídeo foi submetido a uma etapa de purificação, que se iniciou a partir da seleção de colônias isoladas. Estas colônias foram então inoculadas em 15 mL de meio Luria Bertani (LB) com ampicilina e o volume foi incubado a 37 °C sob rotação 180 rpm/min por até 16 horas para

crescimento. Passado o período, as culturas bacterianas foram centrifugadas e o sedimento produzido foi submetido à etapa de extração de DNA plasmidial.

A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o kit Quick Plasmid DNA Miniprep (Invitrogen™) e/ou PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) conforme as instruções do fabricante. O extraído foi quantificado pelo fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen), seguido pela digestão enzimática dos clones com as enzimas de restrição apropriadas para a sequência genômica do plasmídeo. A digestão ocorreu por uma hora a 37 °C com água livre de nucleases, tampão CutSmart® (10X) e enzimas do fabricante New England Biolabs. Ao fim da digestão, o conteúdo foi submetido a uma corrida eletroforética em um gel de agarose a 1,5% corado com SYBR Safe (Invitrogen) para verificação do inserto. Os clones que apresentaram o padrão correspondente ao esperado foram submetidos ao processo de amplificação e extração de plasmídeo em alta escala (Midiprep e Gigaprep da Invitrogen e Midiprep da Promega).

Na ordem de midiprep foi utilizado um conteúdo de 500 mL de meio líquido. Seguida da combinação de métodos de extração de plasmídeo e concentração física e química de DNA. Na prática, houve troca de kit de extração (Promega), uso do equipamento Eppendorf® Concentrator 5301 e de acetato de amônio, respectivamente.

Para detecção e confirmação do genoma viral no plasmídeo, foi feita uma reação de RT-qPCR para DENV e ZIKV tal como na rotina do laboratório de biologia molecular da SAARB/IEC/SVSA/MS. A sequência completa do plasmídeo foi confirmada por sequenciamento de nova geração. O plasmídeo purificado foi utilizado na construção da biblioteca genômica através da metodologia do kit NexteraXT DNA Library Preparation. A biblioteca foi avaliada por quantificação no Qubit® 2.0, e o tamanho dos fragmentos produzido por meio do kit High Sensivity DNA Analyses (Agilent Technologies). A biblioteca foi então sequenciada aplicando a metodologia paired-end através da plataforma NextSeq (Illumina) com a utilização do kit NextSeq 500/550 Mid Output (300 ciclos) conforme instruções do fabricante.

3.3.3.2. Preparação do estoque vírus *reporter*

O produto equivalente a 10 µg de cada plasmídeo obtido da amplificação e extração de plasmídeo em alta escala foi linearizado com a enzima de restrição Clal para a transcrição *in vitro*. Após a linearização, o plasmídeo foi extraído com fenol-clorofórmio e clorofórmio, e precipitado com etanol e recuperado em 15 µL de água livre de nucleases (Ambion, Austin, TX). O conteúdo foi submetido ao kit Mmessage Mmachine (Ambion) para transcrição de RNA em uma reação de 20 µL com adição de 1 µL de solução de GTP a 30 mM. A reação foi incubada por duas horas a 37 °C seguido da adição de 1µL de turbo DNase I para remover os moldes de DNA. O RNA foi precipitado com cloreto de lítio, lavado com etanol a 70%, recuperado em água livre de nuclease, quantificado por espectrofotometria e armazenado a -80 °C.

Aproximadamente 10 µg de RNA foram eletroporados em 8×10^6 células Vero em 0,8 µL de solução de eletroporação Ingenio Solution (Mirus, Madison,WI), em cubetas de 4 mm no equipamento GenePulser (BioRad) configurado a 0.45 Kv e 25 Mf. A transfecção teve continuidade pulsando três vezes, com três segundos de intervalo entre um pulso e outro. Após dez minutos de recuperação à temperatura ambiente, as células transfectadas foram misturadas ao meio de cultura e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Durante a incubação, os vírus *reporter* foram coletados do sobrenadante de cultura por dias sucessivos e clarificados por centrifugação a 500 g e armazenados a -80 °C. O sobrenadante foi coletado no momento anterior a destruição da monocamada celular como consequente resultado da replicação viral. Esse sobrenadante compôs o estoque de vírus *reporter* utilizado na realização RVNT⁹⁰.

Para confirmar a replicação dos vírus *reporter*, as células inoculadas foram submetidas à técnica de imunofluorescência indireta. Na qual, células coletadas de diferentes dias pós transfecção (dpt) foram fixadas com acetona a 100% gelada e mantida a -20 °C em lâmina própria para IFI por 10 minutos. Em seguida, o anticorpo primário (policlonal anti-*flavivirus* grupo B) numa diluição 1:20 foi acrescentado e mantido em câmara úmida por 30 minutos a 37 °C (Gluber et al., 1984). Passado o período, de seguimento uma etapa de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) por 10 minutos.

Na sequência foi incluído o anticorpo secundário (anti-*mouse* conjugado com isotiocianato de fluoresceína) (FITC) (Cappel, EUA) na diluição de 1:800 por 30

minutos. E então, o anticorpo secundário não ligado foi removido por lavagem. Finalmente, uma gota de glicerina foi adicionada em cada poço, imediatamente anterior a adição da lamínula. Uma vez montada, a lâmina foi mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, e posteriormente, analisada sob microscopia de fluorescência.

O estoque também foi avaliado na forma de cinética de replicação viral. Dessa forma, os sobrenadantes das células transfectadas foram submetidos à extração do RNA viral utilizando o kit PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) e o aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) para amplificação de RNA.

3.3.3.3. Qualidade do vírus *reporter*

Os vírus *reporter* produzidos em cultura de célula Vero foram submetidos ao teste de estabilidade. Além disso, uma etapa de otimização das concentrações de reagentes foi realizada para a melhor detecção da intensidade de luz de Renilla luciferase, que foi produzida a partir da infecção pelos vírus *reporter*. Para tanto, foram cultivadas, em placas brancas de 96 poços, duas concentrações diferentes (3×10^6 e 6×10^6 céls/ μL) de células Vero. No dia seguinte, foram acrescentadas ao cultivo, diluições seriadas de vírus *reporter* (1:2 a 1:32) e então incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . Passado o período de 24 h, 60 h e 96 h, as placas receberam concentrações diferentes de substrato da luciferase ViveRen (Promega), (1:1000 e 1:3000), e após 2 min de reação, a luminescência foi imediatamente captada pelo GloMax®. A captação da luminescência foi realizada nos três momentos (24, 60 e 96 h). As concentrações de células Vero foram obtidas por quantificação no aparelho MOXI Z Mini (Orflo). Os sinais de luciferase foram medidos dias após a eletroporação do RNA para avaliar a replicação viral.

Durante determinação do título viral por unidades formadoras de placas (PFU), células Vero a 6×10^6 céls/mL foram colocadas em placas de 24 poços e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 por 24 horas para formação de monocamada confluenta. Alíquotas do estoque viral foram diluídas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) a 2% de soro bovino fetal (SBF) e adicionadas em diluições seriadas decimais até 10^{-6} dos vírus. Para cada diluição, 100 μL foi adicionado em quadruplicata. As células foram incubadas por uma hora e agitadas a cada 15 minutos para facilitar a adsorção viral. Após a incubação, 500 μL de meio semi-

sólido (DMEM a 2% e carboximetilcelulose 1,6%) e 1% de penicilina/estreptomicina foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C por cinco dias (período pré-determinado em rotina diagnóstica para visualização da formação da infecção viral).

A visualização da formação da infecção viral foi mensurada pela presença de placas contracoradas com cristal violeta com prévia fixação em formaldeído, e adicionalmente, pela formação de foco de infecção marcada através da relevação por anticorpo marcado com peroxidase após fixação com metanol-acetona.

Na primeira, após a incubação de cinco dias, o meio contendo carboximetilcelulose foi removido e a placa de 24 poços imersa em solução tamponada com formaldeído a 3,7% durante 1 hora. Após a fixação, a placa foi lavada duas vezes por imersão em água. Após removido o fixador, cristal violeta a 1% foi acrescentado a cada poço da placa de 24 poços e mantido por 10 minutos. As placas visíveis foram contadas e os títulos virais (PFU/mL) calculados.

Na segunda, ou técnica de imunofoco, células em placas de 24 poços foram fixadas com metanol-acetona gelado (1:1) por 15 minutos. Contado o tempo, as células foram lavadas com PBS a 1% por 10 minutos sob homogeneização, repetindo-se por 3 vezes essa etapa de lavagem. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário (anticorpo policlonal obtido a partir de fluido *reporter* hiperimune de camundongo) Tesh et al. (2001) e incubado a 4°C durante a noite. A produção desse anticorpo policlonal foi previamente descrita por Tesh et al. (2001). Passada a incubação, cada poço foi submetido à etapa de lavagem (PBS a 1% por 10 minutos sob homogeneização, repetindo-se por três vezes essa etapa de lavagem) e foi acrescentado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:1000 e mantido por duas horas (KPL, Gaithersburg, MD). Finalmente, ao tempo transcorrido, e uma subsequente lavagem como já descrito, foi realizada a revelação pela adição do substrato aminoetilcarbazol (ENZO Life sciences) preparado seguindo critérios determinados pelo fabricante.

3.3.3.4. Execução do RVNT⁹⁰

Os soros dos pacientes foram inativados em banho-maria a 56 °C por 30 minutos, e, em seguida, foi feita uma diluição seriada a partir de 1:20 a 1:56.200 com

meio DMEM contendo 2% de albumina de soro bovino e 1% de penicilina/estreptomicina sem vermelho de fenol. Após a diluição, foi acrescentado 30 mL por poço de vírus *reporter* ZIKV Rluc e DENV Rluc, testados separadamente. Em seguida, a mistura foi incubada a 37 °C durante uma hora em uma placa de 96 poços transparentes. Após incubação, o conteúdo que incluía 50 mL de soro e o vírus *reporter* foram inoculados sobre a monocamada confluyente de células Vero (previamente cultivada) em placas de 96 poços na cor branca. Depois a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C em uma mistura de ar umidificado contendo 5% de CO₂ (Seguindo as etapas de teste realizadas no Citation™ 5.0 - BioTek).

A atividade da luciferase foi quantificada como a luminescência produzida acima dos valores de background no leitor de luciferase GloMax® – Promega, após 2 min de reação após o acréscimo de substrato Viveren Promega.

3.4. DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS EM LCR

3.4.1. Análise física, bioquímica, citológica e microbiológica em LCR

O exame físico foi realizado através da avaliação do aspecto, e cor do LCR após centrifugação (Fonseca et al., 2017). Enquanto, que a análise bioquímica, a partir da dosagem de glicose e proteínas, foram mensuradas de forma automatizada através do aparelho CMD 800i X1 (Wiener lab Group), seguindo as recomendações do fabricante.

A contagem total de glóbulos brancos foi feita na câmara de Fuchs-Rosenthal por microscopia direta de campo claro em aumento de 100x e 400x acrescido de líquido de Turk. A pesquisa de hemácias, células bacterianas e fúngicas seguiu o método a fresco, na ausência do líquido de Turk, em câmara de Fuchs-Rosenthal. Para contagem diferencial, foi confeccionada lâmina microscópica de acordo com técnica de coloração hematológica de May Grünwald-Giemsa, após concentração em cito centrífuga, e submetida a aumento de 1000x sob imersão (Moraes-Rego et al., 1990).

As técnicas de coloração de Gram, Ziehl Neelsen e tinta da China avaliaram a presença de bactérias, micobactérias álcool-ácido resistentes e criptococos, respectivamente (Brasil, 2019b). A aglutinação por látex, para detecção de

antígenos de *Criptococcus spp.*, e a técnica de VDRL, para pesquisa de neurosífilis, também podem ser executadas sob indicação médica e/ou necessidade técnica adicional.

O semeio em ágar chocolate foi realizado logo após punção lombar, imediatamente após a chegada do material ao laboratório e identificação adequada do LCR. O semeio por esgotamento em ágar chocolate e incubar entre 35 °C a 37 °C até 72 horas em atmosfera de CO₂ com chama de vela sob umidade após a semeadura. Mediante solicitação para diagnóstico de micobactérias, de 5 a 10 gotas de LCR foram realizadas em meio de Lowestein-Jensen em tubo inclinado e incubados em atmosfera de aerobiose por até 60 dias a 35 e 37 °C. A identificação de fungos foi realizada incluindo de 5 a 10 gotas em tubos inclinados com ágar Sabouraud e Mycosel, incubados a 30 °C por 30 dias (Brasil, 2019b). Teste rápido molecular para tuberculose (TRMT-TB) e PCR para *Neisseria spp.* também nortearam a seleção das amostras.

3.4.2. Extração do RNA viral

Este método tem como princípio a purificação de RNA viral, baseado nas propriedades de ligação seletiva através da membrana de sílica. Tanto as amostras de LCR quanto de soros foram submetidos a extração do RNA viral utilizando o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini (QUIAGEN), conforme instruções do fabricante. Para isso, foram adicionados 1,12 mL de Tampão AVL + Carreador de RNA (concentração final de Carreador de 1 µg/µL) em um tubo de 5,0 mL. Em seguida foi acrescentado 280 µL da amostra ao tubo contendo Tampão AVL + Carreador de RNA. Os tubos foram então incubados a temperatura ambiente (TA) (15-25 °C) por 10 minutos. Após a incubação, foi adicionado 1,12 mL de etanol absoluto aos tubos, que foram submetidos à agitação mecânica vigorosa por 15 segundos.

Em seguida, foi transferido um volume 630 µL do lisado à coluna de sílica, e então, a coluna foi centrifugada a 6.000g por 1 minuto. Após a centrifugação, o tubo coletor contendo o expurgo foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor. Esse processo foi repetido até que todo lisado tivesse passado pela coluna. Para lavagem, foi adicionado 500 µL de tampão AW1 à coluna, seguido de centrifugação a 6.000g por 1 minuto. Depois foi feita uma segunda lavagem

utilizando 500 mL de tampão AW2, seguido de centrifugação à velocidade máxima por 3 minutos. Para secagem da coluna, foi realizada uma etapa adicional de centrifugação a 6.000 g por 1 minuto. Em seguida, a coluna foi transferida novamente para um tubo novo de 1,5 mL devidamente identificado. Foi adicionado 60 mL de tampão AVE, seguido de incubação por 1 minuto a TA. Por fim, a coluna foi descartada, e o RNA armazenado a temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até posterior uso.

3.4.3. Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (RT- qPCR)

Para a detecção do RNA viral foi utilizada a técnica de RT-qPCR utilizando iniciadores e sondas de hidrólise (TaqMan™) específicas para os principais *Flavivirus* neuroinvasivos. Para os vírus DENV, ZIKV, WNV e SLEV foram utilizados protocolos previamente publicados (Lanciotti et al., 1992; Santiago et al., 2013; Lanciotti et al., 2008; Vazquez, et al., 2016). As reações de RT-qPCR foram preparadas utilizando o kit comercial Superscript III Platinum One-Step RT-qPCR System com ROX Separado (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando um volume total de reação de 25 mL, contendo: 12,5 mL mix de reação com ROX; 5,5 mL água livre de nucleases; 1,0 mL mistura iniciadores F/R; 0,5 mL de sonda; 0,5 mL do mix de enzimas Superscript III + Taq DNA Polimerase e 5,0 mL de RNA extraído. As corridas foram realizadas no sistema de detecção de qPCR 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o seguinte programa de ciclagem: 30 minutos a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (transcrição reversa), seguidos por 2 minutos de desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, e com 45 ciclos de 15 segundos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturação) e 1 minuto a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (anelamento/extensão). As amostras foram analisadas em duplicata e consideradas positivas aquelas que apresentaram o valor de Ct (*cycle threshold*) menor que 37 (DENV) ou menor que 38 (demais vírus)

3.4.4. Teste de Inibição da Hemaglutinação (IH)

Os soros foram submetidos ao Teste de Inibição da Hemaglutinação (IH) para analisar a capacidade de anticorpos específicos em inibir a aglutinação produzida

por antígenos de arbovírus na presença de hemácias-controle (hemácia de ganso). Antígenos esses, preparados a partir de cérebros, fígados ou soros infectados de camundongos recém-nascidos, pela técnica de extração por sucrose-acetona, segundo o protocolo descrito por Shope (1963).

Adaptado a microplacas de poliestireno de 96 orifícios com fundo em “U”, LCR e soros foram testados em diluição inicial 1:20 até 1:1280 com 4 unidades dos antígenos, seguindo Clarke (1958). A técnica utilizada é adaptada de Rodrigues et al. (2010).

3.4.5. Imunoensaio enzimático (ELISA)

Para as amostras que apresentarem reatividade no IH por sorogrupo-específico de arbovírus foram submetidas ao ensaio imunoenzimático de captura de IgM (ELISA). A pesquisa de anticorpos da classe IgM é necessária para avaliação de infecção recente por arbovírus (Kuno et al., 1987; Henriques et al., 2020). A técnica *in house* seguiu o protocolo padronizado pela SAARB, nos quais antígenos de ZIKV, DENV, WNV e SLEV produzidos em camundongos pelo método de sucrose-acetona na diluição ótima mediante a titulação prévia do antígeno. O anticorpo monoclonal 6B6C-1 conjugado à peroxidase (CDC/EUA) e o substrato o TMB – ELISA – tetrametilbenzidina (KPL) foram utilizados. A leitura da absorção foi realizada em espectrofotômetro (Celer polares) com filtro de 450 nm.

Quanto à interpretação dos resultados, foram atribuídos como não reagentes poços com densidade óptica (DO) < 0,2, indeterminado com DO entre 0,2 e 0,3 e reagente os que atingirem DO > 0,3 (Martin et al., 2000; Henriques et al., 2020).

3.5. ASPECTOS ÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS DO PROTOCOLO IMUNOLÓGICO

As amostras testadas neste estudo pertenciam à soroteca da SAARB/IEC/SVSA/MS. Os soros foram encaminhados dos estados do Alagoas, Pará, Paraíba, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Roraima, Rio Grande do Norte e Tocantins à SAARB, entre os anos de 2000 a 2016, para confirmação diagnóstica de casos suspeitos de dengue e Zika, através dos testes de RT-qPCR

(amostras na fase virêmica – até 5 dias após o início dos sintomas) e ELISA (amostras na fase convalescente – 5 dias após o início dos sintomas).

Após confirmação e liberação dos resultados às Secretarias Estaduais de Saúde de cada estado, uma alíquota dos soros foi testada para avaliação da aplicabilidade dessas novas ferramentas imunológicas na rotina do diagnóstico de dengue e Zika. Para isso, o projeto “Avaliação do teste de neutralização utilizando vírus *reporter* para diagnóstico de DENV e ZIKV em área endêmica para flavivírus” sob a responsabilidade da pesquisadora Daniele Barbosa de Almeida Medeiros, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IEC sob dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e parecer 3.601.702 (Anexo 1A).

Para validação da plataforma Cytation™ 5.0 BioTek, foram selecionados 76 soros e categorizados em quatro grupos. O primeiro grupo de fase aguda para dengue, o segundo de fase convalescente para dengue ambos coletados anteriormente à entrada de ZIKV no Brasil. O terceiro de fase aguda para zika e quarto grupo de fase convalescente para zika.

As amostras testadas GloMax® Promega foram oito soros (quatro positivos para DENV e quatro positivos para ZIKV, como definido nos soros foram utilizados na validação no Cytation™ 5.0 BioTek).

3.6. ASPECTOS ÉTICOS E CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS O INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS NEUROINVASIVAS NO ESTADO DO PARÁ EM LCR

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IEC/SVSA/MS como instituição proponente e HUIBB/UFPA/EBSERH como instituição co-participante, intitulado “Investigação de arbovírus em casos de doença neuroinvasiva em Hospital Universitário no Estado do Pará”.

Os pesquisadores atenderam às recomendações e orientações solicitadas pelas Comissões de Éticas das Instituições envolvidas, baseadas nas diretrizes contidas na RESOLUÇÃO CNS Nº 466/2012, e disponibilizadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC/SVSA/MS) e Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto, Empresa Brasileira De Serviços Hospitalares (HUIBB/UFPA/EBSERH).

O projeto obteve aprovação para a retenção das amostras coletadas e dispensa de TCLE, e cujo número do parecer consubstanciado foi 5.461.824, e comprovante de aprovação em Anexo 1B.

A coleta de dados como gênero, idade, origem urbana ou rural e valores bioquímicos e citológicos de LCRs de paciente foi realizada por apenas um integrante da pesquisa que possuía senha individual de acesso restrito ao sistema do laboratório (I9lis) e respeitando o termo de confidencialidade e sigilo referente a essas informações. Coletas pontuais ao Aplicativo de Gestão para Hospitais Universitários (AGHUX) do HUJBB e GAL-PA (Gerenciador de Ambiente Laboratorial).

3.6.1. Perfil das amostras

As amostras utilizadas nesse estudo foram de LCR de pacientes atendidos com suspeita clínica de doença neuroinvasiva de etiologia viral pelo HUJBB (consoante os itens, por livre demanda, no período de 2022 a 2023, logo após a autorização do Comitê de Ética e Pesquisa.

Para as amostras de LCR, foram feitas alíquotas em tubos criogênicos com volumes variando de 0,25 a 2,0 mL, que foram destinados aos ensaios de biologia molecular e ensaios sorológicos. Após o preparo do material, essas amostras foram encaminhadas em caixa térmica com conservante comercial portátil à SAARB, para armazenamento em ultra-freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior pesquisa de flavivírus. Quando possível, amostras de soro foram encaminhadas em volumes de 1 a 4 mL, sob as mesmas condições de transporte descritas anteriormente.

3.6.2. Critério de inclusão de amostras

As amostras incluídas nesse estudo foram de LCR e soros de pacientes com meningite a esclarecer, encefalite ou de outra doença neurológica de origem infecciosa atendidos no HUJBB que tiveram diagnóstico bioquímico e citológico na ULAC-HUJBB negativos para etiologia bacteriana e fúngica;

Estão incluídas, também, amostras de LCR e soros de pacientes atendidos no HUJBB com diagnóstico confirmado ou suspeita clínica, epidemiológica e/ou laboratorial de doença neuroinvasiva de etiologia viral.

3.6.3. Critério de exclusão de amostras

Foram excluídas deste estudo, amostras de LCR e soros de pacientes com suspeita de doença neuroinvasiva que tiveram diagnóstico laboratorial (bioquímico, citológico e microbiológico) na ULAC-HUJBB positivos para *Streptococcus spp.*, *Neisseria spp.*, *Criptococcus spp.*, micobactérias tuberculoide e não tuberculoide, *Angistrongylus cantonensis* ou outras etiologias bacterianas, fúngicas ou parasitárias;

Além disso, foram excluídas, amostras com volume inferior a 500 µL, insuficiente para realização das alíquotas que foram utilizadas no trabalho e a manutenção da reserva técnica da ULAC (a reserva técnica serve como controle posterior nos casos de esclarecimento diagnóstico adicional mediante solicitação médica) e amostras de LCR que não tiveram diagnóstico bioquímico e citológico realizados, por eventual demanda, ou soros coletados por suspeita de doença neuroinvasiva, cujos líquidos não foram coletados, também foram excluídos da pesquisa.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos e estimadores de desempenho para avaliação dos protocolos diagnósticos e a diagramação dos resultados foram realizados no programa Bioestat (Bioestat Program version 5.3; Ayres et al., 2007) e no *GraphPad Prism v7.02*.

Para análises de associação, foi utilizado o teste Qui-Quadrado, e para análises de concordância, o teste Kappa. O valor de Kappa varia de menos um (-1 indica completa discordância) a um (1 indica completa concordância). Os valores de sensibilidade (S), especificidade (E), valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN), e valor de acurácia foram obtidos a partir de uma tabela de contingência

contendo o número de testes verdadeiros e falsos positivos, e verdadeiros e falsos negativos (Quadro 13 do anexo 2). Ainda no anexo 2 Quadro 14, estão especificados, os conceitos e as fórmulas, e para cada valor estatístico que foi calculado. O teste de McNemar foi utilizado para verificar a possível associação de grupos pareados calculados tendo como significância estatística um p-valor de $<0,05$.

Foi feita uma comparação entre os resultados obtidos em cada teste diagnóstico, onde um teste era avaliado em função de outro que foi tomado como referência. Dessa forma, foram comparados o RT-qPCR e o Semi-nested RT-PCR com ELISA como referência, o RT-qPCR com o Semi-nested RT-PCR como referência e vice-versa.

Para avaliar o desempenho dos testes de RVNT⁹⁰, a curva ROC foi traçada comparando RVNT⁹⁰ de DENV Rluc e de ZIKV Rluc, ZIKV mCherry, usando o teste de PRNT⁹⁰ convencional como teste de referência (padrão). O RVNT⁹⁰ ZIKV mCherry também foi avaliado usando, dessa vez, o RVNT⁹⁰ ZIKV Rluc como referência (Shan et al., 2007). O teste de ELISA foi comparado ao desempenho apresentado nos testes de neutralização, e traçados na curva ROC. A tabela de contingência presente no Anexo 2 foi utilizada para a análise dos testes de neutralização do vírus *reporter*.

4. RESULTADOS

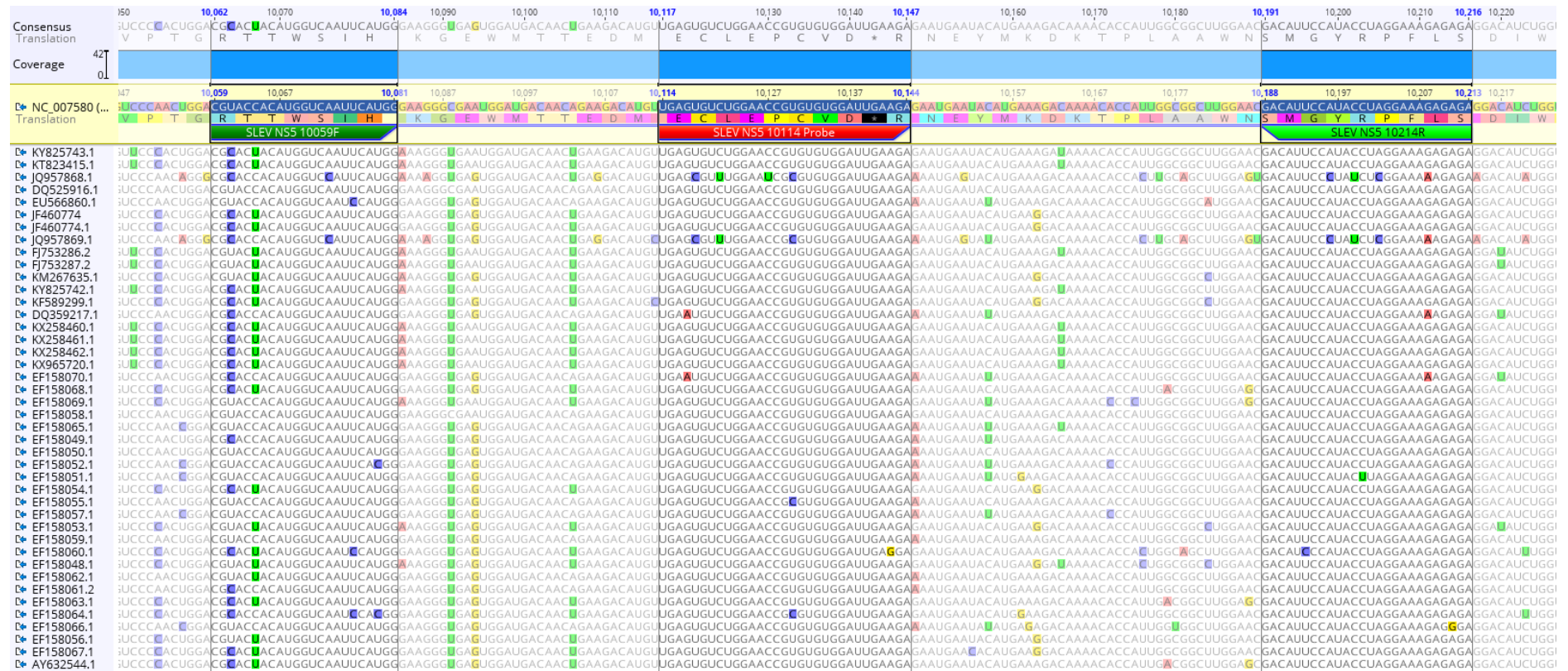
4.1. RT-qPCR *DUPLEX* DE WNV/SLEV E *QUADRIPLEX* DE ILHV/ROCV/JEV/TBEV

4.1.1. Desenho de iniciadores e sondas

Foram realizados alinhamentos das sequências de genoma completo dos vírus SLEV, ILHV, ROCV e JEV disponíveis no banco de dados GenBank para o desenho dos novos conjuntos de iniciadores e sondas utilizados neste estudo. O desenho dos iniciadores e sondas dos vírus WNV e TBEV havia sido realizado previamente (SCHWAIGER; CASSINOTTI, 2003; XU et al., 2022).

Para o SLEV, foi realizado um alinhamento de 43 sequências de genomas completos. Após uma análise inicial identificou-se a presença de várias regiões conservadas ao longo do genoma, mas, principalmente, nas regiões NS5 e 3'RNT. Três regiões na porção NS5 de SLEV foram escolhidas para o desenho de um par de iniciadores e uma sonda (Figura 7).

Figura 7 - Alinhamento das seqüências de SLEV utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas.



Legenda: Alinhamento das 43 seqüências utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas de SLEV. Um total de 42 seqüências foram alinhadas tomando a seqüência de padrão de SLEV do NCBI/GenBank como referência (GenBank # NC_007580). No canto esquerdo do gráfico estão todos os números de ascensão do GenBank das seqüências utilizadas. Acima está a seqüência consenso, seguida da seqüência de referência (GenBank # NC_007580) e logo abaixo as demais seqüências de SLEV. Posições dos iniciadores e sondas estão destacados, bem como os nucleotídeos com incompatibilidade. Fonte: Software de Análise Geneious R11.

Essas regiões estavam livres de estruturas secundárias de RNA estáveis às temperaturas superiores a 37 °C conforme evidenciado na análise da sequência realizada no Mfold. Para redução do número de incompatibilidades e assegurar uma maior cobertura de genomas, bases degeneradas foram introduzidas nas posições 3 e 6 do iniciador senso (SLEV NS5 10059F, bases duas bases Y), nas posições 15 e 18 do iniciador antissenso (SLEV NS5 10214R, bases R e K) e nas posições 5 e 17 da sonda (SLEV NS5 10114 Probe, duas bases Y). Uma análise no Primer-Blast (Ye et al., 2012) dos iniciadores SLEV NS5 10059F e SLEV NS5 10214R frente à coleção de nucleotídeos do GenBank retornou 197 sequências, todas pertencentes ao vírus SLEV. Dessas, 185 tiveram compatibilidade perfeita e 12 apresentaram incompatibilidade de apenas um nucleotídeo.

Uma análise similar da sonda SLEV NS5 10114 Probe utilizando a plataforma BLASTn (Zhang et al., 2000) retornou 100 sequências, todas do SLEV com 100% de identidade (valor de “e” de $9,0 \times 10^{-6}$). A análise do programa AutoDimer com todos os iniciadores e sondas de SLEV e WNV não identificou nenhuma complementaridade de bases importantes entre eles, sem formação de estruturas secundárias ou de dímeros.

Para os vírus ILHV e ROCV, não havia muitas sequências de genoma completo disponíveis no banco de dados, com apenas dois genomas completos do vírus ILHV (GenBank #AY632539 e #KC481679) e um do vírus ROCV (#AY632542). O desenho dos iniciadores e sonda do ILHV foi feito com base no alinhamento entre as duas sequências disponíveis, que apresentaram 94% de identidade nucleotídica. Para isso, foram selecionadas três regiões conservadas entre as duas sequências na porção do envelope do genoma de ILHV.

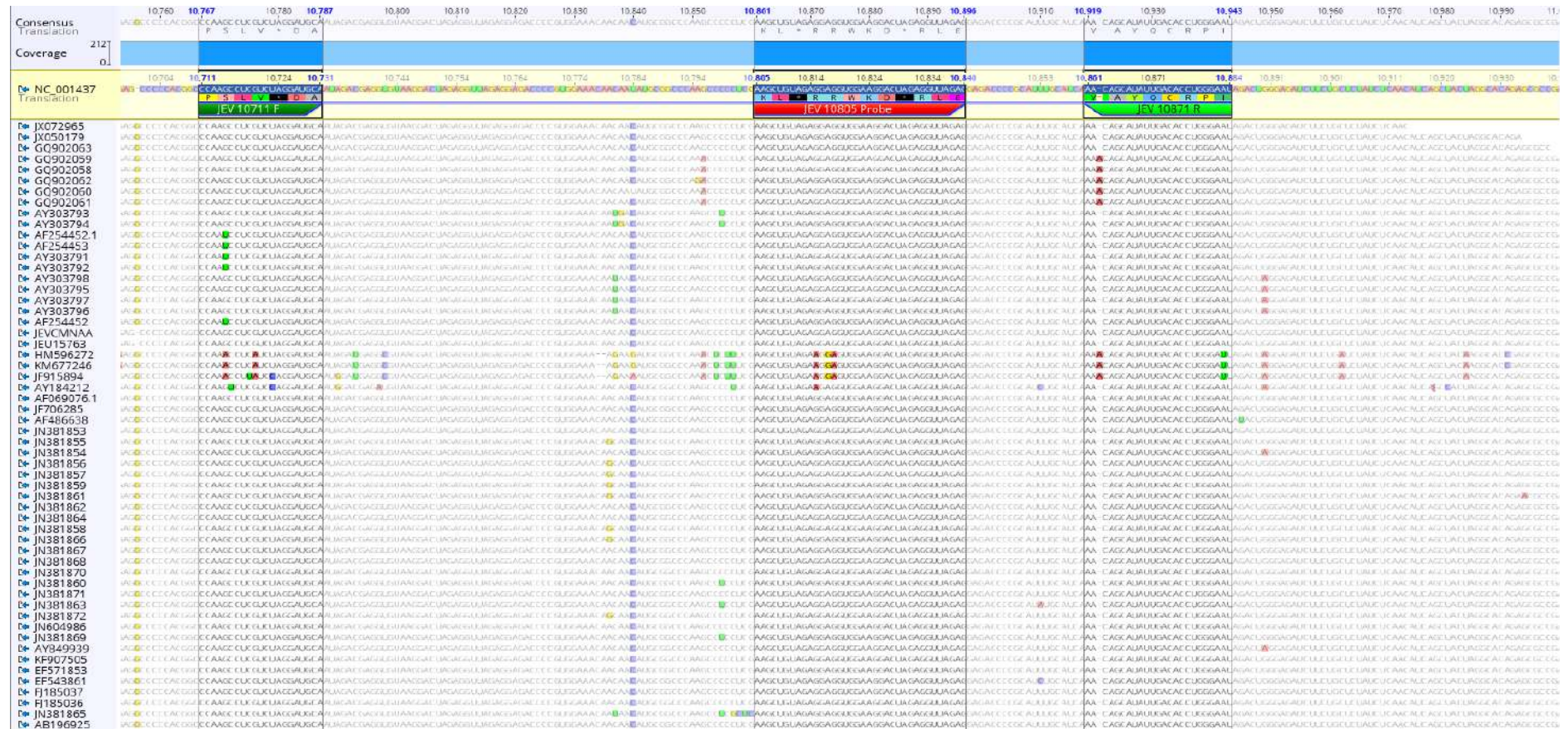
Já o desenho dos iniciadores e sonda do ROCV foi feito a partir da única sequência disponível para o vírus, também na porção do envelope do vírus. As regiões escolhidas estavam livres de estruturas secundárias de RNA estáveis a temperaturas superiores a 37°C.

A análise no Primer-Blast dos iniciadores ILHV 2157 F e ILHV 2253 R retornou 19 sequências, todas do vírus ILHV. Dentre essas, 11 tiveram compatibilidade perfeita, cinco tiveram uma posição incompatível no iniciador antissenso (ILHV 2253 R) e três sequências tiveram duas incompatibilidades,

também no iniciador antisense. De forma similar, a análise da sonda na plataforma BLASTn (Zhang et al., 2000) retornou 19 sequências com mais de 95% de identidade, todas do ILHV (valor de “e” de $8,0 \times 10^{-6}$). Para o ROCV, as análises no Primer-Blast e Blastn retornaram apenas a sequência AY632542, como esperado.

Para o JEV, foi realizado um alinhamento das 212 sequências de genomas completos disponíveis, o que permitiu a identificação da presença de regiões conservadas na porção 3'RNT do genoma de JEV. Três regiões foram escolhidas para o desenho de um par de iniciadores e uma sonda (Figura 8), todas livres de estruturas secundárias de RNA estáveis a temperaturas superiores a 37 °C.

Figura 8 - Alinhamento das seqüências de JEV utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas.



Legenda: Alinhamento das seqüências utilizadas no desenho dos iniciadores e sondas de JEV. Um total de 212 seqüências foram alinhadas tomando a seqüência de padrão de JEV do NCBI/GenBank como referência (GenBank # NC_001437). Apenas 56 seqüências estão representadas nesse gráfico. No canto esquerdo do gráfico estão todos os números de ascensão do GenBank. Acima está a seqüência consenso, seguida da seqüência de referência e logo abaixo as demais seqüências de JEV. Posições dos iniciadores e sondas estão destacadas, bem como os nucleotídeos com incompatibilidade. Fonte: Software de Análise Genéius R11.

Para redução do número de incompatibilidades e assegurar a maior cobertura possível de cepas de JEV, uma base degenerada foi introduzida na posição 15 iniciador senso (JEV 10711 F, uma base R). A análise no Primer-Blast retornou 326 sequências, todas pertencentes ao vírus JEV. Dessas, 323 tiveram compatibilidade perfeita, duas apresentaram incompatibilidade de dois nucleotídeos no iniciador antissenso e apenas uma apresentou incompatibilidade de um nucleotídeo também no iniciador antissenso. A análise da sonda de JEV no BLASTn retornou 100 sequências, todas do vírus JEV com 100% de identidade (valor de “e” de $2,0 \times 10^{-8}$).

A análise no AutoDimer com todos os iniciadores e sondas de ILHV, ROCV, TBEV e JEV não identificou nenhuma complementaridade de bases importantes entre eles, sem formação de estruturas secundárias ou de dímeros.

4.1.2. Produção e clonagem dos padrões de RNA sintético

Para produção dos RNAs sintetizados *in vitro* que foram utilizados nas etapas de padronização dos protocolos de RT-qPCR, foram desenhados plasmídios contendo insertos formados por sequências dos vírus WNV, TBEV e JEV. Os plasmídios foram desenhados de forma que os insertos contendo as sequências dos vírus estivessem flanqueadas por sítios de restrição e pelos promotores T7 e Sp6 para transcrição *in vitro*, inseridos em um vetor de clonagem do tipo pUCIDT e sintetizados comercialmente (Figura 9).

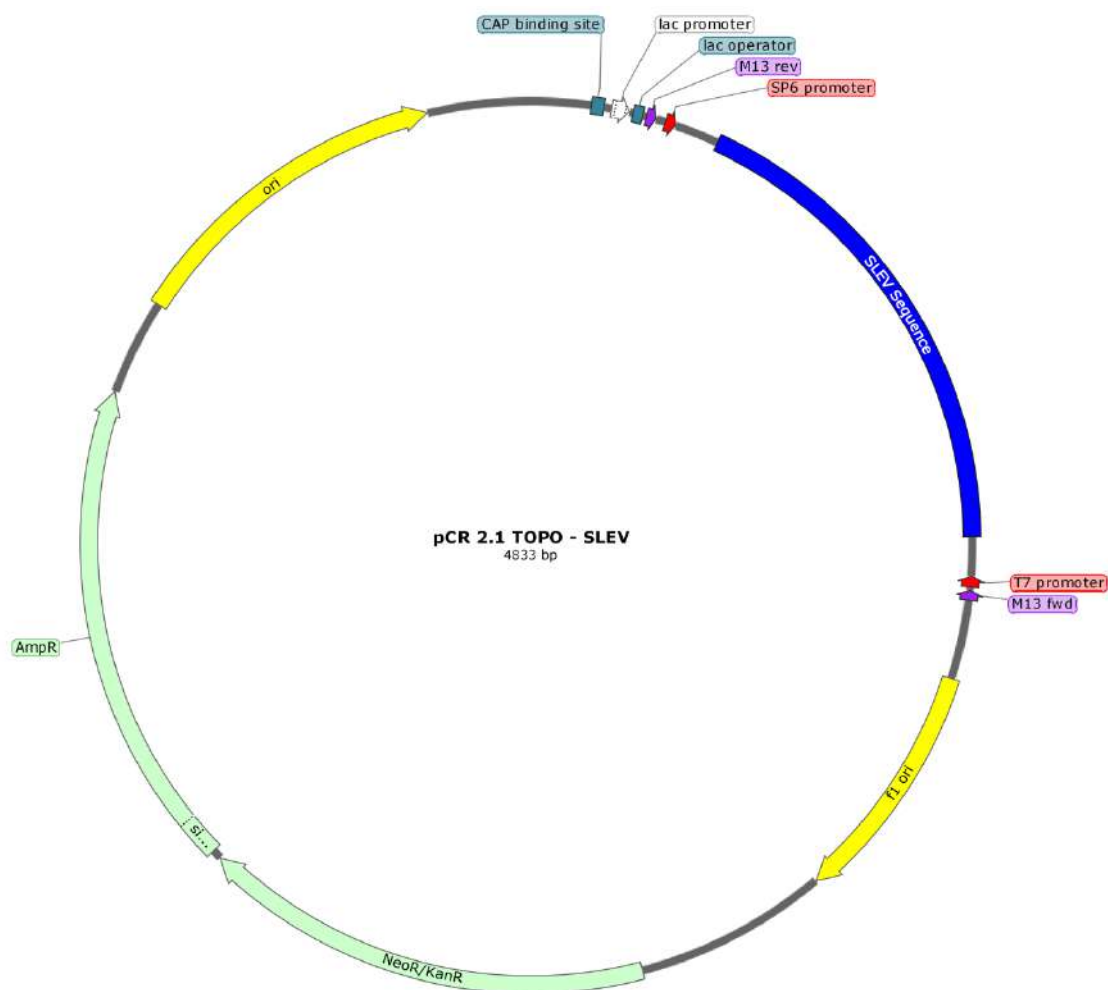
Figura 9 - Mapa do plasmídeo utilizado para produção dos clones dos vírus WNV, TBEV e JEV.



Legenda: Esquema representativo do mapa com as principais características dos plasmídios utilizados para clonagem dos fragmentos dos vírus WNV, TBEV e JEV. Destacadas estão as regiões de origem de replicação (amarelo), gene de resistência a ampicilina (verde-claro), operador lac e sítio de ligação a CAP (verde-escuro) e iniciadores M13 (roxo). A região onde foi inserida a sequência do vírus está representada em azul, flanqueada pelos sítios de restrição (aqui representado pelas enzimas XhoI, NheI, KpnI e PstI) e pelos promotores T7 e SP6 em vermelho. Imagem gerada no programa SnapGene Viewer, versão 5.1.7.

Para o vírus SLEV, uma estratégia diferente foi utilizada. Como havia disponível o isolado desse vírus, o clone foi produzido *in house* a partir da amplificação de um fragmento de DNA diretamente do RNA viral extraído e inserido em um vetor de clonagem PCR TOPO 2.1 (Figura 10).

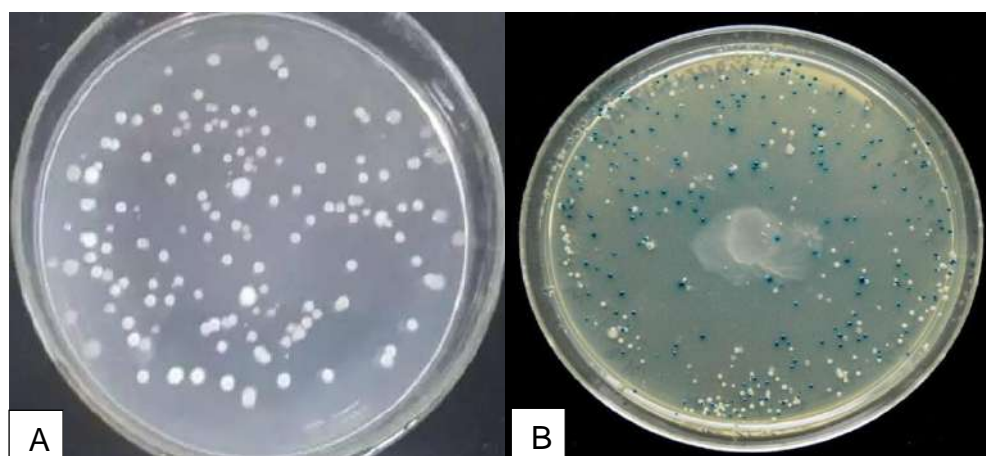
Figura 10 - Mapa do plasmídeo utilizado para produção dos clones do vírus SLEV.



Legenda: Esquema representativo do mapa com as principais características do plasmídeo utilizado para clonagem do fragmento do vírus SLEV. Destacadas estão as regiões de origem de replicação (amarelo), gene de resistência a ampicilina, neomicina e kamicina (verde-claro), operador lac e sítio de ligação a CAP (verde-escuro) e iniciadores M13 (roxo). A região onde foi inserida a sequência do vírus está representada em azul, flanqueada por sítios de restrição (não mostrados) e pelos promotores T7 e SP6 em vermelho. Imagem gerada no programa SnapGene Viewer, versão 5.1.7.

Após a preparação dos plasmídeos, os mesmos foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* quimiocompetentes (TOP10). As bactérias transformadas foram semeadas em meio de crescimento LB com Xgal (SLEV) ou sem Xgal (demais vírus) para crescimento das colônias. Após o período de incubação, foi possível observar o crescimento das colônias correspondentes (Figura 11).

Figura 11 - Placa das bactérias quimiocompetentes transformadas com os plasmídeos contendo as sequências dos vírus.



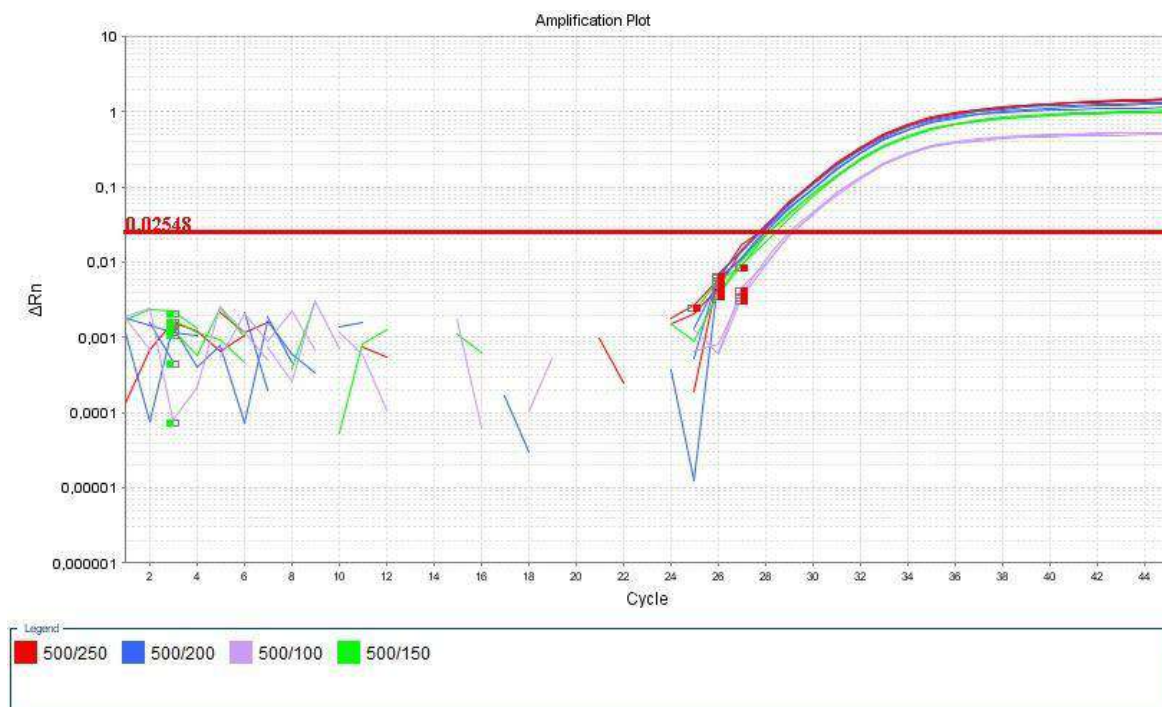
Legenda: A) Representação do crescimento das colônias de bactérias TOP10 transformadas com os plasmídios pUC IDT contendo as sequências dos vírus WNV, TBEV ou JEV. B) Representação do crescimento das colônias de bactérias TOP10 transformadas com o plasmídeo PCR TOPO 2.1 contendo a sequência do vírus SLEV.

Após, as colônias foram repicadas e amplificadas em meio de cultura líquida para purificação de plasmídeos, que foram linearizados e utilizados na produção do RNA *in vitro*. Ao final do processo, o RNA *in vitro* produzido foi quantificado por fluorometria, alcançando concentrações de 726 ng/ μ L, 632 ng/ μ L, 983 ng/ μ L e 520 ng/ μ L para o RNA produzido dos vírus WNV, TBEV, JEV e SLEV, respectivamente.

4.1.3. Otimização das condições ideais de reação

No total, foram testadas 16 combinações diferentes de concentração de iniciadores e sondas para cada alvo. O objetivo deste experimento foi identificar qual combinação de concentração de iniciador e sonda era capaz de amplificar a mesma amostra controle com menor valor de Ct possível. Cada combinação foi testada em triplicata. Como exemplo, a Figura 12 contém uma representação de um gráfico de amplificação da matriz de concentração para o SLEV.

Figura 12 - Gráfico de amplificação do teste de avaliação da matriz de concentração de iniciadores e sonda de SLEV.



Legenda: Representação gráfica das curvas de amplificação de diferentes combinações de concentração de iniciadores e sondas de SLEV. No eixo Y temos os valores de fluorescência do sinal do *reporter* normalizado (ΔRn) enquanto no eixo X temos os ciclos. Neste gráfico estão representados em quatro combinações de concentrações finais de iniciadores/sonda em nanomolar (500/250, 500/200, 500/150 e 500/100) destacadas em vermelho, azul, verde e roxo, respectivamente. As melhores combinações são aquelas que produzem os menores valores de Ct e curvas de amplificação mais altas no gráfico (maior ΔRn).

Após a realização dos testes, verificou-se que não houve muita variação entre os resultados obtidos para as diferentes combinações testadas (Quadro 6). Para a maioria dos vírus, a diferença entre o maior e o menor valor de Ct obtido foi menor que um, com exceção do vírus SLEV, que apresentou uma variação de Ct entre 27,77 a 29,82, dependendo da concentração. Além disso, a concentração de sonda parece ter tido um impacto maior nos valores de Ct obtidos do que a concentração de iniciadores. Com base nesses resultados, as concentrações finais escolhidas para serem utilizadas nos protocolos de RT-qPCR *duplex* WNV/SLEV e *quadriplex* (ILHV/ROCV/TBEV/JEV) foram de 500 nM para os iniciadores e 200 nM para as sondas.

Quadro 6 - Quadro com as concentrações testadas de iniciadores e sondas e os valores de Ct obtidos.

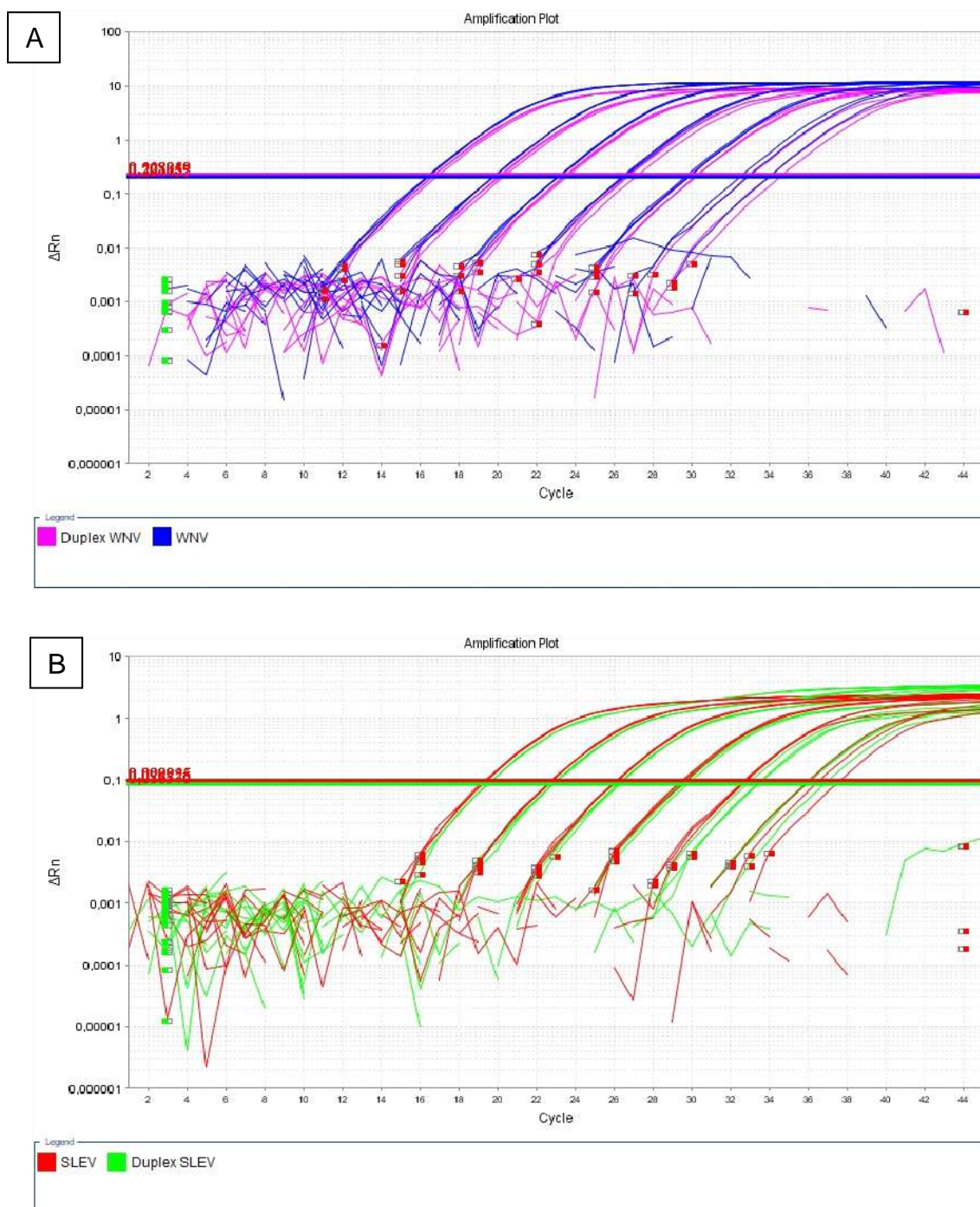
Concentração Final (nM)		Ct médio					
Iniciadores	Sonda	WNV	SLEV	ILHV	ROCV	TBEV	JEV
1000	250	19,47	27,79	23,15	26,19	19,22	16,45
1000	200	19,92	28,14	23,94	26,47	19,54	16,53
1000	150	19,74	28,43	24,51	27,13	20,31	16,98
1000	100	20,57	29,75	25,23	27,98	21,24	17,54
750	250	19,12	27,80	23,22	26,24	19,26	16,52
750	200	19,45	28,08	23,19	26,41	20,01	16,67
750	150	19,69	28,42	24,74	27,24	20,45	16,99
750	100	20,25	29,82	24,97	27,86	21,36	17,45
500	250	19,08	27,77	23,26	26,31	19,14	16,51
500	200	19,48	27,92	22,98	26,14	19,28	16,54
500	150	19,55	28,29	24,65	26,91	20,26	16,89
500	100	20,31	29,16	25,29	27,86	21,31	17,63
250	250	19,37	27,57	23,89	26,48	19,45	16,74
250	200	19,52	27,97	24,58	26,51	19,78	16,88
250	150	19,56	28,16	24,97	27,32	20,79	17,03
250	100	20,42	29,34	25,69	27,99	21,65	17,74

Em seguida, foi feita uma avaliação dos parâmetros de qualidade dos protocolos de RT-qPCR - eficiência de reação (EF%), coeficiente de linearidade (R^2) e *slope*. Para isso, foi utilizado uma curva padrão para cada alvo. Cada curva padrão foi composta de diluições de 1:10 com concentrações variando de 10^6 cópias/ μL até 10^1 cópias/ μl . Cada protocolo foi avaliado em separado (em *singleplex*) e depois comparados em *multiplex*, no formato *duplex* para WNV e SLEV e *quadriplex* para ILHV, ROCV, TBEV e JEV.

Para o protocolo *duplex* WNV/SLEV, não houve diferença importante entre os valores de Cts obtidos no formato *singleplex* e *duplex* (Figura 13). A amplificação do genoma de WNV utilizando o protocolo *duplex* apresentou valores de eficiência de 97,263%, *slope* de -3,389, R^2 de 0,997 e y-intercept de 37,219 (Figura 14A). Já a amplificação do genoma de SLEV utilizando o protocolo *duplex* apresentou valores de eficiência de 97,994%, *slope* de -3,372, R^2 de 0,998 e y-intercept de 39,766 (Figura 14B). A performance do protocolo no formato *duplex* foi muito próxima do formato *singleplex*. O limite de quantificação (LQ) foi definido como 100 cópias/ μL ,

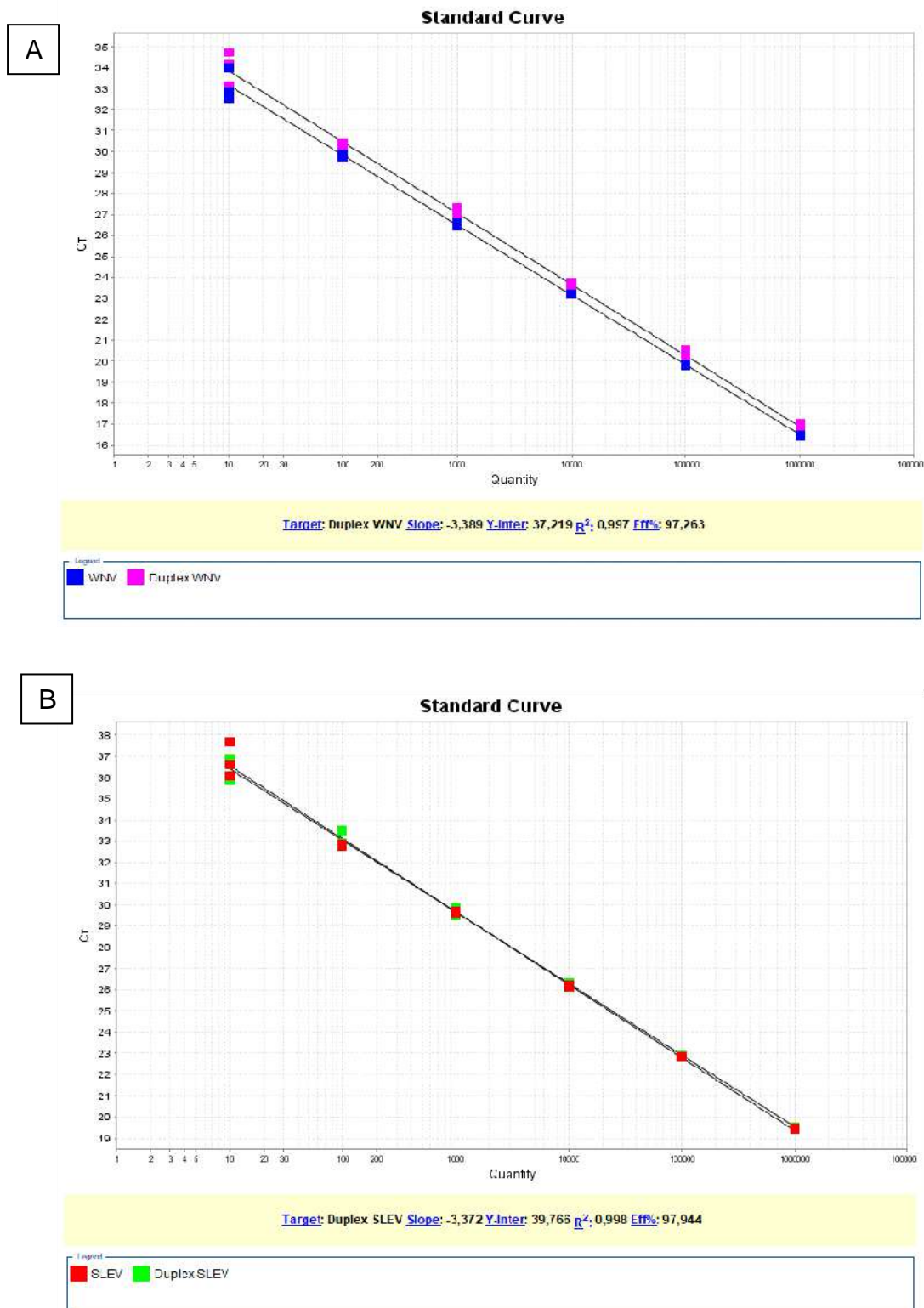
com faixa dinâmica linear (FDL) entre 10^2 a 10^6 cópias/ μ L, quatro logs acima do LQ, para o protocolo *duplex* WNV/SLEV. A variação de R^2 ficou entre 0,98 a 0,99 entre toda FDL.

Figura 13 - Gráfico de amplificação da curva padrão dos vírus WNV e SLEV comparando os valores de Cts obtidos no formato *singleplex* e *duplex*.



Legenda: Representação gráfica da amplificação das curvas padrão dos WNV (A) e SLEV (B).

Figura 14 - Curvas padrão dos vírus WNV e SLEV nos formatos *singleplex* e *duplex*, mostrando os indicadores de performance de reação



Legenda: A) comparação entre as curvas padrão do protocolo *duplex* RT-qPCR WNV nos formatos *duplex* x *singleplex*. B) comparação entre as curvas padrão do protocolo *duplex* RT-qPCR SLEV nos formatos *duplex* x *singleplex*.

4.1.4. Especificidade e Sensibilidade Analítica

Para avaliar a especificidade analítica dos protocolos *duplex* WNV/SLEV e *quadriplex* ILHV/ROCV/TBEV/JEV, foi testado um painel de amostras positivas para diversos vírus. Não foi observada amplificação nas amostras para nenhum dos vírus testados, indicando que os protocolos são específicos para seus respectivos alvos.

A sensibilidade analítica do protocolo *duplex* WNV/SLEV foi avaliada a partir da determinação do limite de detecção de cada alvo, definido como a menor quantidade de RNA (viral ou *in vitro*), em cópias/ μ L, capaz de ser detectada com mais de 95% de intervalo de confiança (IC). Para isso, o RNA quantificado de cada vírus foi utilizado na preparação de 11 diluições seriadas de 1:5 e testado em oito replicatas em uma única corrida (Quadro 7).

Quadro 7 - Avaliação do limite de detecção do protocolo *duplex* WNV/SLEV

WNV				SLEV			
Concentração	Testadas	Positivas	Ct Médio	Concentração	Testadas	Positivas	Ct Médio
1,00x10 ⁵	8	8	19,03	1,00x10 ⁵	8	8	20,21
2,00x10 ⁴	8	8	21,68	2,00x10 ⁴	8	8	22,86
4,00x10 ³	8	8	23,80	4,00x10 ³	8	8	24,96
8,00x10 ²	8	8	25,87	8,00x10 ²	8	8	27,26
1,60x10 ²	8	8	28,22	1,60x10 ²	8	8	29,74
3,20x10 ¹	8	8	30,39	3,20x10 ¹	8	8	32,09
6,40x10 ⁰	8	8	33,00	6,40x10 ⁰	8	7	34,53
1,28x10 ⁰	8	6	35,73	1,28x10 ⁰	8	4	37,20
2,56x10 ⁻¹	8	4	36,49	2,56x10 ⁻¹	8	3	36,91
5,12x10 ⁻²	8	0	IND*	5,12x10 ⁻²	8	0	IND*
1,02x10 ⁻²	8	0	IND*	1,02x10 ⁻²	8	0	IND*

Legenda: Foram testadas 11 diluições de 1:5 nas concentrações expressas na figura (em cópias/ μ L). Cada diluição foi testada em oito replicatas e número de replicatas positivas para cada diluição está mostrado. Foram consideradas positivas amostras com valores de Cts abaixo de 38. *IND = Indeterminado.

De posse desses resultados, foi possível calcular o limite de detecção (LD) para cada alvo utilizando uma análise de regressão linear de probit no programa SPSS® Statistics, versão 25 (IBM®, Armonk, NY, USA). O LD para o vírus WNV foi de 2,816 cópias/ μ L (limite inferior de 1,139 cópias/ μ L; limite superior de 40,112 cópias/ μ L; 95% de IC; $p < 0,0001$), enquanto, que para o SLEV, foi de 12,400

cópias/ μ L (limite inferior de 4,080 cópias/ μ L; limite superior de 186,145 cópias/ μ L; 95% de IC; $p < 0,0001$).

Uma vez que foi utilizado um volume de 5 μ L de RNA por reação, o LD final ficaria em 14,08 cópias de genoma de WNV e 62 cópias de genoma de SLEV. O LD do protocolo RT-qPCR de referência para WNV foi de 0,1 PFU (Lanciotti et al., 2000), enquanto, que o protocolo RT-qPCR de referência para SLEV foi de 0,15 PFU (Lanciotti & Kerst, 2001). Levando em conta que o número de cópias de RNA por PFU nos flavivírus gira em torno de 3 logs (ou seja, na faixa de 1.000 cópias por PFU) (Chao et al., 2007), é possível que o protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV apresente uma sensibilidade analítica melhor que os protocolos de referência.

4.1.5. Acurácia Diagnóstica

Para avaliar a acurácia diagnóstica do protocolo de RT-qPCR *duplex* WNV/SLEV na detecção do genoma viral em amostras de LCR humano, foi realizado um teste com um painel de amostras negativas e positivas para WNV e SLEV. Um total de 20 amostras de LCR previamente testadas como negativas para WNV e SLEV por RT-qPCR foram utilizadas. Devido à indisponibilidade de amostras clínicas positivas para WNV e SLEV, foram incluídas na análise 20 amostras de LCR humano infectadas artificialmente por inoculação de quantidades variáveis de vírus WNV e SLEV. Todas as amostras foram testadas com o protocolo *duplex* WNV/SLEV (teste índice) e para os protocolos de referência de WNV e SLEV (teste de referência). Todas as amostras negativas obtiveram resultados negativos para ambos os testes, assim como todas as amostras positivas se mostraram positivas para ambos os testes. Os resultados das amostras positivas testadas para ambos os protocolos, bem como a quantidade de vírus utilizada, estão apresentados no Quadro 8.

O novo protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV apresentou valores de sensibilidade e especificidade clínica de 100% em ambas quando comparado tanto com o protocolo de referência para detecção de WNV quanto para SLEV. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 0% cada. A acurácia ou proporção de acertos foi de 100%. A concordância observada entre os testes *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV e os de referência *singlex* RT-qPCR WNV e RT-qPCR SLEV foi de

100%, com índice kappa igual a 1,0 ($p < 0,0001$), indicando concordância perfeita dos testes (Tabelas 1 e 2).

Quadro 8 – Resultados obtidos no painel de amostras positivas para WNV e SLEV.

WNV				SLEV			
Amostra	Concentração (cópias/mL)	Ct (Teste Índice)	Ct (Teste Referência)	Amostra	Concentração (cópias/mL)	Ct (Teste Índice)	Ct (Teste Referência)
01	4,0 x 10 ⁷	21,84	20,52	21	4,0 x 10 ⁵	25,67	25,14
02	3,0 x 10 ⁶	21,45	20,23	22	6,0 x 10 ⁴	25,64	25,52
03	6,0 x 10 ⁷	16,31	14,72	23	3,0 x 10 ⁴	26,47	26,03
04	9,0 x 10 ⁵	21,60	20,30	24	4,0 x 10 ⁴	26,36	25,80
05	1,0 x 10 ⁵	24,32	22,76	25	4,0 x 10 ⁵	23,20	22,96
06	2,0 x 10 ⁶	21,54	20,17	26	1,0 x 10 ⁵	25,37	24,89
07	8,0 x 10 ⁵	24,19	22,78	27	3,0 x 10 ⁵	23,99	23,73
08	1,0 x 10 ⁵	25,34	23,56	28	4,0 x 10 ⁴	27,17	26,96
09	7,0 x 10 ⁶	19,60	17,85	29	1,0 x 10 ⁵	25,36	25,19
10	2,0 x 10 ⁵	27,28	25,56	30	8,0 x 10 ⁴	25,69	25,47
11	6,0 x 10 ⁵	24,09	22,09	31	2,0 x 10 ⁵	24,94	24,74
12	5,0 x 10 ⁷	17,62	15,70	32	3,0 x 10 ⁴	28,34	27,92
13	4,0 x 10 ⁵	24,73	23,32	33	9,0 x 10 ³	29,39	28,79
14	9,0 x 10 ⁴	25,55	23,85	34	3,0 x 10 ⁵	23,91	23,73
15	4,0 x 10 ⁶	21,18	19,39	35	1,0 x 10 ⁴	28,85	28,40
16	3,0 x 10 ⁵	24,15	22,46	36	2,0 x 10 ⁵	24,49	24,24
17	9,0 x 10 ⁴	24,57	22,88	37	9,0 x 10 ⁴	26,45	25,87
18	8,0 x 10 ⁶	20,54	18,92	38	2,0 x 10 ⁴	27,95	27,48
19	5,0 x 10 ⁵	24,98	23,29	39	1,0 x 10 ⁴	34,83	27,83
20	2,0 x 10 ⁷	18,38	16,46	40	1,0 x 10 ⁵	26,33	25,11

Tabela 1 - Tabela de contingência comparando os resultados obtidos no *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV, tendo o RT-qPCR WNV como referência.

		WNV RT-qPCR		
		Positivo	Negativo	Total
Duplex	Positivo	20	0	20
RT-qPCR	Negativo	0	20	0
	Total	20	20	40
Estimadores de Desempenho		Valor		Índice κ
Sensibilidade		100%		
Especificidade		100%		
VPP		100%		
VPN		100%		1,0
FP		0%		($p < 0,0001$)
FN		0%		
Acurácia		100%		

Intervalo de Confiança 95%. VPP: Valor Preditivo Positivo, VPN: Valor Preditivo Negativo, FP: Falso-positivo, FN: Falso-negativo.

Tabela 2 - Tabela de contingência comparando os resultados obtidos no *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV, tendo o RT-qPCR SLEV como referência.

		SLEV RT-qPCR		
		Positivo	Negativo	Total
Duplex	Positivo	20	20	40
RT-qPCR	Negativo	0	0	0
	Total	20	20	40
Estimadores de Desempenho		Valor		Índice κ
Sensibilidade		100%		
Especificidade		100%		
VPP		100%		
VPN		100%		1,0
FP		0%		($p < 0,0001$)
FN		0%		
Acurácia		100%		

Intervalo de Confiança 95%. VPP: Valor Preditivo Positivo, VPN: Valor Preditivo Negativo, FP: Falso-positivo, FN: Falso-negativo.

4.2. AVALIAÇÃO DO RVNT⁹⁰: PLATAFORMA CYTATION™ 5.0 BIOTEK

Os soros de pacientes sintomáticos compatíveis com DENV e/ou infecções por ZIKV foram testados por RVNT⁹⁰ e PRNT⁹⁰ tradicionais. Essas amostras foram pré-selecionadas a partir de RT-qPCR e ELISA IgM, categorizadas em quatro grupos com base em: (1) tempo de doença após o início dos sintomas e (2) resultados do diagnóstico laboratorial.

O Grupo I (n = 20) inclui pacientes que tiveram diagnóstico para DENV por RT-PCR, e com amostras coletadas, entre 1 a 5 dias, após o início dos sintomas; Grupo II (n = 19) inclui amostras positivas para DENV por ELISA IgM, e, com amostras coletadas com mais de 5 dias do início dos sintomas. Os pacientes com diagnóstico para ZIKV foram incluídos no Grupo III (n = 19) e no Grupo IV (n = 17). Grupo III contém amostras agudas testadas para ZIKV RT-qPCR. Enquanto o Grupo IV, inclui amostras convalescentes positivas para ZIKV por ELISA IgM de pacientes com diagnóstico confirmado na fase aguda por ZIKV RT-qPCR.

A maioria das amostras positivas para DENV nos Grupos I e II foram coletadas antes introdução do ZIKV no Brasil (Zanluca et al., 2015), mas cinco deles, foram coletados durante o surto de ZIKV, mostrando reação monotípica para DENV nos testes sorológicos (H815485, H817979, H817981, H819129 e H819519). Por outro lado, amostras positivas para ZIKV (Grupos III e IV) foram coletadas apenas durante o surto de 2015/2016 (Quadro 9).

Quadro 9 - Comparação entre tempo de doença e ensaios de neutralização.

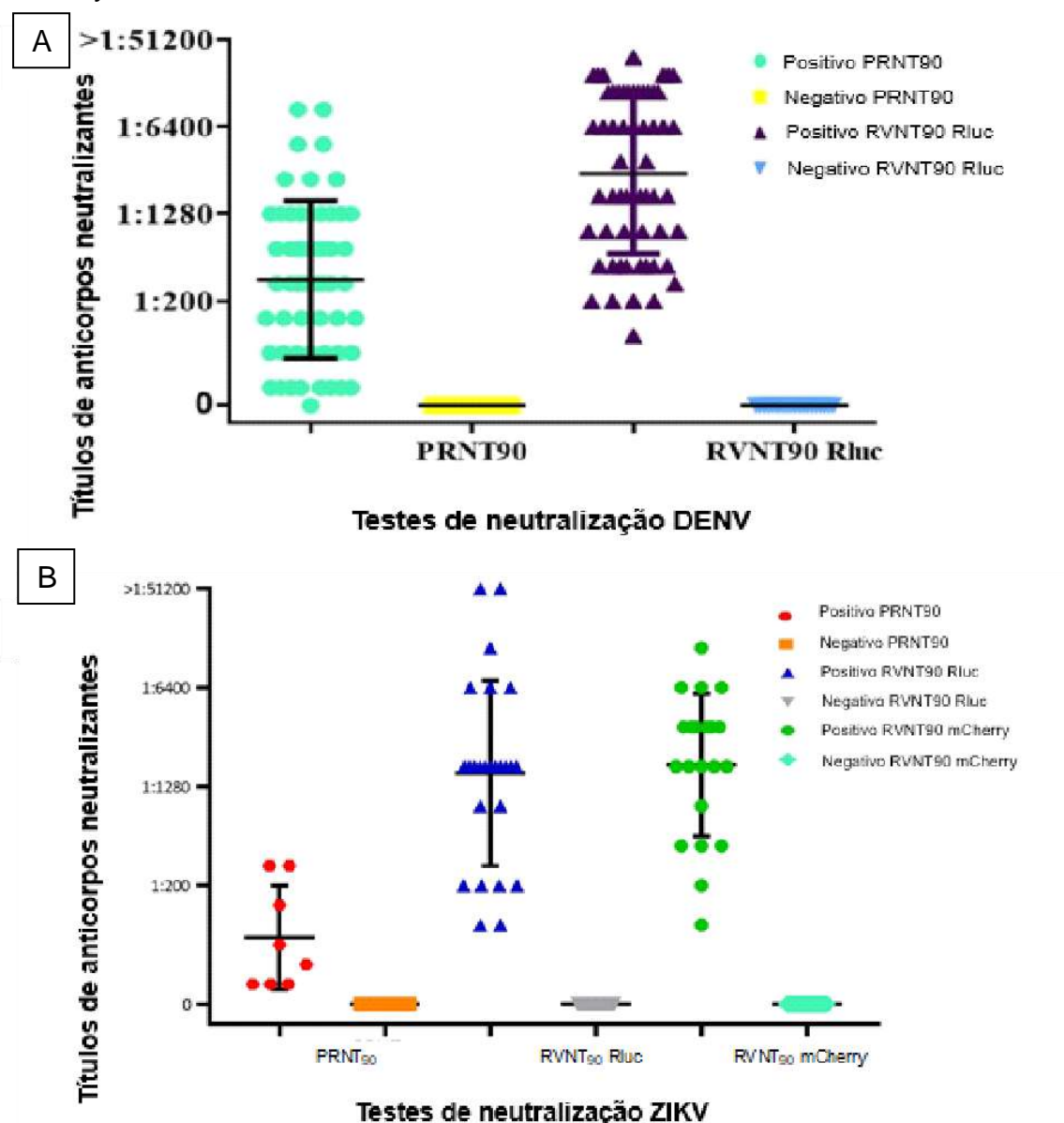
Grupo	Número			Tempo de doença	Ensaio de placa (PRNT ⁹⁰)		Reporter (RVNT ⁹⁰)		
	Registro	Soro	Ano		ZIKV	DENV2	DENV2	Rluc	ZIKV Rluc
I	H726608	1	2007 ^a	7 dias	Neg	1:320	1:25600	Neg	Neg
	H769882	2	2010 ^a	4 dias	Neg	1:20	1:400	Neg	Neg
	H769929	3	2010 ^a	4 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H770060	4	2010 ^a	2 dias	Neg	Neg	1:200	Neg	Neg
	H770220	5	2010 ^a	3 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H773035	6	2010 ^a	3 dias	Neg	1:80	1:1600	Neg	Neg
	H773052	7	2010 ^a	4 dias	Neg	1:20	1:12800	Neg	Neg
	H773054	8	2010 ^a	3 dias	Neg	1:20	1:400	Neg	Neg
	H773564	9	2010 ^a	4 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H773565	10	2010 ^a	4 dias	Neg	1:320	1:12800	Neg	Neg
	H773582	11	2010 ^a	4 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H774749	12	2010 ^a	5 dias	Neg	1:160	1:3200	Neg	Neg
	H775262	13	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775844	14	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775845	15	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775848	16	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775852	17	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775853	18	2010 ^a	< 5 dias	Neg	1:80	1:400	Neg	Neg
	H775854	19	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
	H775862	20	2010 ^a	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
II	H627940	21	2000 ^a	>5dias	Neg	1:640	1:3200	Neg	Neg
	H632195	22	2000 ^a	>5dias	Neg	1:320	1:3200	Neg	Neg
	H674584	23	2004 ^a	>5dias	Neg	1:20	1:200	Neg	Neg
	H738095	24	2007 ^a	>5dias	Neg	1:80	1:400	Neg	Neg
	H739187	25	2007 ^a	6 dias	Neg	1:320	1:12800	Neg	Neg
	H739983	26	2008 ^a	>5dias	Neg	1:640	1:6400	Neg	Neg
	H787665	27	2012 ^a	14 dias	Neg	1:10240	1:25600	Neg	Neg
	H788930	28	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:640	1:6400	Neg	Neg
	H789010	29	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:5120	1:25600	Neg	Neg
	H789197	30	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:10240	>1:51200	1:200	1:200
	H789912	31	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:160	1:800	Neg	Neg
	H789990	32	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:640	1:12800	Neg	Neg
	H789997	33	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:2560	1:25600	1:100	Neg
	H790260	34	2012 ^a	> 5dias	Neg	1:1280	1:6400	Neg	Neg
	H815485	35	2015	>5dias	Neg	1:20	Neg	Neg	Neg
	H817979	36	2015	> 5dias	Neg	1:20	1:200	Neg	Neg
	H817981	37	2016	>5dias	Neg	1:1280	1:12800	Neg	Neg
	H819129	38	2015	> 5dias	Neg	1:160	1:1600	Neg	Neg
	H819519	39	2015	>5dias	Neg	1:320	1:1600	Neg	Neg
	III	H817986	40	2015	< 5 dias	Neg	Neg	Neg	Neg
H819966		41	2015	3 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H820771		42	2015	1 dia	Neg	1:320	1:1600	1:800	1:400
H821519		43	2015	< 5 dias	Neg	1:160	1:1600	Neg	Neg
H821557		44	2015	2 dias	Neg	1:80	1:800	1:200	1:100
H821585		45	2015	3 dias	Neg	1:20	1:200	1:100	Neg
H821735		46	2015	< 5 dias	Neg	Neg	1:400	Neg	Neg
H821956		47	2015	2 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H822137		48	2015	4 dias	Neg	Neg	1:100	Neg	Neg
H822215		49	2015	< 5 dias	Neg	1:80	1:400	Neg	Neg
H822217		50	2015	< 5 dias	Neg	1:80	1:800	Neg	Neg
H822226		51	2015	3 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H822604		52	2015	2 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H823608		53	2015	4 dias	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H823390		54	2015	3 dias	Neg	1:80	1:800	1:200	Neg
H823594		55	2015	1 dia	Neg	Neg	1:400	Neg	Neg
H824562		56	2015	3dias	Neg	1:320	1:800	Neg	Neg
H824564		57	2015	1 dia	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
H824708	58	2015 ^b	4 dias	Neg	Neg	1:1600	1:6400	1:6400	
VI	H816971	59	2015	12dias	1:20	1:1280	1:12800	1:1600	1:1600
	H819282	60	2015	4 dias	1:40	1:5120	1:25600	1:6400	1:3200
	H819284	61	2015 ^b	3 dias	1:80	1:1280	1:6400	>1:51200	1:3200
	H819360	62	2015	8 dias	Neg	1:640	1:12800	1:1600	1:400
	H820967	63	2015	7 dias	Neg	1:1280	1:12800	1:1600	1:800
	H821489	64	2016	2 dias	1:320	1:2560	1:12800	1:12800	1:1600
	H821491	65	2015 ^b	> 5dias	Neg	1:160	1:800	1:1600	1:3200
	H822200	66	2015	> 5dias	Neg	1:160	1:1600	1:1600	1:1600
	H822413	67	2015	> 5dias	Neg	1:1280	1:6400	1:1600	1:6400
	H822540	68	2015	> 5dias	1:20	1:640	1:6400	1:1600	Neg
	H823176	69	2015 ^b	50 dias	1:160	1:640	1:6400	>1:51200	1:12800
	H824696	70	2015	7 dias	Neg	1:320	1:1600	1:200	1:400
	H825051	71	2015	11 dias	Neg	1:640	1:12800	1:1600	1:3200
	H826145	72	2016 ^b	> 5dias	Neg	1:20	1:400	1:1600	1:1600
	H828107	73	2016	1 dias	Neg	1:1280	1:25600	1:1600	1:3200
H828108	74	2016	1 dias	Neg	1:1280	1:6400	1:6400	1:6400	
H829179	75	2016	19 dias	1:20	1:1280	1:6400	1:1600	1:3200	

I: DENV detectado por RT-PCR; II: Anti DENV-IgM detectado por ELISA captura; III: ZIKV detectado por RT-qPCR; IV: Amostras pareadas, cuja 1^a amostra teve diagnóstico de Zika por RT-qPCR; A. Pré-epidêmica para o ZIKV no Brasil; B. Título de ZIKV no RVNT90 > título de DENV no RVNT⁹⁰; Neg: negativa.

Oito amostras do Grupo I, sugerindo que estas, possuem anticorpos prévios contra DENV, porém todas foram negativas para ZIKV por PRNT⁹⁰ e RVNT⁹⁰. No DENV secundário casos de infecção seguidos por outros flavivírus não ZIKV (antes da pandemia de ZIKV), observados no Grupo II, apenas algumas amostras apresentaram anticorpos inespecíficos contra ZIKV e, em baixas diluições, para ambos os ensaios. No Grupo III, apesar do genoma do ZIKV ter sido detectado nestas amostras, o resultado do ZIKV PRNT⁹⁰ foi negativo. Além disso, oito amostras (42,1%) foram positivas para ZIKV e DENV no RVNT⁹⁰. Esses dados indicam que, no cenário de infecção prévia por flavivírus, seguida de infecção secundária por ZIKV, os anticorpos inespecíficos do DENV, podem reagir com o antígeno ZIKV, mas só podem ser detectados em diluições mais baixas (<1:1600). Mais tarde, após 5 dias pós-sintomas, os títulos de anticorpos anti-ZIKV, aumentam durante a infecção secundária, mas também os anticorpos DENV. Essas podem ser observadas no Grupo IV e, todas essas amostras foram positivas para DENV e ZIKV por RVNT⁹⁰.

O tradicional ZIKV PRNT⁹⁰ não foi capaz de detectar anticorpos ZIKV em 88,2% das amostras, mas com o RVNT⁹⁰ foi possível titular anticorpos ZIKV nelas todas. Além disso, 23,5% (n = 4) das amostras do Grupo IV têm título de ZIKV maior que título de DENV, mas não estão correlacionadas com o tempo de doença (Figura 15).

Figura 15 - Comparação entre os títulos de anticorpos neutralizantes. **(A)** Títulos de anticorpos no RVNT⁹⁰ DENV Rluc *versus* PRNT⁹⁰; **(B)** RVNT⁹⁰ ZIKV Rluc e mCherry *versus* PRNT⁹⁰



Fonte: Autoria própria.

Tanto para DENV quanto para ZIKV RVNT⁹⁰ (Rluc e mCherry), os cortes de teste foram mantidos em 90%, seguindo critérios PRNT⁹⁰. No entanto, as diluições inferiores a 1:100 foram definidas como reações inespecíficas, uma vez que o RVNT⁹⁰ demonstrou maior sensibilidade em comparação com o PRNT⁹⁰, devido à alta reação cruzada observada entre os flavivírus. Para calcular os

ensaios RVNT⁹⁰ de sensibilidade e especificidade, todas as amostras também foram testadas por PRNT⁹⁰ tradicional como padrão-ouro teste. O ensaio DENV Rluc teve sensibilidade e especificidade iguais a 100% e 78,3%, respectivamente, e apresentaram 93,3% de acerto (Tabela 3).

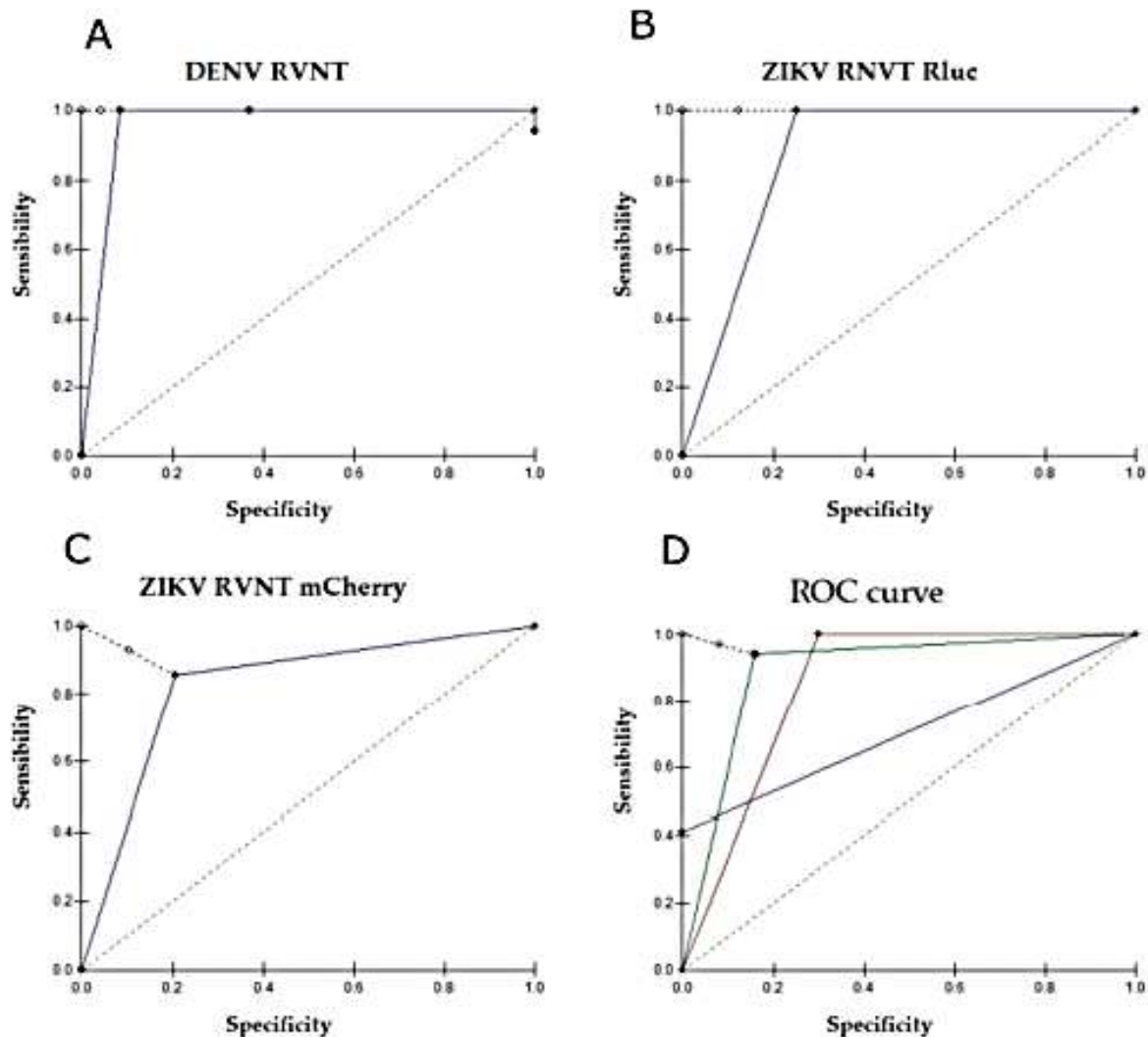
Tabela 3 - Avaliação de RVNT⁹⁰ usando como padrão de RVNT⁹⁰ e ZIKV Rluc.

PADRÃO	TESTES	VPP	VPN	S	E	A	VALOR MCNEMAR
	DENV RVNT ⁹⁰ Rluc	91,2	100,0	100,0	78,3	93,3	0,218 (p>0,05)
PRNT ⁹⁰	RVNT ⁹⁰ Rluc	32,0	100,0	100,0	74,6	77,3	0,000 (p<0,05)
	RVNT ⁹⁰ mCherry	33,3	98,1	88,0	79,1	80,0	0,001 (p<0,05)
ZIKV Rluc	RVNT ⁹⁰ mCherry	100,0	92,6	84,0	100,0	94,7	0,125 (p>0,05)

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, S: sensibilidade, E: especificidade, A: acurácia.

A curva ROC mostrou que RVNT⁹⁰ de DENV Rluc teve desempenho semelhante ao PRNT⁹⁰ (Figura 16).

Figura 16 - Comparação entre curvas ROC de desempenho dos ensaios RVNT⁹⁰ DENV e ZIKV entre PRNT⁹⁰ convencional



(A) RVNT⁹⁰ DENV Rluc versus PRNT⁹⁰; **(B)** RVNT⁹⁰ ZIKV Rluc versus PRNT⁹⁰; **(C)** RVNT⁹⁰ ZIKV mCherry versus PRNT⁹⁰. **(D)** Comparação entre o ensaio de RVNT⁹⁰ ZIKV e PRNT⁹⁰ ZIKV usando resultados do teste de ELISA IgM de ZIKV como padrão. Curva azul: ZIKV PRNT⁹⁰; Curva verde: ZIKV mCherry; Curva rosa: ZIKV Rluc.

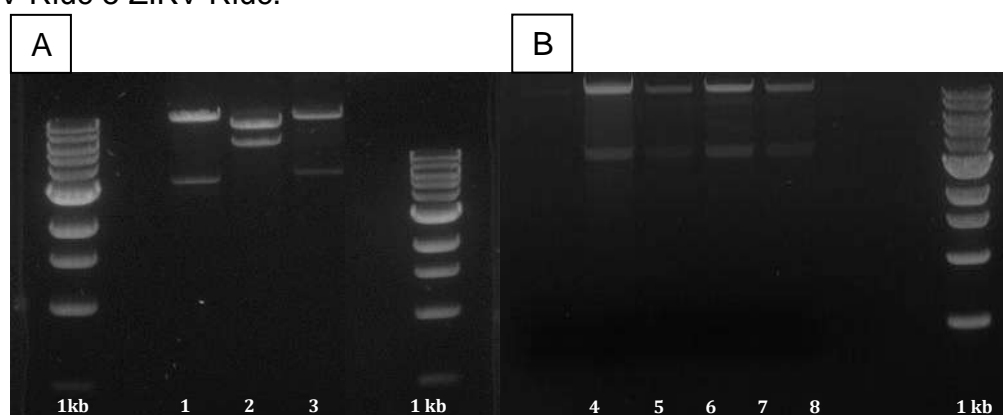
4.3. PLATAFORMA GLOMAX[®] PROMEGA

Na tentativa de recuperação dos plasmídeos com a sequência *reporter* de luciferase, a produção em pequena escala do plasmídeo de DENV Rluc alcançou

um total de 8 clones, cujas concentrações obtidas no Qubit 2.0 variaram de 43 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ a 158 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Para ZIKV Rluc, foram recuperados 13 clones com concentrações variando entre $< 0,010 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e $109 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O par de enzimas *SacI*+*Clal* foi testado para DENV Rluc exibiu um padrão de inserto conforme o esperado, como mostra a Figura 17. Concomitantemente, os plasmídeos ZIKV Rluc foram digeridos com as enzimas *NheI* e *Clal*, apresentando o padrão adequado. Após a avaliação das concentrações obtidas e, dos perfis de bandas dos insertos, o clone número 2 de DENV Rluc, e o clone número 8 de ZIKV Rluc foram encaminhados para amplificação em média escala (midiprep com 500 mL de meio líquido).

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão enzimática de DENV Rluc e ZIKV Rluc.



Legenda: (A) 1kb: Marcador de peso molecular. As amostras 1, 2 são clones de DENV Rluc digeridos por *SacI*+*Clal*, *SphI*+*Clal*. As amostras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 são correspondentes aos clones 2, 5, 11, 12 e 13 de ZIKV Rluc, respectivamente. Fonte: Laboratório de Clonagem e Expressão de Proteínas/SAARB (2019).

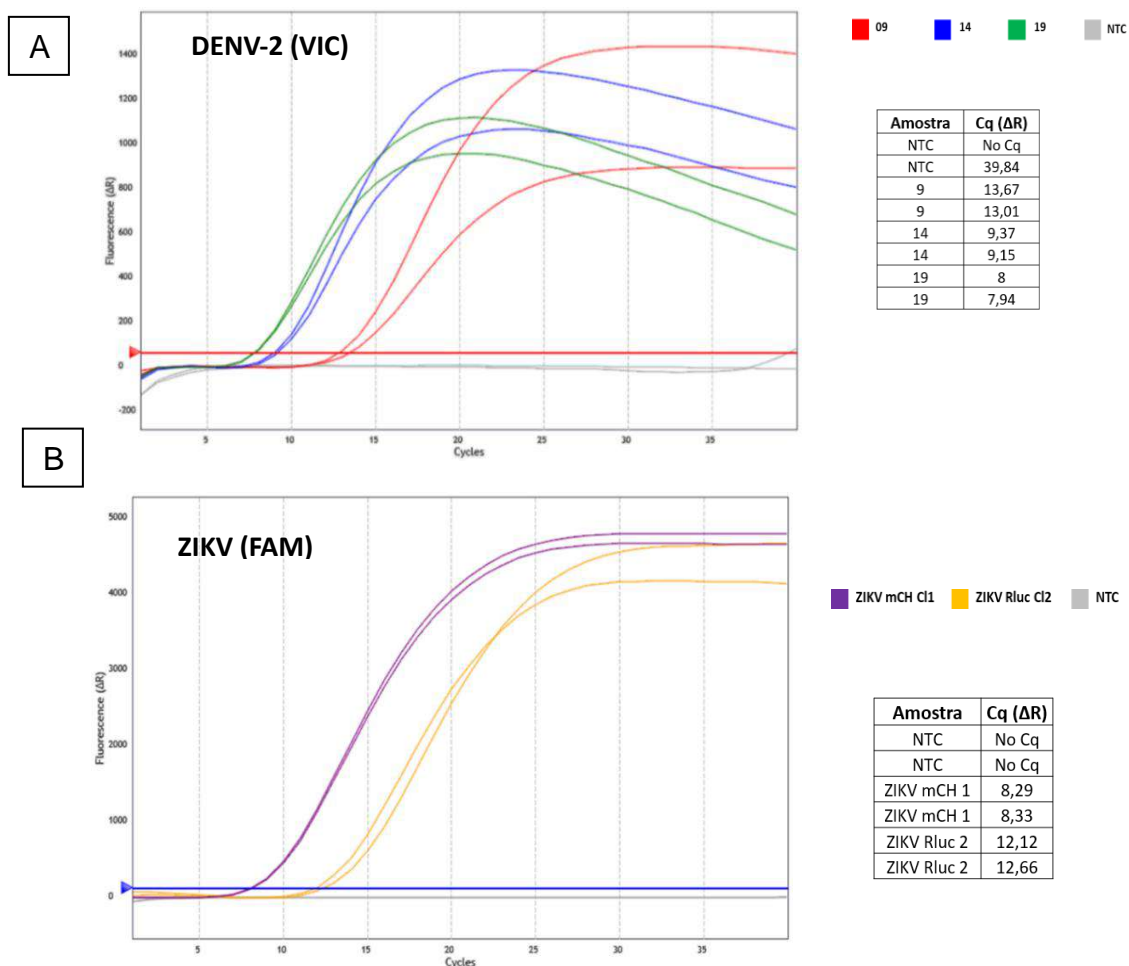
Durante a amplificação em média escala, o plasmídeo de DENV Rluc alcançou uma concentração satisfatória de 334 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$. Já para o ZIKV Rluc, a concentração de DNA plasmidial de 240 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ demandou mais laboro.

As dificuldades enfrentadas para alcançar uma boa concentração de DNA plasmidial, sobretudo ao baixo rendimento encontrado para o ZIKV, podem ser

justificadas pela taxa de crescimento lenta que é característica do plasmídeo de baixa cópia utilizado.

A confirmação de que o material genético presente no plasmídeo pertencia ao DENV e ao ZIKV foi realizada por qPCR (Figura 18), seguida de sequenciamento completo dos plasmídeos de DENV e ZIKV que apresentaram 2.317.704 e 2.811.272 sequências, respectivamente, não havendo mudanças nucleotídicas (Figura 19).

Figura 18 – Detecção da sequência genética de DENV e ZIKV por RT-qPCR.

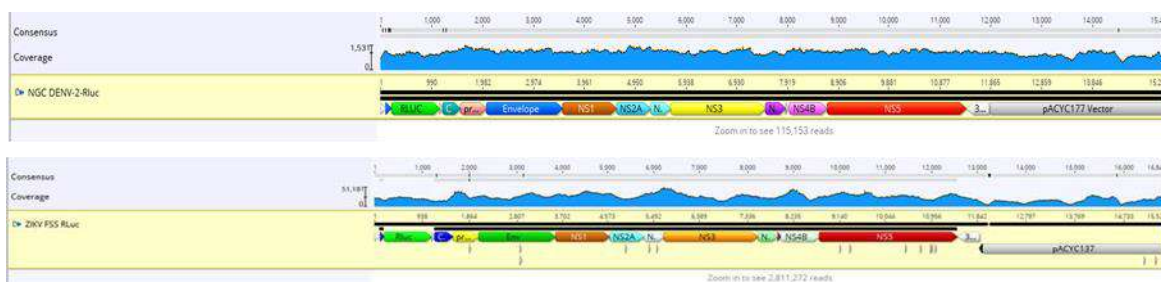


Nome	Sequência Nucleotídica (5'-3')
VZIK ENV 1086F	CCGCTGCCCAACACAAG
VZIK ENV 1162R	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
Sonda VZIK ENV 1107	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-BHQ

Legenda: Gráficos de amplificação dos plasmídeos dos vírus *reporters*. A confirmação da presença da sequência viral nos plasmídeos foi feita por PCR em

tempo real. A) Amplificação da sequência do vírus DENV nos clones 09, 14 e 19, em duplicata. B) Amplificação da sequência do vírus ZIKV nos clones 01 de ZIKV mCH e clones 2 do ZIKV Rluc, em duplicata. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular/SAARB (2019).

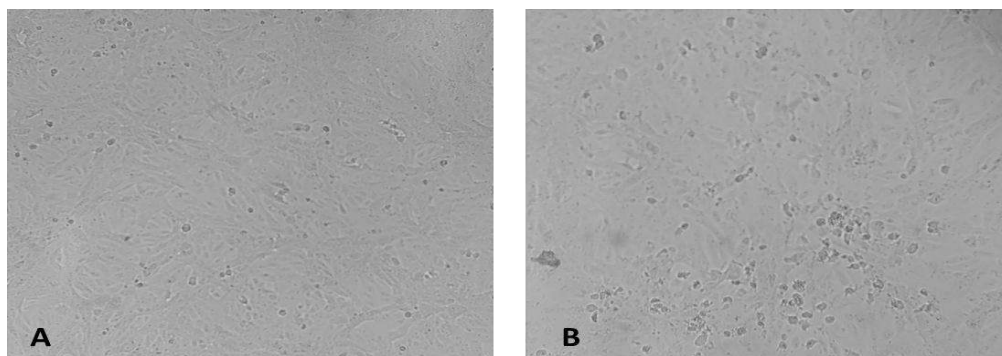
Figura 19 – Confirmação da sequência de DENV Rluc e ZIKV Rluc por sequenciamento de nova geração.



Legenda: Gráfico mostrando o resultado do sequenciamento dos plasmídios de DENV e ZIKV Rluc. As leituras obtidas foram montadas utilizando a sequência do plasmídio como molde. Na figura é possível observar as regiões específicas das ORFs virais bem como as regiões não traduzidas, as sequências da Rluc e do vetor plasmidial pACYC137. Em azul estão indicadas a intensidade da cobertura das leituras ao longo da sequência. Fonte: Laboratório de Biologia Molecular/SAARB (2019).

Confirmados, os plasmídeos de vírus *reporter* foram linearizados e transcritos. Na etapa de transcrição, com quantificações de RNA, superiores a 6 $\mu\text{g/mL}$, os RNA foram eletroporados em células Vero. Após a replicação desse RNA infectante, foi observada destruição da monocamada, como mostrado na Figura 20. Em cultivo de células Vero, infecções virais induzem efeito citopático (ECP), caracterizado por alterações morfológicas, com perda de aderência, fusão de membranas, formação de sincícios e vacúolos, arredondamento, desprendimento da superfície de cultivo e morte celular (Oliveira et al., 2023).

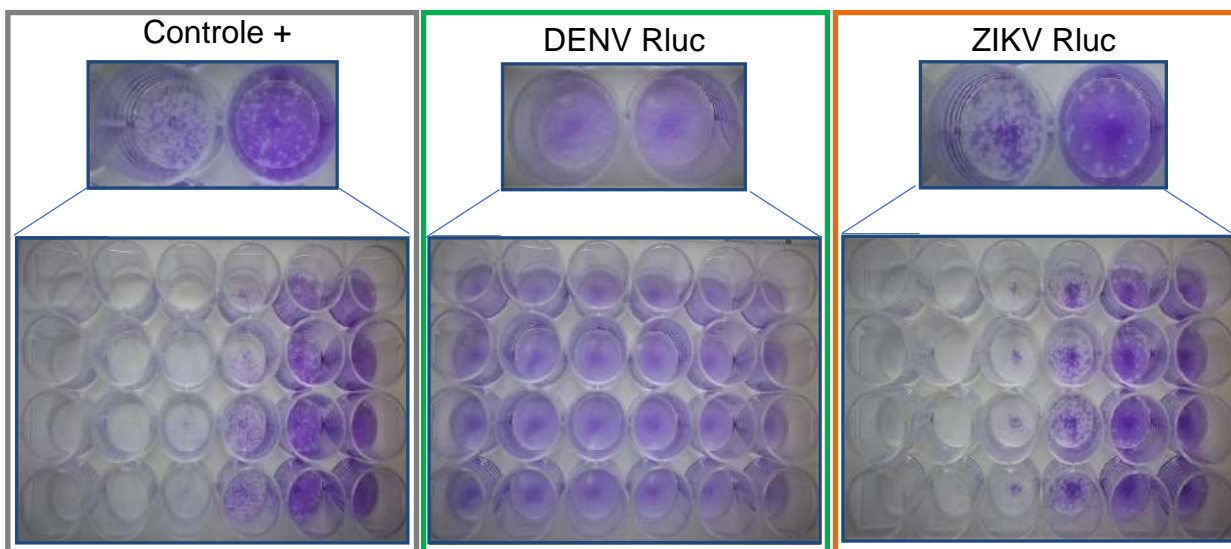
Figura 20 - Efeito citopático após infecção do vírus *reporter*.



Legenda: Microscopia de campo claro no aumento de 100x. **A**: Célula Vero transfectada, **B**: Efeito citopático de célula Vero transfectada. Fonte: Laboratório de Clonagem e Expressão de Proteínas/SAARB (2009).

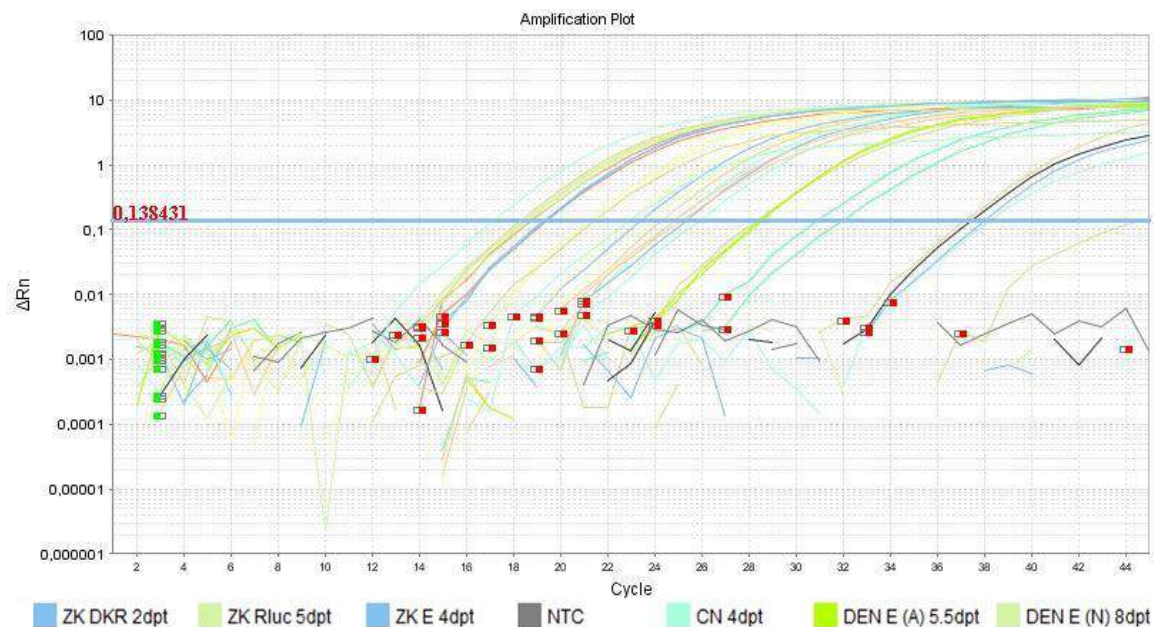
Normalmente, a infecção viral em cultivo celular é confirmada por teste de imunofluorescência. Nesse trabalho, a replicação viral obtida, após transfecção de RNA, foi demonstrada pela formação de placas de infecção durante o ensaio para quantificação viral (Figura 21) e pelas técnicas de RT-qPCR (Figura 22; Quadro 10). Como representado no Quadro 1, o 8º dia pós-transfecção (dpt) de DENV Rluc e no 4ºdpt de ZIKV Rluc foram os períodos que apresentaram menor Ct.

Figura 21 - Titulação de vírus *reporter* em unidade formadora de placa.



Legenda: A) Controle positivo do ensaio de placa corados com cristal violeta. B) Titulação do DENV Rluc através do ensaio de placa por cristal violeta. C) Titulação do ZIKV Rluc por meio do ensaio de placa por cristal violeta. Fonte: Laboratório de Clonagem e Expressão de Proteínas/SAARB (2009).

Figura 22 – Amplificação de DENV Rluc e ZIKV Rluc por RT-qPCR.



Legenda: Gráfico de amplificação do genoma de DENV e ZIKV Rluc a partir do RNA extraído do sobrenadante de cultura celular após transfecção, em duplicata.

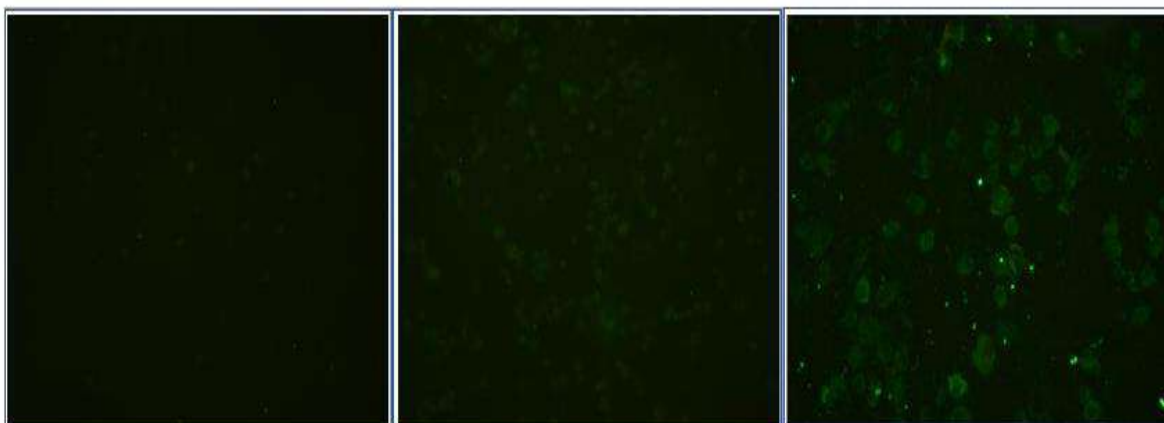
Foram testados sobrenadantes de ZIKV Rluc com 4 e 5 dias pós transfecção (Cts de 19,4 e 19,0 - respectivamente) e sobrenadantes DENV Rluc com 5,5 e 8 dias pós transfecção (Cts de 16,9 e 11,2 - respectivamente). Além disso, é possível observar que não houve amplificação nos controles negativos (NTC e CN 4dpt). Fonte: Laboratório de Biologia Molecular/SAARB (2019).

Quadro 10 – Valores de Ct de DENV e ZIKV Rluc em diferentes dpt.

DENV Estoque	Ct	ZIKV Coleta	Ct	ZIKV Estoque	Ct
DEN E (A) 3dpt	23,96202	ZK Rluc 1dpt	21,75061	ZK E 4dpt	19,898
DEN E (A) 5.5dpt	16,89561	ZK Rluc 2dpt	29,04219	ZK E 5dpt (A)	17,714
DEN E (A) 9dpt	16,39175	ZK Rluc 3dpt	25,48274	ZK E 5dpt (N)	18,8945
DEN E (N) 5.5dpt	16,96931	ZK Rluc 4dpt	19,40444		
DEN E (N) 8dpt	11,21769	ZK Rluc 5dpt	19,07794		
DEN E (N) 9dpt	14,86659				

Por se tratar de um protocolo de padronização, para implantação de uma técnica ainda não executada no laboratório, alguns procedimentos precisam sofrer adaptações; um deles diz respeito à execução de IFI para infecção de vírus *reporter*. Durante o processo de eletroporação, as células foram submetidas a sucessivas lavagens e pulso elétrico. Esse tratamento conferiu aumento da permeabilidade da membrana celular, que pode ter resultado em menos células aderidas à lâmina de IFI, conseqüentemente entregando um resultado negativo mesmo em células infectadas, como demonstrado na Figura 23.

Figura 23 - IFI de células VERO transfectadas com RNA viral.

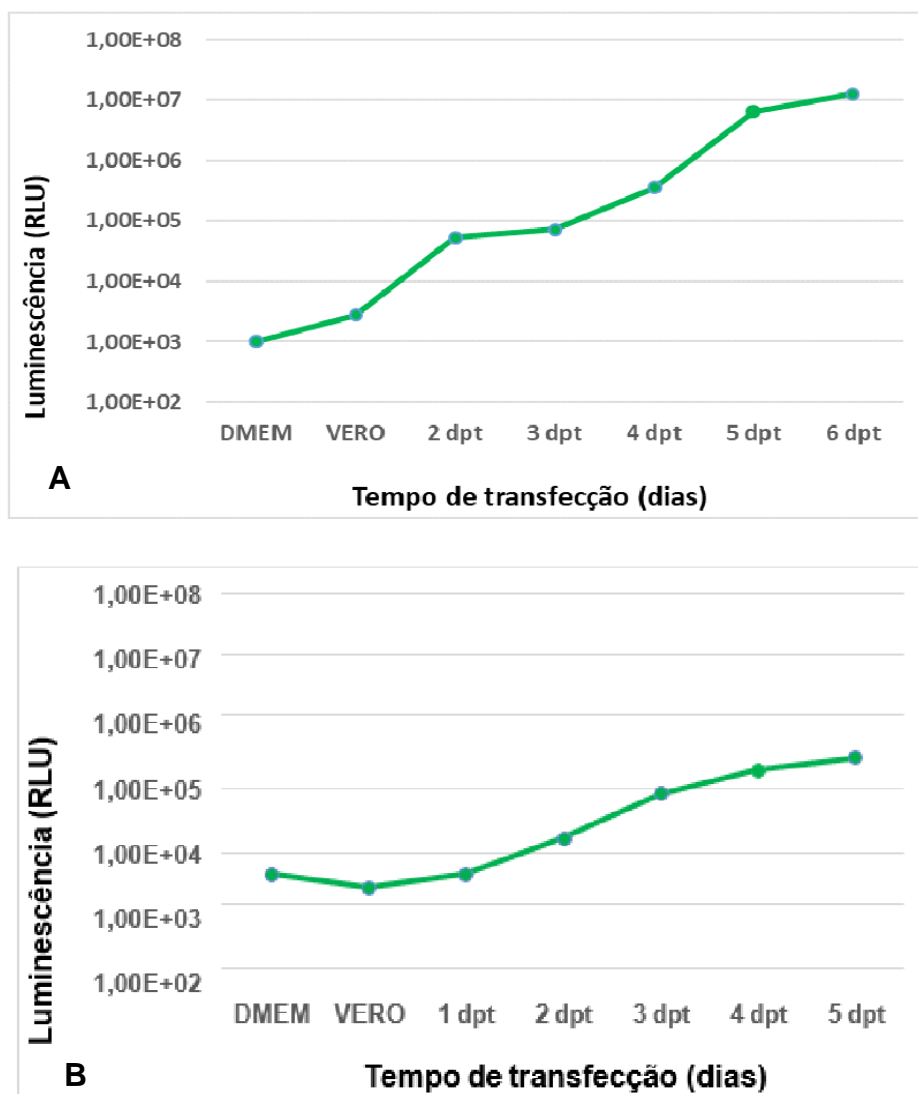


Legenda: Lâminas dos dias 2, 3 e 4 pós-transfecção sob objetiva de 20x. Da esquerda para a direita. Fonte: Laboratório de Isolamento Viral/Cultura de Células/SAARB (2019).

Já na avaliação da expressão da sequência da *Renilla* luciferase diretamente na plataforma Glomax, o sobrenadante da cultura de células transfectadas foi testado em dias pós-transfecção consecutivos. O DENV Rluc apresentou intensidade máxima igual $1,0 \times 10^7$ RLU no 6 °dpt (Figura 24A) e o ZIKV obteve luminescência máxima no 5 °dpt (Figura 24B).

A emissão de luz da placa e do meio de cultura DMEM sem células infectadas, também foram marcadas no gráfico, como o primeiro ponto de detecção, para controle de luminescência do teste (Figura 24A e 24B).

Figura 24 – Valores de luminescência de **(A)** DENV Rluc e **(B)** ZIKV após transfecção em células VERO.



Fonte: Laboratório de Clonagem e Expressão de Proteínas/SAARB (2009).

Para a execução do RVNT⁹⁰, a diluição ótima de vírus *reporter* foi de 1:4, e para o substrato ViveRen, 1:3000 foi a diluição que alcançou menor *background*. A maior diluição para substrato foi escolhida como forma racionalizar o reagente (1:1000 e 1:2000). Quanto às duas concentrações de células Vero testadas, não houve diferença na luminescência entre ambas (3×10^6 e 6×10^6 céls/mL), optando-se pela menor concentração.

Na etapa da testagem dos soros, previamente avaliados no equipamento Cytation™ 5.0 BioTek, e com a leitura da luminescência no ponto de 24 horas, sob condições semelhantes de incubação, observou-se um desempenho do sistema GloMax® bastante inferior ao encontrado no aparelho Cytation™ 5.0 BioTek, com resultados inconclusivos (Quadro 11).

Quadro 11 - Comparação entre os resultados dos ensaios de neutralização.

Grupos	Número de Registros	PRNT ₉₀	RVNT ₉₀	
			Cytation	GloMax
Dengue	H788930	1:640	1:6400	INC
	H789912	1:160	1:800	INC
	H817981	1:1280	1:12800	INC
	H819519	1:320	1:1600	INC
Zika	H816971 ⁽²⁾	1:20	1:1600	INC
	H819282 ⁽²⁾	1:40	1:6400	INC
	H823176 ⁽²⁾	1:160	>1:51200	INC
	H828107 ⁽²⁾	Neg	1:1600	INC

Legenda: INC – Inconclusivo; PRNT⁹⁰ – Teste de Neutralização por Redução de Placa – 90%; RVNT⁹⁰ – Teste de Neutralização utilizando vírus *reporter* – 90%

Durante essa padronização, além da concentração de célula, título viral e diluição de substrato, outras variáveis poderiam ser analisadas, como, por exemplo, tempo de incubação (duas e três horas) para neutralização do vírus *reporter* com soro com anticorpos anti-flavivírus e de tempo de seguimento para execução do teste (48, 72 ou 96 horas).

Vale salientar que, durante o desenvolvimento deste trabalho, foi priorizado o menor tempo que o vírus *reporter* pudesse ficar fora da célula ou em temperatura ambiente, visando preservar sua estabilidade e consequente

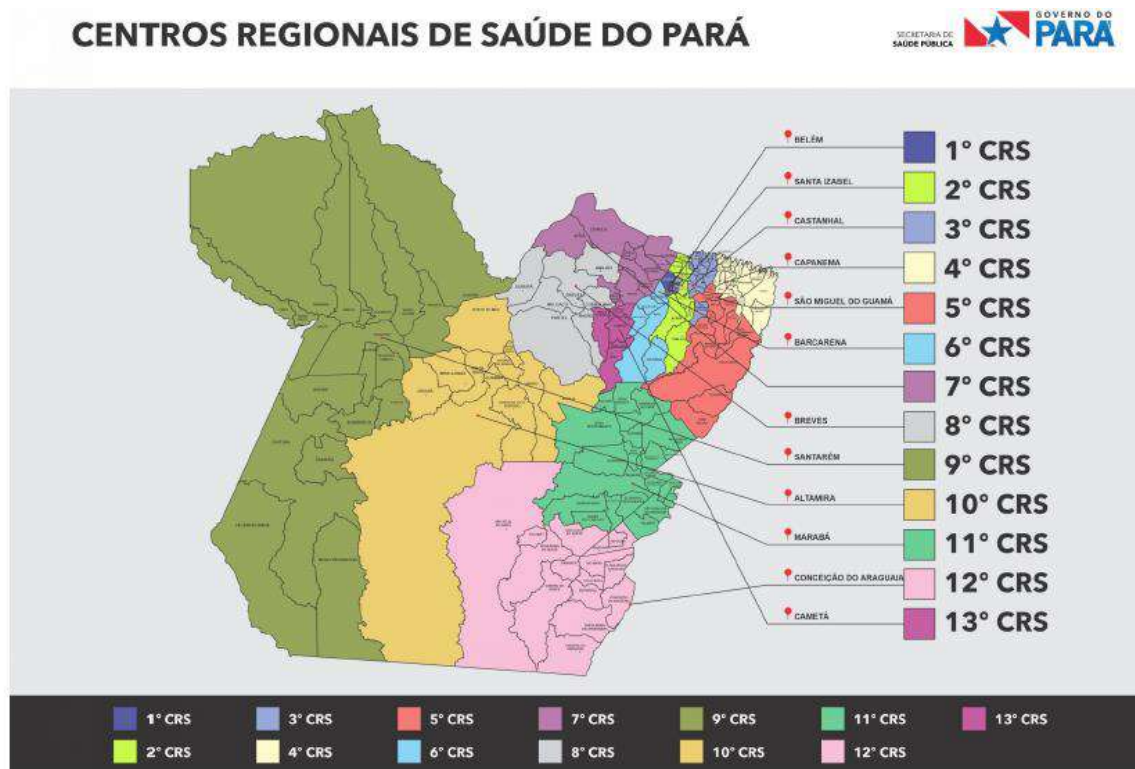
emissão de luminescência. Principalmente, para o vírus ZIKV Rluc, que obteve diferença de $\log 10^3$ entre o controle negativo e maior luminescência (Figura 24). Outra dificuldade enfrentada no trabalho, foi a escassez de volume de soros com perfil conhecido, comprometendo as análises de aspecto, tempo de neutralização e de seguimento de teste.

Outra limitação relevante é a própria capacidade de robustez de detecção de luminescência do equipamento Glomax® Promega, que pode ter contribuído para baixo desempenho do RVNT⁹⁰ DENV Rluc e ZIKV Rluc comparados Cytation™ 5.0 BioTek.

4.4. INVESTIGAÇÃO DE FLAVIVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA

A origem das amostras de LCR analisadas teve distribuição ampla entre os diversos Centros Regionais de Saúde do Pará (CRS). Dos treze CRS, apenas o 9°, o 10° e o 12° CRS não tiveram amostras incluídas nesse estudo. A dimensão geográfica do estado do Pará leva à descentralização do atendimento a serviços especializados, justificando a ausência dessas regionais. Enquanto, aqueles municípios localizados em regionais mais próximas da capital do estado foram os mais encontrados na pesquisa (do 1°, 2°, 3°, 4°, 5° e 6° CRS) (Figura 25).

Figura 25 - Centros Regionais de Saúde do estado Pará.



Fonte: <http://www.saude.pa.gov.br/wp-content/uploads/2021/09/CENTROS-REGIONAIS-DE-SAUDE-scaled.jpg>. Acesso em 06/04/2023.

Voltando a explanação dos dados, entre os 85 LCRs testados pela técnica de RT-qPCR, não houve detecção de RNA dos flavivírus testados (Quadro 6). Achados negativos no LCR para RT-qPCR não excluem que essas amostras sejam testadas nas metodologias sorológicas, principalmente, pela falta de suporte de descrições clínicas e epidemiológicas que nortearam a escolha do teste. Dessas 85 amostras, conseguiu-se testar 46 LCRs no IH, e, em nove desses LCRs, houve a detecção de anticorpos.

Na avaliação do IH, além dos 46 LCRs testados por biologia molecular, outros 69 LCRs foram submetidos à pesquisa de anticorpos. Ao final, foram testadas 115 amostras de LCR, sendo 106 (92,17%) negativas e 9 (7,83%) LCRs positivos para detecção de anticorpos, dos quais, oito com reação heterotípica de anticorpos anti-flavivírus, sendo que uma delas também apresentou anticorpos para OROV (BEL91739 H876276) e uma com reação monotípica anti-CHIK (BEL91755 H876317) (Figura 26 e 27). Destas, apenas um caso (BEL91739) teve amostra de soro coletado de forma pareada, confirmando os achados no LCR (S1

H876288: flavivírus 1:20 a 1:160; Oropouche 1:80; S2 H876289: flavivírus 1:20 a 1:80; Oropouche 1:20) (Figura 26 e 27). Dessas nove, somente em três foi realizado o teste do ELISA, cujo resultado foi não reagente. Ademais, seis casos apresentaram anticorpos hemaglutinantes para flavivírus no soro (H877625, H877644, H877686, H876291, H876295 e H876297), muito embora o resultado do LRC tenha sido negativo (Quadro 12).

Quanto às características do LCR das amostras que foram positivas no IH, 66,67% (6/9) eram incolores de aspecto límpido; > 50% apresentaram proteínas totais elevadas entre 59,3 a 698,8 mg/dL. Quanto aos exames citológicos, 77,77% (7/9) tinham pleocitose com predomínio de células mononucleares (Figura 27).

Quadro 12 – Detecção de anticorpos anti-flavivírus no IH no LCR e soro

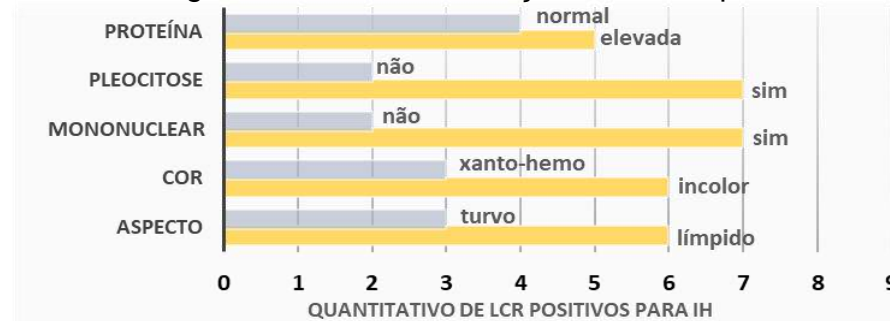
IDENTIFICAÇÃO			RESULTADOS FLAVIVÍRUS LCR			RESULTADOS FLAVIVÍRUS SORO				
N.	PACIENTE	INÍCIO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS	REGISTRO DA AMOSTRA	RT-qPCR	IH	ELISA	REGISTRO DA AMOSTRA	RT-qPCR	IH	ELISA IgM
1	BEL91735	IND	H876276	NÃO DETECTADO*	Flavivírus 1:20 a 1:80	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
							876288	NT	Flavivírus 1:20 a 1:160 Oropouche 1:80	INDETERMINADO
2	BEL91739	16 DIAS	H876290	NÃO DETECTADO*	Flavivírus 1:20 a 1:80 Oropouche 1:40	INDETERMINADO				
							876289	NT	Flavivírus 1:20 a 1:80 Oropouche 1:20	INDETERMINADO
3	BEL91755	2 DIAS	H876317	NT	Chikungunya 1:40	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
4	BEL91765	IND	H876332	NÃO DETECTADO*	Flavivírus 1:20 a 1:40	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
5	BEL91776	4 DIAS	H877609	NT	Flavivírus 1:20	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
6	BEL91809	14 DIAS	H877642	NÃO DETECTADO*	Flavivírus 1:20 a 1:80	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
7	BEL91817	IND	H877659	NÃO DETECTADO*	Flavivírus 1:20 a 1:80	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
8	BEL91826	IND	H877676	NT	Flavivírus 1:40 a 1:160	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND
9	PAG2946	5 DIAS	H877688	NT	Flavivírus 1:20 a 1:80	NÃO REAGENTE	IND	IND	IND	IND

IND: indisponível; NT: não testado; REG: Registro; IH: inibição da hemaglutinação; ELISA IgM: Ensaio Imunoenzimático de captura de anticorpo da classe IgM; RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real. *Não detectado: RT-qPCR para os vírus conforme o Quadro 2.

Figura 26 - Títulos de anticorpos anti-flavivírus no IH

IDENTIFICAÇÃO			Alphavirus						Flavivirus											Orthob
CAMPO	REGISTRO	AMOSTRA	EEEV	WEEV	MAYV	MUCV	TCMV	CHIKV	WNV	YFV	17D	ILHV	DENV4	SLEV	DENV2	ROCV	DENV1	DENV3	ZIKV	OROV
BEL91735	H876276	LCR	-	-	-	-	-	-	20	20	20	80	20	80	20	20	40	20	-	-
BEL91739	H876290	LCR	-	-	-	-	-	-	20	20	20	80	20	80	20	40	40	20	-	40
BEL91755	H876317	LCR	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BEL91765	H876332	LCR	-	-	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
BEL91776	H877609	LCR1	-	-	-	-	-	-	20	-	20	20	-	20	20	20	20	20	20	-
BEL91809	H877642	LCR1	-	-	-	-	-	-	40	20	40	40	-	40	80	20	40	20	20	-
BEL91817	H877659	LCR1	-	-	-	-	-	-	40	40	40	80	-	80	80	20	80	20	20	-
BEL91826	H877676	LCR1	-	-	-	-	-	-	80	40	40	80	40	80	160	40	160	80	80	-
PAG2946	H877688	LCR1	-	-	-	-	-	-	20	-	-	40	40	40	40	-	80	20	-	-
BEL91799	H877625	S1	-	-	-	-	-	-	20	-	20	40	-	20	20	20	40	20	20	-
BEL91810	H877644	S1	-	-	-	-	-	-	80	40	80	80	20	80	160	40	160	20	20	-
MBA1591	H877686	S1	-	-	-	-	-	-	20	-	-	20	20	20	20	-	20	20	-	-
BEL91739	H876288	S1	-	-	-	-	-	-	80	40	20	160	80	80	80	80	80	80	20	80
BEL91739	H876289	S2	-	-	-	-	-	-	20	40	20	40	40	20	20	80	80	40	20	20
TRA67	H876291	S1	-	-	-	-	-	-	20	-	-	20	20	20	20	-	80	20	-	-
MR167	H876295	S1	-	-	-	-	-	-	80	40	20	160	80	160	160	20	320	80	20	-
BEL91743	H876297	S1	-	-	-	-	-	-	20	-	-	20	20	20	20	-	20	20	20	-

LCR: líquido cefalorraquidiano; S: soro; EEEV: vírus da encefalite equina leste; WEEV: vírus da encefalite equina oeste; MAYV: vírus Mayaro; MUCV: vírus mucambo; TCMV: vírus tacauiama; CHIKV: vírus chikungunya; WNV: vírus do Nilo Ocidental; YFV: vírus da febre amarela; 17D: vírus da febre amarela vacinal; ILHV: vírus Ilheus; DENV4: vírus dengue 4; SLEV: vírus da encefalite de Saint Louis; DENV2: vírus dengue 2; ROCV: vírus rocio; DENV1: vírus dengue 1; DENV3: vírus dengue 3; ZIKV: vírus Zika; ORO: vírus Oropouche

Figura 27 – Análise física, química, citológica de LCR com detecção de anticorpos anti-flavivírus no IH**A****B**

IDENTIFICAÇÃO			EXAME FÍSICO		EXAME QUÍMICO		EXAME CITOLOGICO			
N.	CAMPO	REGISTRO	COR	ASPECTO	PROTEÍNA (mg/dL)	GLICOSE (mg/dL)	CITOMETRIA (cel/mm3)		IH	
							MONO	POLI		
1	BEL91735	H876276	CLARO	DISCRETAMENTE TURVO	192,4	40	300	100%	0%	Flavivirus 1:20 a 1:80
2	BEL91739	H876290	INCOLOR	LIGEIRAMENTE TURVO	698,8	49	502	21%	79%	Flavivirus 1:20 a 1:80 Oropouche 1:40
3	BEL91755	H876317	INCOLOR	LÍMPIDO	28,3	78	5	99%	1%	Chikungunya 1:40
4	BEL91765	H876332	INCOLOR	LÍMPIDO	37,8	62	1	100%	0%	Flavivirus 1:20 a 1:40
5	BEL91776	H877609	INCOLOR	LÍMPIDO	59,3	146	9	61%	39%	Flavivirus 1:20
6	BEL91809	H877642	INCOLOR	LÍMPIDO	44,8	180	10	100%	0%	Flavivirus 1:20 a 1:80
7	BEL91817	H877659	ROSADO	HEMORRÁGICO	159,1	41	135	34%	66%	Flavivirus 1:20 a 1:80
8	BEL91826	H877676	XANTOCRÔMICO	LÍMPIDO	435,	126	13	95%	5%	Flavivirus 1:40 a 1:160
9	PAG2946	H877688	INCOLOR	LÍMPIDO	19,8	91	9	99%	1%	Flavivirus 1:20 a 1:80

Proteína e glicose: mg/dL. N: número; Mono: mononuclear; POLI: Polimorfonuclear; IH: inibição da hemaglutinação.

A pesquisa de anticorpos totais no LCR (resultados do IH) sugere exposição prévia do paciente à infecção pelos flavivírus, porém não se pode precisar quando ocorreu essa exposição, ou mesmo se o vírus conseguiu invadir o SNC e/ou SNP. O que se sabe é que as doenças neuroinvasivas por flavivírus estão associadas à produção intratecal de anticorpos IgM, sendo este um marcador confirmatório de invasão viral do SNC. Encontrar anticorpos totais no LCR não indica, necessariamente, que tais anticorpos tenham sido produzidos no SNC. Temos que ter em mente que a própria alteração de permeabilidade das barreiras cerebrais, uma punção lombar traumática ou outra situação, na qual haja contato entre a grande circulação e o tecido nervoso, podem colaborar para os achados no LCR (Figura 26 e Quadro 15). Portanto, descartou-se a suspeita de doença neuroinvasiva causada pelos flavivírus, no momento da investigação diagnóstica para H876276 e H876332, uma vez que não houve detecção do RNA viral e nem de anticorpo IgM (Quadro 15).

Ainda é necessário testar RT-qPCR para H877685, H877676, H877688, H877609, H877642, H876332, H877659 para a obtenção de conclusões. No ELISA IgM, essas amostras de soros foram reagentes. De antemão, a indisponibilidade de soros oriundos em boa parte desses pacientes pode comprometer o desfecho, após a conclusão dos dois testes recomendados.

Além da reatividade para flavivírus, o LCR H876290, coletado no dia 03/07/2022, apresentou anticorpos anti-OROV - vírus membro do gênero *Orthobunyavirus* e, também, associado a casos neurológicos - no IH. O perfil de reatividade no LCR foi semelhante ao observado nos soros (H876288 e H876289, coletados, respectivamente, nos dias 08/07/2022, 15/07/2022). Para H876290, o teste de ELISA IgM anti-OROV apresentou um valor de DO considerado um valor indeterminado para o teste. Esse resultado indeterminado, representa uma zona cinza, na qual não se consegue determinar se amostra é positiva ou negativa. Na consulta à ficha epidemiológica para investigação de meningite, o paciente do sexo biológico masculino de 63 anos apresentou sintomas de meningite no dia 18/06/2022. Infelizmente, não houve descrição de quais sinais e sintomas o paciente apresentava, na coleta do LCR. Porém, há fortes evidências de que esse paciente sofreu algum comprometimento sistêmico de origem não esclarecida que

foi capaz de garantir a passagem desses anticorpos totais (anti-flavivírus e anti-OROV) ao SNC. Apontar o período exato em que a infecção pelo OROV ocorreu é uma ação precipitada. É mais prudente, sugerir que esse é um resultado inconclusivo para doença neuroinvasiva pelo vírus dos gêneros flavivírus e para OROV.

O caso BEL 91755 H876317 (LCR), que apresentou reação monotípica de para CHIKV na diluição 1:40, trata-se de um paciente do sexo masculino, 44 anos, que apresentava 2 dias de sintomas neurológicos. Na ficha epidemiológica disponível no GAL-LACEN, não havia descrição mais detalhada do perfil clínico e epidemiológico, e, como o resultado do ELISA-IgM foi negativo, há indicação de apenas exposição ao CHIKV.

5. DISCUSSÃO

O ecossistema amazônico apresenta vasta biodiversidade e potencial para a descrição de arbovírus potencialmente patogênicos para humanos. Ações antrópicas, como desmatamento, mineração, construção de rodovia e de usina hidrelétrica, como a construção de hidrelétrica no rio Tocantins, em Tucuruí/PA, produziu uma grande área inundada em meio à floresta tropical, trazendo, não paradoxalmente, a oportunidade para o isolamento de centenas de cepas de vírus, incluindo novas descrições no país e para a ciência (Medeiros & Vasconcelos, 2019).

A investigação de doenças neuroinvasivas causadas por arbovírus é amplamente negligenciada no Brasil. Estima-se que apenas 8,03% dos casos suspeitos de doença neuroinvasiva causada por arbovírus como DENV, ZIKV e CHIKV tiveram seu diagnóstico confirmado nos últimos 19 anos (Mello et al., 2021). Quando falamos da descrição de casos de doença neurológica causada pelos arbovírus classicamente neuroinvasivos, esses são ainda mais raros. No Brasil, dentre os arbovírus que classicamente causam doença neurológica, ocorre a circulação de SLEV (Costa et al., 2019), ROCV (Lopes et al., 1981), ILHV (Vieira et al., 2019), ZIKV (Pinheiro et al., 2016) e, mais recentemente, WNV (Martins et al., 2019; Vieira et al., 2015).

Os vírus WNV e SLEV são os flavivírus classicamente neuroinvasivos e de maior importância médica nos Estados Unidos (Danforth et al., 2022; Wimberly et al., 2022; Holcomb et al., 2023). Contudo, a confirmação da circulação do WNV no Brasil, a partir de 2014, trouxe a necessidade da implantação da ferramenta molecular capaz de diferenciá-los, uma vez que os dois vírus causam síndromes clínicas muito parecidas, e têm vetores e reservatórios semelhantes: mosquitos do gênero *Culex* e aves, respectivamente (Reisen & Wheeler, 2016; Viglietta et al., 2021; Foss et al., 2023; Holcomb et al., 2023). Além disso, a utilização do formato *duplex* iria garantir uma redução no volume de amostra necessária para investigação dos dois vírus, o que é importante tendo em vista que, usualmente, o diagnóstico molecular desses vírus em pacientes com sintomas neurológicos é realizado em

amostras de LCR, um tipo de amostra que, geralmente, está disponível em baixa quantidade.

No Brasil, há ocorrência de casos esporádicos de infecção humana por SLEV e evidência sorológica de circulação em animais, principalmente cavalos. A rede de vigilância genômica do vírus SLEV no país utiliza o protocolo de RT-qPCR em tempo real desenvolvido pelo grupo do CDC dos Estados Unidos como protocolo de referência, que conta com dois conjuntos de iniciadores e sonda, tendo como alvos, as regiões pré-membrana (prM) e envelope (ENV) do genoma do SLEV. Entretanto, apenas uma sequência do SLEV foi utilizada no desenho (SLE cepa-MSI.7, Mississippi, 1975. GenBank #M16614). Contudo, é importante citar que foram incluídas na análise outras 13 sequências de SLEV disponíveis na época que mostraram que as regiões utilizadas eram conservadas entre as cepas.

Neste estudo, a região NS5 do genoma de SLEV foi escolhida para desenho dos iniciadores e sonda. Essa região é reconhecida como conservada entre os flavivírus (Kuno et al., 1998; Scaramozzino et al., 2001). Para o desenho foi realizado um alinhamento entre 43 sequências de genoma completo do SLEV, 30 a mais do que o utilizado por Lanciotti et al. (2001). As análises *in silico* também mostraram que a cobertura dos iniciadores e sonda desenhados neste estudo é superior, sendo capaz de cobrir todas as 43 sequências de SLEV, ao passo que o conjunto do ENV falhou na cobertura de três sequências e o conjunto prM falhou na cobertura de duas sequências, com uma quantidade média de incompatibilidade de nucleotídeos de seis por todo conjunto.

O protocolo de referência para diagnóstico molecular de WNV na Rede de Vigilância de Arboviroses Neuroinvasivas no país é o desenvolvido por Lanciotti e colaboradores do CDC nos Estados Unidos (Lanciotti et al., 2000), no qual dois conjuntos de iniciadores e sonda foram desenhados utilizando como base a sequência do vírus WNV cepa NY99 (GenBank #AF196835), um na região 3'RNT e outro na região do ENV do genoma do WNV. Neste estudo, não foram desenhados novos iniciadores e sonda para WNV, devido à abundância de protocolos publicados, para detecção desse vírus (Lanciotti et al., 2000; Vázquez et al., 2016; Warang et al., 2021; Xu et al., 2022). Além disso, a baixa quantidade de sequências disponíveis de genoma de WNV de cepas circulantes no país (apenas uma está

descrita na literatura) não justifica o desenho de novos iniciadores e sondas. Os iniciadores/sonda do protocolo de referência de Lanciotti et al. (2000) não foram usados no desenvolvimento do protocolo *duplex* WNV/SLEV neste estudo, devido à utilização de apenas uma sequência de WNV no desenho e, também, pela escolha das regiões 3'RNT e ENV como alvos.

As regiões 3'RNT e ENV são comumente utilizadas para desenho de iniciadores/sonda para detecção de WNV em diversos outros trabalhos disponíveis na literatura (Fall et al., 2016; Tang et al., 2006; Warang et al., 2021). Porém, a porção 3'RNT do genoma dos flavivírus é propensa à formação de estruturas secundárias de RNA (Ng et al., 2017), muitas delas com funções importantes no ciclo replicativo e patogênese do WNV, além de evasão da resposta imune do hospedeiro (Roby et al., 2014). A presença dessas dobras de RNA pode prejudicar o anelamento dos iniciadores durante a etapa de transcrição reversa, interferindo na eficiência da produção do cDNA, e na queda da sensibilidade do qPCR. Além disso, genomas de RNA são altamente propensos à degradação por RNases, principalmente pelas exonucleases que são as mais abundantes. Essas enzimas degradam RNA, a partir das extremidades da molécula (Gagliardi & Dziembowski, 2018). Isso, associado ao fato de a extremidade 3' do genoma dos flavivírus ser desprovido de cauda poli-A, o que torna essa região bastante suscetível à degradação, levando também a uma perda de sensibilidade dos protocolos que a utilizam como alvo de detecção.

Por fim, a região 3'RNT também é utilizada na produção de pequenos fragmentos de RNA de interferência (sfRNA) que desempenham papéis importantes para manutenção da infecção viral (Slonchak et al., 2022). Ainda não se sabe os impactos que essas moléculas de sfRNA podem ter na detecção do genoma viral por iniciadores/sondas que tem como alvo regiões utilizadas na sua produção. Já a região do ENV foi evitada por não ser conservada o suficiente entre as várias linhagens de WNV, o que também poderia prejudicar a sensibilidade do protocolo. Isso ficou evidente no trabalho de (Lanciotti et al., 2000), no qual o conjunto de iniciadores/sonda do ENV falhou na detecção de 50% das cepas de WNV testadas. Diante do exposto, neste estudo foi selecionado um conjunto de iniciadores/sonda para WNV que tem como alvo a região NS2A do genoma de WNV (Xu et al., 2022).

Para ILHV e ROCV, não havia protocolos publicados para detecção de genoma por RT-qPCR. A maioria dos estudos que fizeram a detecção do genoma destes vírus utilizaram protocolos de RT-PCR com iniciadores genéricos para flavivírus, seguido de sequenciamento nucleotídico do produto de amplificação (Da Silva Pessoa Vieira et al., 2019; Medeiros et al., 2007; Milhim et al., 2020; Saivish et al., 2020). Por isso, foi preciso desenhar novos iniciadores e sondas. A região ENV do genoma foi escolhida para o desenho desses iniciadores e sondas, uma vez que essa é a região mais utilizada para flavivírus.

Devido à baixa quantidade de sequências disponíveis desses vírus na literatura, é impossível avaliar se as regiões escolhidas são representativas e conservadas entre as cepas em circulação na natureza. Porém, a análise *in silico* demonstrou que os iniciadores e sondas desenhados neste estudo são capazes de cobrir todas as cepas de ILHV e ROCV com genoma disponível, uma vez que a região escolhida é conservada entre elas. São necessários mais estudos com esses vírus com a identificação de casos e sequenciamento de mais genomas para confirmar essa informação e inferir se essas regiões são realmente conservadas dentro da espécie.

No Brasil, não há descrição da circulação dos vírus TBEV e JEV. Contudo, há risco de introdução no país, dada a distribuição de artrópodes que podem servir como vetores desses vírus (carrapatos *Ixodes* spp. e mosquitos *Culex* spp., respectivamente) bem como a presença de uma população suscetível, sem imunidade prévia. Por isso, é plausível que se disponha de ferramentas de diagnóstico para o monitoramento e vigilância desses vírus. No protocolo *quadriplex* de RT-qPCR desenvolvido neste estudo, foram utilizados iniciadores e sondas para TBEV desenhados previamente (Schwaiger & Cassinotti, 2003).

O desenho foi realizado utilizando como base os genomas publicados de quatro isolados de TBEV (três do subtipo europeu e um do subtipo Extremo Oriente) para identificação de regiões conservadas. A região escolhida foi a 3'RNT. Já para JEV, apesar de existirem alguns protocolos de RT-qPCR publicados (Barros et al., 2013; Bharucha et al., 2018; Huang et al., 2004; Xu et al., 2022; Yang et al., 2004), uma análise *in silico* mostrou que os iniciadores e sondas desenhados não eram capazes de cobrir todas as cepas de JEV disponíveis no banco de dados. Por isso,

optou-se pelo desenho de novos iniciadores e sondas. Devido à diversidade genética entre as cepas de JEV, a única região conservada o suficiente para permitir a cobertura de todas as cepas foi a região 3'RNT. Mesmo assim, ainda foi necessária a introdução de bases degeneradas nas sequências dos iniciadores e sondas.

A concentração ideal dos iniciadores e sonda para os protocolos de RT-qPCR foi determinada avaliando combinações de concentrações diferentes. Usualmente, a concentração de iniciadores pode variar de 50-1000 η M, enquanto, a de sonda, fica em torno de 50-300 η M. Altas concentrações de iniciador podem aumentar a sensibilidade de detecção do alvo, mas podem, também, diminuir a especificidade ao favorecer amplificações inespecíficas. Já concentrações mais baixas podem aumentar a estringência da reação, aumentando a especificidade, mas com o risco de comprometer a sensibilidade do teste. Dessa forma, a concentração ideal precisa ser determinada para cada protocolo e consiste naquela em que se obtiverem os menores valores de Ct e os maiores valores de ΔRn (Nunes et al., 2019).

Ao se avaliar em diferentes combinações de concentrações de iniciadores e sondas, para os seis alvos, dos dois protocolos padronizados nesse estudo, verificou-se que não houve muita variação entre os resultados obtidos para as diferentes combinações testadas, com valores de Ct variando dentro da faixa de um em média. Isso é especialmente evidente quando se olha para as concentrações de iniciadores especificamente. A concentração das sondas, por outro lado, parece ter tido um impacto maior nos valores de Ct, com concentrações maiores resultando em valores de Ct menores. A concentração de iniciadores e sonda escolhida para os dois protocolos foi de 500nM de iniciadores e 200 nM de sondas. Uma vez que, não foi observada grande diferença entre as concentrações, com exceção das concentrações mais baixas, a razão da escolha dessa concentração foi por conveniência, para manter a concentração para todos os alvos e também padronizar com os demais protocolos de detecção de arbovírus que utilizam essa concentração.

Outros protocolos publicados para detecção de WNV utilizaram diferentes concentrações de iniciador e sonda. Tang et al. (2006), Barros et al. (2013) e Lanciotti et al. (2000) utilizaram concentração final de 1 μ M de cada iniciador e 200 nM de sonda. Vazquez et al. (2016) utilizaram 800 nM de iniciadores e uma alta

concentração de sonda (400 nM), ao passo que Zink et al. (2013) utilizaram uma alta concentração de iniciadores (1200 nM) e uma baixa concentração de sonda (60 nM). Xu et al. (2022) utilizaram uma concentração 500nM tanto para iniciador quanto sonda. Porém, é importante dizer que condições de reação, como tipo de mistura de reação e equipamento utilizados, influenciam diretamente no desempenho da qPCR (Bustin et al., 2009) e, conseqüentemente, na concentração de iniciadores e sondas utilizada, o que dificulta a comparação entre os diferentes protocolos.

A avaliação dos parâmetros analíticos do protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV mostrou uma boa especificidade analítica, uma vez que não houve amplificação em nenhuma das amostras positivas para os 12 arbovírus testados. As quatro amostras de soro/sangue foram obtidas de pacientes infectados com alta viremia e confirmada por RT-qPCR (valores de Ct variando em média de 18-24). As demais amostras foram provenientes de culturas de células e cérebro de camundongos lactentes infectados. Nesse tipo de amostra, a carga viral é geralmente muito maior do que as concentrações fisiológicas desses patógenos em infecções naturais, com valores de Ct < 10.

Mesmo assim, todas as amostras foram negativas para o *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV, mostrando que não houve amplificação cruzada do RNA desses patógenos pelos conjuntos *primer/sonda* desenhados neste estudo, como já era esperado na análise *in silico*. Contudo, seria importante complementar essa avaliação com a inclusão de amostras positivas para outros arbovírus mais relacionados filogeneticamente, com WNV e SLEV, como os vírus JEV e o *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV), além de outros patógenos que podem causar quadros clínicos semelhantes como herpesvírus, enterovírus.

Quanto ao LD, dois pontos devem ser levados em consideração: 1) os Lanciotti et al., 2000; Lanciotti & Kerst (2001); Chao et al. (2007), não fizeram uma análise estatística para determinação do LD, utilizando apenas o limite de ponto final como parâmetro; portanto, o LD reportado pode ser diferente do real quando se leva em consideração um intervalo de confiança de 95%; e 2) as unidades de concentração utilizadas são diferentes (PFU e cópias de RNA), o que dificulta a comparação, uma vez que a conversão de PFU para número de cópias de RNA,

apresenta um alto grau de incerteza e depende de vários fatores, como as cepas utilizadas, as condições de cultivo e o período pelo qual o vírus foi armazenado.

Ademais, o LD do WNV obtido nesse estudo foi próximo dos LDs obtidos em outros estudos que desenvolveram protocolos de detecção para WNV, que variaram entre 5 a 20 cópias de genoma de WNV (Boga et al., 2019; Vázquez et al., 2016; Warang et al., 2021). Interessantemente, o LD do WNV obtido nesse estudo foi superior àquele obtido no trabalho original de Xu et al. (2022), que desenharam os iniciadores e sonda de WNV utilizados aqui (14,08 vs 5). Além disso, Xu et al. (2022) utilizaram plasmídeos de DNA para determinação do LD de WNV, possivelmente devido à indisponibilidade de RNA viral. A utilização de DNA não representa com fidelidade a amplificação de alvos de RNA, uma vez que a eficiência da transcrição reversa não é levada em consideração nesse tipo de análise (Bustin et al., 2009).

A acurácia diagnóstica (especificidade e a sensibilidade clínica) de um novo método de diagnóstico é definida pela comparação de seus resultados com aqueles obtidos por um método de referência ou padrão-ouro a partir de um conjunto de amostras de resultado conhecido (Cohen et al., 2016). Para isso, a acurácia diagnóstica do protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV foi avaliada utilizando um conjunto de 60 amostras de LCR todas sabidamente negativas para ambos os vírus. Dessas, 20 amostras foram selecionadas e infectadas artificialmente com quantidades variadas de WNV e outras 20 amostras com quantidades variadas de SLEV.

O uso de amostras artificialmente infectadas foi necessário, uma vez que não se dispunha de amostras clínicas positivas dos vírus WNV e SLEV para incluir no painel. Além disso, amostras de LCR foram escolhidas, em virtude de ser o principal tipo de amostra utilizado para o diagnóstico de doença neuroinvasiva por arbovírus (Brasil, 2017). Todas as amostras foram testadas em paralelo pelo protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV desenvolvido neste estudo (teste índice) e pelos protocolos usados no diagnóstico de cada vírus (teste de referência) (Lanciotti et al., 2000; Lanciotti & Kerst, 2001) para avaliação do desempenho diagnóstico do protocolo. Não houve detecção do genoma de WNV e SLEV em nenhuma das amostras sabidamente negativas (20/20) para todos os protocolos, enquanto, que, todas as

amostras sabidamente positivas (40/40) obtiveram resultado detectável para o genoma dos vírus WNV e SLEV, em todos os protocolos (índice e de referência).

Esses resultados demonstram que houve 100% de concordância entre o protocolo *duplex* RT-qPCR WNV/SLEV e os protocolos de referência (índice $\kappa = 1,0$; $p < 0,001$), e, conseqüentemente, 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia. Contudo, alguns pontos precisam ser ressaltados. Primeiro, como já mencionado, as amostras positivas utilizadas no painel foram artificialmente infectadas. Além disso, apenas uma cepa de WNV (cepa BeAn854747, GenBank #MH643887) e SLEV (cepa BeAr23379, GenBank #EF158048) foi utilizada na infecção das amostras de LCR, limitando a diversidade genética entre as amostras testadas. Para avaliar com mais fidelidade o desempenho do ensaio, é necessária a utilização de amostras clínicas de pacientes naturalmente infectados pelos vírus WNV e SLEV.

Dentre todos os protocolos publicados para detecção do genoma de WNV e SLEV por RT-qPCR avaliados (Boga et al., 2019; Fall et al., 2016; Lanciotti et al., 2000; Vázquez et al., 2016; Xu et al., 2022), nenhum realizou avaliação do desempenho diagnóstico dos protocolos com aplicação de testes estatísticos para determinação da acurácia, como feito neste estudo. Alguns utilizaram o protocolo para testar amostras clínicas ou de mosquito de resultado desconhecido. Um estudo testou 19 amostras clínicas de soropositivo para WNV em comparação com um teste de referência, e obteve 100% de concordância, porém não foram feitos testes estatísticos (Mishra et al., 2019).

Quanto ao protocolo *quadriplex* RT-qPCR ILHV/ROCV/TEBV/JEV não foi possível concluir a padronização, uma vez que não se conseguiu a produção *in house* dos clones dos vírus ILHV e ROCV, e sua aquisição comercial não aconteceu a contento. Sem os clones, não foi possível a produção dos padrões de RNA para construção das curvas padrão e determinação dos limites de detecção. Por isso, ainda é preciso concluir essas etapas para finalizar a padronização analítica deste protocolo. Além disso, também não será possível avaliar a acurácia diagnóstica deste protocolo, uma vez que não há, no Brasil, amostras clínicas disponíveis nem isoladas de TBEV, nem de JEV para testagem de amostras positivas, ou pelo menos, produção de amostras infectadas artificialmente.

O alinhamento sequencial da proteína E dos quatro sorotipos DENV para estudar a conservação e a homologia de aminoácidos indicaram uma estreita relação entre DENV-1 e DENV-3, com homologia de até 78,4%. DENV-1 com DENV-2 e, DENV-2 com DENV-3, apresentaram 66,1% e 66,3% de identidade de aminoácidos, respectivamente. Enquanto, que DENV-1 com DENV-4, DENV-2 com DENV-4, e DENV-3 com DENV-4, mostraram 63,3%, 62,8% e 63,4% de homologia, respectivamente. Dados prévios que apontam que DENV-4 é o sorotipo que apresenta relação mais distante com os três sorotipos (Venkatachalam & Subramaniyan, 2014).

No alinhamento de sequência múltipla da proteína E entre os flavivírus, YFV e TBEV são altamente relacionados, embora distantes de WNV, JEV, ZIKV e dos quatro sorotipos de DENV (Chakraborty, 2016). Outrossim, a proteína E do ZIKV e DENV-2 compartilham ~54% de identidade de sequência aminoacídica (Priyamvada et al., 2016; Ngono & Shresta, 2018). O ZIKV também compartilha 57% de identidade da sequência de aminoácidos com WNV, 56,1% com JEV, 55,6% com DENV e 46% com YFV (Chang et al., 2017). Um estudo filogenético de Kuno et al. (1998) entre clusters de vírus transmitidos por vetores daqueles não vetoriais sugeriu que os vírus deste gênero evoluíram do grupo não vetorial para o grupo transmitido por carrapatos e depois para o grupo transmitido por mosquitos.

Foi relatado, por Li et al. (2016), que o anticorpo monoclonal (mAb) 3B6 se liga ao epítopo EXE/DPPFG em domínio III da proteína E, que é altamente conservado (aproximadamente 85%) em DENV, WNV, ZIKV, JEV, MVEV e SLEV, indicando que a função do epítopo é semelhante nesses vírus. O epítopo EXE/DPPFG é um epítopo imunodominante entre os flavivírus e a reatividade cruzada entre DENV, YFV, ZIKV e WNV pode ser a ele atribuído (Dejnirattisai et al., 2015; Fibriansah et al., 2015; Chan et al., 2022).

Os anticorpos neutralizantes produzidos na infecção contra flavivírus têm como principal alvo a proteína viral E (Priyamvada et al., 2017; Fernandez & Diamond, 2017). A proteína E é o antígeno viral mais exposto e é considerada o principal alvo de resposta imune. Essa proteína tem importância na interação entre os receptores de superfície na célula do hospedeiro. O Domínio III da proteína E (EDIII) de DENV contém epítopos reconhecidos por anticorpos neutralizantes

sorotipo-específicos (Sukupolvi-Petty et al., 2007; Shrestha et al., 2010; Dejnirattisai et al., 2015; Fibriansah et al., 2015). Entretanto, a infecção por DENV parece aumentar dos títulos de anticorpos neutralizantes contra EDIII de ZIKV (Robbiani et al., 2017); na prática, soros de pacientes com DENV podem demonstrar alto potencial de neutralização cruzada com ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016; Swanstrom et al., 2016).

De forma geral, maior parte do soro é formada por anticorpos que se ligam à proteína de membrana (M) e ao epítipo de fusão do Domínio II da proteína E que neutralizam fracamente os vírus, porém contribuindo para alta reação cruzada (Wahala & Silva, 2011).

Algo evidente neste trabalho foi a baixa sensibilidade do PRNT⁹⁰ frente ao RVNT⁹⁰, o que pode ser explicado devido ao limite de detecção inferior do referido teste e do método de revelação empregado no RVNT⁹⁰. O PRNT⁹⁰ convencional necessita de um quantitativo suficiente de células agrupadas com ECP para formar uma placa visível, e então serem contra-coradas (Lanciotti et al., 2008; Cordeiro et al., 2016). No caso das amostras procedentes do Brasil, que mostram um perfil de resposta secundária para flavivírus, as placas são menores do que as do controle, o que pode ter influenciado diretamente na sensibilidade do PRNT⁹⁰ convencional. De fato, estudos mostram que anticorpos neutralizantes prévios para DENV podem resultar numa sub neutralização qualitativa e quantitativa, quando ocorre uma segunda infecção por outro sorotipo do DENV (Ngono & Shresta, 2018). Dada a significativa similaridade genética entre ZIKV e DENV (Zhu et al., 2016), é bem possível que anticorpos prévios de DENV estejam neutralizando parcialmente o ZIKV causando uma redução do diâmetro das placas, bem como a redução de número de placas. Já RVNT⁹⁰ a utilização de um sistema automático para a detecção, possibilita a detecção das placas que não são visíveis a olho nu.

A maior sensibilidade do RVNT⁹⁰ ZIKV Rluc com relação ao RVNT⁹⁰ ZIKV mCherry pode ser explicada pela característica química do componente *reporter*. O método de detecção do RVNT⁹⁰ ZIKV mCherry, (Rozelle et al., 2014) baseia-se na identificação das células infectadas através da distinção das células que estão emitindo fluorescência daquelas que não estão, permitindo, assim, a contagem de cada uma dessas células, por meio de um programa de imagem (Shan et al.,

2017a). RVNT⁹⁰ ZIKV RLuc, por outro lado, baseia-se na detecção do sinal de luminescência produzido por todas as células infectadas. Isso associado ao fato de que a captação de luminescência é de 10 a 1.000 vezes mais sensível que a de fluorescência, por exemplo, leva a uma sensibilidade superior ao RVNT⁹⁰ ZIKV RLuc (Allard & Kopish, 2008).

Apesar de o RVNT⁵⁰ ZIKV mCherry já ter sido usado para avaliar o perfil da resposta imune em estudos experimentais com camundongos A-129 e primatas não humanos (Shan et al., 2017a), não há uma validação desse vírus *reporter* com relação a amostras humanas. Por isso, este foi um dos objetivos deste trabalho, porém aumentando o *cut off* de 50% para 90%. Outro fator era avaliar a detecção de anticorpos neutralizantes com relação ao tempo de doença, uma vez que, em estudos experimentais, mostrou-se a possibilidade de detecção desses anticorpos a partir do sétimo dia pós-infecção (Shan et al., 2017a). Por isso, por mais que a indicação do PRNT⁹⁰ seja para amostras com mais de sete dias de doença (CDC, 2016), neste trabalho, avaliamos amostras que foram coletadas no período virêmico (grupos I e III). No entanto, nossos resultados mostraram que não há como concluir um diagnóstico com base no RVNT⁹⁰ para este estágio da infecção viral, devido, sobretudo, ao *background* de anticorpos prévios para flavivírus apresentada pela população brasileira.

Ao se avaliar o contexto temporal da exposição da população brasileira a infecções por flavivírus, observa-se que houve uma mudança do perfil da resposta imune da população brasileira após a introdução do ZIKV. Observa-se que nas amostras dos grupos I e II, coletadas antes de 2015, há uma redução da reação cruzada das amostras positivas para DENV com o antígeno do ZIKV dos testes RVNT⁹⁰. Por outro lado, após 2015, mesmo na fase virêmica (grupo III), anticorpos neutralizantes para ZIKV, possivelmente da classe IgM, já são detectáveis por ambos RVNT⁹⁰. É importante enfatizar que somente o ensaio de RVNT⁹⁰ não é suficiente para definir os casos de infecção por DENV ou ZIKV no Brasil, ou qualquer outro país, em que haja co-circulação de vários flavivírus, uma vez que, entre os soros do grupo IV, apenas quatro amostras tiveram títulos maiores para ZIKV quando comparados ao DENV. As outras 13 amostras seriam equivocadamente diagnosticadas como reagentes para DENV caso somente o teste

de RVNT⁹⁰ fosse utilizado. Todavia, sabe-se que essas amostras tiveram diagnóstico molecular confirmado com identificação do RNA do ZIKV através de RT-qPCR, não havendo dúvidas quanto à infecção por ZIKV destes pacientes.

A circulação de DENV por mais de 30 anos, juntamente com YFV, incluindo a vacina YFV 17D, além de outros flavivírus - ILHV, Bussuquara vírus (BUSV), vírus Cacipacoré (CAPV), ROCV, SLEV, resultou em ampla imunidade aos flavivírus, principalmente, em indivíduos mais velhos.

É bem provável que o perfil apresentado por esses pacientes do grupo IV deva-se ao fenômeno conhecido como 'pecado antigênico original', e que acontece quando, em infecções sequenciais com vírus relacionados, o sistema imune responde como cometendo um erro, reconhecendo e produzindo linfócitos T de memória e anticorpos em resposta à segunda infecção, como se fosse a primeira infecção. Nessa situação, são gerados clones de anticorpos de baixa avidéz, que, por sua vez, montam uma resposta imune ineficaz. Esses anticorpos não são específicos para destruir o vírus da segunda infecção, resultando em proteção cruzada ou na exacerbação da infecção (Mongkolsapaya et al., 2003; Heinz et al., 2017; Culshaw et al., 2017; Rathore et al., 2020; Van Leur et al., 2021; Gomes da Silva et al., 2023).

Embora a aquisição do equipamento CytationTM 5.0 BioTek para leitura da fluorescência produzida seja o mais oneroso para implantação do teste na rede de laboratório no Brasil, a utilização do aparelho não está restrita ao ensaio de neutralização, como descrito pelo fabricante BioTek. Outras técnicas podem ser realizadas, como imunoenaios (ELISA), quantificação de proteínas totais e ácidos nucleicos, ensaio com biomarcadores e expressão gênica (BioTek® Instruments, 2015).

Desde a primeira vez que um vírus infeccioso foi produzido, a partir da transfecção de um plasmídeo de DNA contendo genoma completo de poliovírus, por Racaniello & Baltimore (1981), diversas tecnologias envolvendo genética reversa têm sido empregadas para gerar vírus recombinante, permitindo, então, a inserção de mutações específicas, e elucidando mecanismos de replicação, transcrição, patogenicidade, interações vírus-hospedeiro e transmissibilidade viral ao hospedeiro (Ávila-Pérez et al., 2018).

É importante ressaltar que as abordagens envolvendo genética reversa também podem ser aplicadas ao desenvolvimento de vacinas baseadas em formas atenuadas do vírus, como, também, para a geração de vírus recombinantes que abrigam genes *reporter*, tanto para o rastreamento de infecção viral como para testes de triagem para antivirais e quantificação de anticorpos neutralizantes (Ávila-Pérez et al., 2018).

Mesmo diante da vasta aplicabilidade, trabalhar com ferramentas que envolvam genética reversa pode abrigar dificuldades, especialmente para flavivírus. Vetores de baixa cópia são empregados na produção de ZIKV recombinante, uma vez que um vetor de alta cópia pode elevar o nível de proteínas tóxicas para a célula hospedeira (*E. coli*) e interferir na clonagem desses flavivírus (Aubry et al., 2015, Shan et al., 2016).

Nesse trabalho, durante a avaliação do Glomax, enfrentam-se dificuldades em alcançar uma boa concentração de DNA plasmidial, durante a amplificação em média escala, para então dar seguimento a transcrição *in vitro*. O baixo rendimento encontrado, sobretudo, para o ZIKV pode ser justificado pela lenta taxa de crescimento, que é característica do plasmídeo de baixa cópia utilizado. Essa particularidade exigiu a adoção de diferentes estratégias, envolvendo desde processos de concentração, aumento na escala de extração plasmidial e mudança no fabricante do kit de extração.

Conforme explica Breen et al. (2016), a escolha do gene *reporter* geralmente depende da finalidade do estudo. Nesse sentido, genes com sequência fluorescente são indicados para observação localizada, enquanto, que as luciferases são recomendadas para fins quantitativos.

Shan et al. (2016) construíram o clone infeccioso de ZIKV e os vírus *reporter* derivados com a sequência da Renilla luciferase e demonstraram que tal estratégia pode ajudar na compreensão de virulência e transmissão em mosquitos. No ano seguinte, Shan et al. (2017) validaram o teste *reporter* em placas de 96 poços, utilizando soros humanos, como forma de contornar as desvantagens do PRNT⁹⁰ e alcançar resultados equivalentes a esse teste tradicional, aliando a redução de tempo de entrega dos resultados em até 48 horas.

Em consideração a este projeto e na ausência do leitor utilizado no estudo anteriormente mencionado, buscou-se implantar RVNT⁹⁰ utilizando o luminômetro GloMax® para leitura da atividade da luciferase na quantificação de anticorpos neutralizantes de soro de pacientes humanos. Assim como Kassar et al. (2017), também obtivemos sinais de luminescência crescentes após transfecção de DENV e ZIKV Rluc em células Vero, imediatamente após a incubação e anteriormente a coleta do estoque viral. Entretanto, após o descongelamento e dosagem, os estoques de vírus *reporter* de DENV e ZIKV Rluc não reproduziram a escala de luz esperada, ou pelo menos similar ao desempenho de RLU apresentado no próprio aparelho, mesmo após 96 h de infecção.

Aubry et al. (2015) relatam que, para uma produção adequada de vírus, é fundamental que condições de esterilidade, temperatura e atmosfera de CO₂ sejam rigorosamente controladas, de modo que variações sofridas durante este processo podem ser determinantes na manutenção celular e produção viral. Além disso, fatores inerentes ao tempo de incubação, estabilidade viral e perda da capacidade em produzir luciferase, durante o ciclo replicativo dos vírus, ou até mesmo do sistema de detecção utilizado, podem estar associados à baixa emissão de luz.

Durante revisão de literatura mais detalhada, observou-se que a maioria dos protocolos de detecção de anticorpos neutralizantes com *reporters* genéticos fazem uso de sistemas de multidetecção de luminescência ou fluorescência mais robustos, como Cytation™ 5.0 (BioTek) e Becton-Dickinson LSRII (Mattia et al., 2011, Shan et al., 2016 Shan et al., 2017).

De acordo com o fabricante Promega, o limite de detecção da luciferase no GloMax® é da ordem de 3×10^{-21} moles de luciferase. Na prática, observamos que os valores de *background* ou luminescência basal que corresponde à luz captada nos poços contendo células não infectadas, foram da ordem de 10^4 , valor esse, bastante próximo da detecção máxima alcançada para o ZIKV Rluc, que foi em torno de 10^5 . Essa proximidade de RLU entre os controles negativos e positivos torna inviável o uso do sistema GloMax® no teste de neutralização utilizando vírus *reporter* de DENV e ZIKV com Renilla luciferase, baseado nas condições estudadas.

Para esclarecer aspectos envolvidos com a dificuldade na detecção de luminescência e melhor avaliar a produção dos vírus *reporter*, são necessários que

alguns pontos sejam superados, tais como: a aquisição de insumos, reagentes, aparelhos, adequação de infraestrutura laboratorial e apropriação técnica da tecnologia.

Um exemplo claro, é a necessidade do entendimento da baixa luminescência alcançada no material recuperado do sobrenadante de cultura. Uma sugestão seria a realização de um ensaio capaz de detectar Renilla luciferase de forma mais eficiente que o GloMax®, como descrito por Lorenz et al. (1996) e Venisnik et al. (2006). Esses autores utilizaram gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) e *western blotting* para detecção de proteína utilizando anticorpo anti-Renilla luciferase.

Outro ponto que deve ser considerado, é que o material obtido da amplificação plasmidial, do produto da transcrição *in vitro* e os vírus recuperados devem ser submetidos ao sequenciamento de nova geração. Em nosso estudo, foi possível realizar apenas a análise da sequência genômica do plasmídeo, em virtude da ausência de kits de sequenciamento RNA. Essa carência gerou uma lacuna no que diz respeito ao reconhecimento de possíveis mutações nas sequências de RNA que poderiam ter afetado a replicação viral e contribuído para resultados não satisfatórios.

Diferentemente dos vírus parentais que podem ser compostos de quasispecies, os vírus recombinantes são oriundos de transcritos de RNA homogêneos, como explica Shan et al. (2016). Entretanto, a possibilidade de que, durante o processo de replicação, uma população de vírus selvagens sofra reversão não está descartada. Sabe-se que, durante a replicação, o genoma do vírus parental é utilizado como molde, e assim, o aparecimento de mutações pode ser repassado a gerações futuras, aumentando, portanto, a variabilidade de sub-populações produzidas.

Diante dessa explicação, a ocorrência de mutações e a consequente supressão de vírus *reporter* resultaria na diminuição da expressão de gene da Renilla luciferase. Chao et al. (2002) pontuam que os vírus de genoma de RNA apresentam maior taxa de mutação, devido às polimerases do RNA viral possuírem baixa fidelidade, hipótese que poderia justificar a baixa detecção da luminescência de ambos os vírus. Assim, mesmo diante de todo o tempo dedicado a esse trabalho,

ainda não foi possível implantar o teste de neutralização utilizando vírus *reporter* de DENV e ZIKV com Renilla luciferase em sistema de detecção GloMax®. É necessário investimentos financeiros futuros e uma nova repetição com adequações do protocolo para entrega desse teste.

A patogênese das infecções por flavivírus neurotrópicos envolve complexas interações de vírus-hospedeiro, que afetam tanto a replicação do vírus como sua eliminação pelas respostas imunes, inata e adaptativa, induzidas, tanto na periferia como dentro do SNC (Maximova & Pletnev, 2018). Clinicamente, a infecção periférica é refletida por uma fase inicial da apresentação clínica geral e inespecífica, em que os sintomas neurológicos estão ausentes (Grygorczuk et al., 2022). Em modelo animal de encefalite por WNV, a infecção e a replicação viral ocorrem dentro das células endoteliais da BHE, cruzando-a; uma entrada adicional do vírus no SNC. É garantida através da participação de leucócitos migratórios (mecanismo do cavalo de Troia) (Constant et al., 2023).

De fato, WNV é um flavivírus neurotrópico mais estudado, e sabe-se que ele pode infectar diretamente as células endoteliais da BHE ou usar monócitos infectados para atingir o SNC. Além disso, na presença de WNV, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) podem levar à desregulação da BHE, através da diminuição da expressão da proteína de junções apertadas (TJ), provocando, assim, transcitose de monócitos infectados pela BHE. Durante o reconhecimento destes PAMPs por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), uma resposta antiviral induzida leva à secreção de interferons (IFNs) e citocinas inflamatórias (por exemplo, IFN tipo I, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10). Esses mecanismos, além de levarem ao controle da propagação viral, podem participar da inflamação sistêmica e exacerbar infecção (Constant et al., 2023). Além de favorecerem o acesso do vírus ao SNC, leucócitos circulantes e monócitos participam da proteção contra infecção cerebral, sobretudo, através das células T CD4⁺ e CD8⁺, de forma direta com a destruição da célula infectada ou indireta com produção de anticorpos, usados como alvo diagnóstico (Pan et al., 2022).

Em nossa pesquisa, não foi encontrado nenhum caso confirmado de infecção neuroinvasiva para os flavivírus testados em LCR. A ausência de informações epidemiológicas quanto à possível exposição desses pacientes a flavivírus,

especialmente pelo desenvolvimento de sintomas semelhantes à doença por eles causada, e de um apoio clínico na triagem das amostras podem ser apontados como fatores limitantes no rastreio de casos. Contudo, a ausência de febre, exantema ou artralgia nos quadros neurológicos não exclui o caso a um desfecho com complicações das infecções por arbovírus. Pelo contrário, infecções do sistema nervoso podem ocorrer na ausência desses sintomas e sinais clássicos das arboviroses, ou, até mesmo, surgirem dias a semanas após resolução dos sinais e sintomas (Brasil, 2017).

Comumente, a confirmação de doença aguda por produção de anticorpos no interior do tecido nervoso é evidenciada a partir da detecção da classe IgM. A coleta de dois soros em fases diferentes da doença (um na fase aguda até o 5º dia de infecção, e outro na fase convalescente, a partir do 20º dia da infecção por flavivírus), pode ajudar a esclarecer os casos nos quais há comprometimento neurológico sem a detecção do vírus no LCR. Em infecções por ZIKV, por exemplo, a viremia é muito curta e os títulos de anticorpos formados são tão baixos que não são suficientes para a detecção por técnicas convencionais.

Anticorpos podem ser, geralmente, detectáveis, a partir da segunda semana após a infecção, quando os distúrbios neurológicos são diagnosticados (Johnson et al., 2016). Esses anticorpos podem permanecer por semanas (Stiasny et al., 2012). Conforme o trabalho publicado por Kapoor et al. (2004), anticorpos IgM anti-WNV podem persistir por pelo menos 47 dias no LCR após doença do SNC. O anticorpo da classe IgM tem uma estrutura pentamérica que não é transferida passivamente por barreiras corporais humanas como, as cerebrais, as mamárias e a uterina. Nesses “reservatórios imunológicos”, a presença desse anticorpo confirma a infecção local do vírus, e conseqüentemente, a resposta do sistema imune do hospedeiro contra essa invasão naquele sítio.

No presente estudo, sete LCRs e oito soros apresentaram reação a, pelo menos, quatro flavivírus. A presença de anticorpos totais, como encontrado nesta pesquisa, revela que o paciente, em algum momento da vida, teve exposição a pelo menos um membro dos flavivírus. Essa exposição prévia pode ou não ter sido acompanhada de sintomas neurológicos. Por outro lado, por se tratar de pacientes de área endêmica para flavivírus, é bem provável que o perfil da resposta imune

desses pacientes seja de resposta secundária e, portanto, observa-se uma menor produção de IgM e um *busting* de anticorpos IgG heterólogos, derivados da resposta de memória à infecção prévia por algum flavivírus ou mesmo à vacina contra febre amarela (Henriques et al., 2020).

Em trabalhos epidemiológicos, o acesso as informações complementares, quanto à ocorrência de internação prévia por sintomas neurológicos, subsidiaram a hipótese de doença neuroinvasiva prévia por flavivírus. Sem essas informações torna-se prematuro afirmar a origem dos anticorpos IgG, se dá grande circulação ou do SNC, por produção intratecal. Em populações superexpostas a flavivírus, os soros tendem a apresentar perfil heterotípico para mais de um flavivírus em reações a anticorpos totais. Chalhoub et al. (2022) relataram que 83% dos soros humanos detectados foram considerados soropositivos para pelo menos um flavivírus, necessitando do teste de anticorpos neutralização para diferenciar os anticorpos específicos, semelhante ao observado por Vieira et al. (2015).

As imunoglobulinas da classe IgG são conhecidas como anticorpos de memória imunológica e podem persistir por meses ou anos na circulação sanguínea. Sabe-se, também, que o LCR deriva de uma produção em cavidades ventriculares do plexo coroide, principalmente a partir da filtração do sangue, que, em condições normais, apresenta-se com baixa concentração de constituintes. Todavia, situações de alteração de permeabilidade das barreiras encefálicas por comprometimento inflamatório ou infeccioso sistêmico de causa virológica, ou não virológica, podem fazer com que parte dos componentes, como a glicose, os eletrólitos e as proteínas, incluindo anticorpos IgG, passem para o sistema nervoso. Ainda falando sobre os anticorpos IgG, esses são responsáveis por grandes problemas envolvendo reatividade cruzada em testes sorológicos. A ocorrência de infecções sequenciais por diferentes flavivírus tem resultado em altos níveis de reatividade cruzada nos testes sorológicos atuais disponíveis, representando um grande impacto na vigilância de arboviroses e diagnóstico específico (Medeiros & Vasconcelos, 2019).

As meningites podem ser causadas não somente pelo processo infeccioso (bactérias, fungos e vírus) como, também, podem ter origem em processos inflamatórios, como câncer (metástases para meninges), lúpus eritematoso sistêmico, reação a determinadas drogas, traumatismo cranioencefálico e cirurgias

cerebrais (Hrishi & Sethuraman 2019; Piazzetta & Pereira, 2021). Neste trabalho, foi realizado o diagnóstico diferencial para bactérias e fungos, tomando-os como critérios de exclusão para recrutamento das amostras. Vale ressaltar que as metodologias (IH, ELISA e RT-qPCR) usadas sugerem exposição prévia a flavivírus, CHIKV e OROV, mas não excluem a possibilidade de infecções por vírus de DNA ou causa de origem inflamatória.

Os resultados negativos obtidos no RT-qPCR podem ser atribuídos à ausência de uma infecção atual ou à baixa viremia (Chalhoub et al., 2022). Sabe-se, também, que o tempo de coleta é crucial para a detecção do RNA viral, uma vez que vírus escapam do sítio de infecção no momento anterior ao aparecimento dos sintomas neurológicos (Guimarães et al., 2022). Mesmo incluindo os controles internos (RnaseP) e externos (MS2) como marcadores de integridade durante a etapa de extração de RNA, é admissível que o estresse térmico sofrido durante o transporte dos LCRs e a demora para o armazenamento da amostra a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, semelhante ao observado nas amostras de rotina diagnóstica vinda dos serviços de saúde regionais, possam ter influenciado a sensibilidade de detecção de RNA viral por RT-qPCR (Chalhoub et al., 2022; Griffin, 2022; Grygorczuk, 2022). A pesquisa de RNA em outros espécimes, podem aumentar a sensibilidade da técnica. Barzon et al. (2013) observaram que a carga viral de WNV pode ser mais alta ou persistir em mais tempo na urina que no sangue de pacientes com infecção aguda. Campos et al. (2016) relataram persistência de RNA de ZIKV na urina por até 14 dias, após o início dos sintomas. Em nosso estudo, as urinas não estavam disponíveis para análise.

Como descrito por Grygorczuk (2022), coortes formadas por pacientes em estado de imunossupressão, como HIV positivo, tratamento oncológico, diabetes *mellitus*, outros distúrbios hormonais, artrite reumatoide e insuficiência cardíaca, podem favorecer a detecção de RNA em fluidos corporais.

Inquéritos sorológicos em cavalos (Oliveira-Filho et al., 2021; Chalhoub et al., 2022; Guimarães et al., 2022), aves (Morel et al., 2021; Melandrini et al., 2012) e até em humanos (Chalhoub et al., 2021; Vieira et al., 2015;) trouxeram evidências da circulação de WNV nos estados do Mato Grosso (Bayeux et al., 2019; Pauvolid-Corrêa et al., 2013), Piauí (Costa et al., 2021), Ceará (Chalhoub et al., 2021),

Espírito-Santo (Siconelli et al., 2021; Martins et al., 2019), Bahia (Fritsh et al., 2022), São Paulo (Siqueira et al., 2022), Minas Gerais (Costa et al., 2021) e Rio Grande do Sul (Morel et al., 2021). Não se pode descartar que vestígios sorológicos de WNV em humanos sejam encontrados, também, no Pará. Em nosso estudo, a paciente de LCR H876332 apresentou IH para WNV (1:40) e para DENV (1:20), sugerindo que essa reação encontrada para WNV seja consequência de visita a essas áreas de circulação do vírus ou da ocorrência de reatividade cruzada em resposta a uma infecção anterior por DENV. Como descrito por Guimarães et al., 2022, o teste de IH é caracterizado por uma alta reatividade cruzada que, geralmente, permite apenas uma conclusão qualitativa sobre a presença de anticorpos contra o flavivírus.

O painel de alfavírus, flavivírus e ortobunyavírus (Rodrigues et al., 2010b; Casseb et al., 2015; Casseb et al., 2016; Guimarães et al., 2022) para detectar anticorpos totais no teste de IH faz parte da rotina diagnóstica da vigilância sorológica de arbovírus na SAARB/IEC/SVSA, e foi utilizado como método de triagem nesse trabalho. Embora a pesquisa de anticorpos totais para alfavírus e ortobunyavírus não estivesse entre os objetivos deste trabalho, sua detecção não deve passar despercebida.

Na infecção por CHIKV, o espectro clínico observado vai da fase aguda, passando pela subaguda, a crônica. Na fase crônica, mais comumente desenvolvida em pacientes a partir dos 45 anos, podem-se observar manifestações severas, que incluem alterações cerebelares (Brasil, 2017). Sabe-se, ainda, que a produção de anticorpos IgG contra CHIKV pode ser detectada desde a primeira semana de infecção e permanecer por vários anos no soro (Hakim & Aman, 2023). Mesmo diante do exposto, a detecção da reação monotípica positiva para anti-CHIKV no IH de H876317 não está associada à cronicidade de uma infecção recente por CHIKV, apenas de exposição anterior ao vírus, cuja coleta de LCR foi realizada 2 dias após sintomas de meningite.

A detecção de anticorpos anti-OROV no soro e no LCR do paciente H876290 incluindo o resultado indeterminado no ELISA IgM, neste trabalho, reforça a importância de realizar a vigilância epidemiológica desse vírus no Pará, incluindo, principalmente, a 1^o CRS, local de origem do paciente (Pinheiro et al., 1981; Vasconcelos et al., 2009; Cravo, 2021). A suspeita de endemicidade apontada por

Azevedo et al. (2002), de 2000 a 2001, e a ocorrência de casos esporádicos de OROV identificados entre 2016 e 2019, também pela SAARB/IEC/SVSA na RMB, e descritos por Cravo (2021), vêm revelar a possibilidade de que esse vírus esteja em circulação silenciosa nessa população. O quantitativo ainda discreto de casos de infecção por OROV é, em muito, devido à prioridade que é dada à investigação de arbovírus mais prevalentes, como DENV, ZIKV e CHIKV (Brasil, 2023). É importante destacar que, historicamente, casos de doença neuroinvasiva por ILHV (Millhim et al., 2020) e SLEV (Mondini et al., 2007) já foram encontrados durante epidemias de DENV.

Nem todas as amostras utilizadas nesse projeto tinham volume suficiente de trabalho para os três testes de triagem - RT-qPCR, ELISA IgM e IH, realizados na SAARB/IEC. Como citado na metodologia, o diagnóstico laboratorial de meningites, usado na rotina da ULAC/HUJBB, incluindo o confirmatório para bactérias e fungos (Figura 6), consome volumes consideráveis de LCR. Há ainda uma dificuldade inerente à coleta por punção lombar por fatores como perícia técnica, idade do paciente, posição de coleta e quadro clínico (grau de hidratação, consciência, agitação e pressão intracraniana) que podem trazer problemas (Piazetta & Pereira, 2021) e dificuldades para padronização da quantidade de material coletado. Especialmente, em punções terapêuticas de alívio, consegue-se um conteúdo mais elevado de LCR, de até 20 mL, como acompanhado nas criptococoses neurológicas (ULAC/HUJBB, comunicação interna). Esses fatores colaboraram, sobremaneira, para que se tivessem volumes ínfimos alcançados em parte das amostras de LCR.

Outro ponto de fragilidade encontrado diz respeito à coleta dos soros. Preferencialmente, durante o atendimento de paciente com suspeita de doença neuroinvasiva por arbovírus, a coleta do LCR deve ser acompanhada da coleta de soro. Na recomendação do Manual de Vigilância Sentinela de Doenças Neuroinvasivas por Arbovírus de 2017, é preferível que a primeira coleta de soro, seja feita na fase aguda (até 5 dias para RT-qPCR) e, a segunda coleta, repetida na fase convalescente da doença (Quadro 1).

Dificuldade na aquisição de reagentes, curto prazo para o recrutamento das amostras, demanda prioritária da vigilância e indisponibilidade de fomento para

custeio do apoio técnico especializado limitaram, também, o processamento de um maior quantitativo de amostras até a apresentação deste documento.

Embora não tenha sido o objetivo direto deste trabalho, fazer uma classificação clínico-laboratorial dos casos de doença neuroinvasiva a partir do LCR coletados, diferenciando uma doença sistêmica de uma doença neuroinvasiva causada por arbovírus, mostra-se uma tarefa complexa (Mentha et al., 2018). A classificação permeia uma análise sindrômica, onde, além dos sinais e sintomas apresentados, é fundamental haver coleta de dados epidemiológicos, radiológicos, hemograma e enzimas hepáticas, e que, além do LCR, o soro e a urina, possam ser coletados para detecção de anticorpos IgM e RNA viral (Brasil, 2017). O acompanhamento clínico dos sinais e sintomas desenvolvidos pelo paciente, e em qual momento eles aparecem, é fundamental para uma identificação adequada das doenças neuroinvasivas por flavivírus, seguindo os critérios de Brighton (Brasil, 20217).

A metodologia escolhida para seleção pode ter interferido na ausência de casos, bem como a falta de soros por LCR coletado, de soros pareados e, até, da falta acesso a um detalhamento clínico, além da classificação clínica genérica de meningites dado pelo serviço de saúde, fazem parte das limitações encontradas.

Como perspectivas futuras deste trabalho, a curto prazo pretende-se, finalizar a padronização do *duplex* e *quadriplex* de RT-qPCR para posterior publicação. Já a médio prazo, é importante que se amplie o quantitativo de LCR coletados, em busca casos de doença neuroinvasiva ativas ou recentes causadas por flavivírus, alfavírus e ortobunyavírus, tendo, como prioridade, o alinhamento do desenho do estudo, reduzindo das limitações apontadas no parágrafo anterior. Ademais, desenvolver um painel de flavivírus para RNVT⁹⁰, a fim de confirmar os casos não conclusivos pelo ELISA IgM, ainda pode ser considerada uma meta de planejamento de médio e longo prazo.

6. CONCLUSÃO

- O protocolo *duplex* de RT-qPCR para detecção dos vírus WNV e SLEV apresentou boa performance diagnóstica e pode se tornar uma ferramenta importante na vigilância desses vírus;

- Um novo protocolo *quadriplex* de RT-qPCR para detecção simultânea dos vírus ILHV, ROCV, TBEV e JEV foi desenhado, porém, sua aplicação no diagnóstico ainda precisa ser avaliada;

- O RVNT⁹⁰ apresentou sensibilidade, especificidade e desempenho superior ao PRNT⁹⁰ convencional;

- O RVNT⁹⁰ não foi eficiente em diferenciar as infecções por ZIKV e DENV, principalmente entre as infecções prévias e as recentes;

- A utilização de apenas dois vírus, DENV e ZIKV, na execução de RVNT⁹⁰ ainda é modesta, diante da quantidade de flavivírus circulantes no Brasil. Assim, um painel de vírus semelhante ao que foi usado para triagem de LCR no RT-qPCR, IH e ELISA poderá compor as metas futuras de trabalho;

- O teste ELISA IgM apresentou um bom desempenho, tanto quando comparado ao RVNT⁹⁰, quanto na conclusão de casos descartados de doença por flavivírus;

- Embora o aparelho GloMax® tenha conseguido captar luminescência produzida após transfecção de RNA viral de DENV e ZIKV Rluc, essa detecção não foi mantida durante os ensaios de estabilidade viral e de teste de neutralização;

- A tentativa inicial de padronização, sob condições semelhantes de incubação às empregadas no Cytation™ 5.0 BioTek, não foi suficiente para que o sistema GloMax® conseguisse integrar RVNT⁹⁰ com Renilla luciferase de DENV e ZIKV;

- Não foi possível detectar o genoma de flavivírus circulantes no Brasil em LCRs de pacientes suspeitos de doenças neuroinvasivas;

- Os anticorpos totais anti-flavivírus encontrados no teste de IH sugerem exposição a flavivírus e não infecção ativa, recente ou produção intratecal de

anticorpos IgM, não sendo encontrado nenhum caso confirmado de doença neuroinvasiva por flavivírus;

- A presença de anticorpos totais anti-OROV e do resultado indeterminado no ELISA IgM apoiam a importância de se reforçar a vigilância epidemiológica do OROV na região metropolitana de Belém e, de preferência, em todo o Pará;

- O perfil de LCR incolor, límpido, com pleocitose, do tipo mononuclear e proteína elevada foi o mais encontrado entre as amostras de pacientes com exposição prévia a flavivírus;

- Ampliar os esforços para o diagnóstico das doenças neuroinvasivas por flavivírus, embora árduo, deve-se manter permanente.

7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N.J.; PATABENDIGE, A.A.; DOLMAN, D.E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol. Dis.** **37**: 13–25, 2010.
- ALCANTARA, B.N.; IMBELONI, A.A.; DURANS, D.B.S.; DE ARAÚJO, M.T.F.; DA CRUZ, E.R.M.; CARVALHO, C.A. M.; MENDONÇA, M.H.R.; SOUSA, J.R.; MORAES, A.F.; MARTINS FILHO, A.J.; LIMA, M.L.G.; AMADOR NETO, O.P.; CHIANG, J.O.; SCALERCIO, S.R.R.A.; CARNEIRO, L.A.; QUARESMA, J.A.S.; VASCONCELOS, P.F.C; MEDEIROS, D.B.A. Histopathological lesions of congenital Zika syndrome in newborn squirrel monkeys. **Sci. Rep.** **11** (6099) 1-12, 2021.
- ALI, S.; GUGLIEMINI, O.; HARBER, S.; HARRISON, A.; HOULE, L.; IVORY, J.; KERSTEN, S.; KHAN, R.; KIM, J.; LEOA, C.; NEZ-WHITFIELD, E.; O'MARR, J.; ROTHENBERG, E.; SEGNITZ, R. M.; SILA, S.; VERWILLOW, A.; VOGT, M.; YANG, A.; MORDECAI, E. A. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **11**, 2017.
- ALLARD, S.T.M. & KOPIK, K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. **Cell Notes** **21**, 23-26, 2008.
- ALMEIDA, Jairo Cunha de. **Perfil clínico-epidemiológico da Criptococose em pacientes HIV positivos atendidos em uma unidade de referência em Belém do Pará.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém, 2012. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.
- AMORIM, J.F.S.; AZEVEDO, A.S.; COSTA, S.M.; TRINDADE, G.F.; BASÍLIO-DE-OLIVEIRA, C.A.; GONÇALVES, A.J.S.; SALOMÃO, N.G.; RABELO, K.; AMARAL, R.; GERALDO, L.H.M.; LIMA F.R.S.; MOHANA-BORGES, R.; PAES, M.V.; ALVES, A.M.B. Dengue infection in mice inoculated by the intracerebral route: neuropathological effects and identification of target cells for virus replication. **Sci. Rep.** **9**, 1-15, 2019.

- ARAÚJO, L.J.T.; GONZALEZ, L.L.; BUSS, L.F.; GUERRA, J.M.; GOMEZ, D.S.; FERREIRA, C.S.S.; CIRQUEIRA, C.S.; GHILLARDI, F.; WITKIN, S.S.; SABINO, E.C. Surveillance of hemorrhagic fever and/or neuroinvasive disease: challenges of diagnosis. **Rev. Saude Publica.** **55** (41): 1-10, 2021.
- ASHOUR, J.; LAURENT-ROLLE, M.; SHI, P.Y.; GARCIA-SASTRE, A. NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. **J.Virol.** **83** (11): 5408–18, 2009.
- AUBRY, F.; NOUGAIREDE A.; GOULD, E.A.; DE LAMBALLERIE, X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective. **Antiviral research** **114**, 67-85, 2015.
- AUSTRÁLIA. Australian Government. Department of Health and Aged Care. <https://www.health.gov.au/health-alerts/japanese-encephalitis-virus-jev/japanese-encephalitis-virus-jev>. Acesso em: 03/04/2023.
- ÁVILA-PÉREZ, G.; NOGALES, A.; MARTÍN, V.; ALMAZÁN, F.; MARTÍNEZ-SOBRIDO, L. Reverse genetic approaches for the generation of recombinant zika virus. **Viruses** **10**, (597): 1-22, 2018.
- AZEVEDO, R.S.S.; SOUZA, M.R.S.; RODRIGUES, S.G.; NUNES, M.R.T.; BUNA, B.S.; LEÃO, R.N.Q.; VASCONCELOS, P.F.C. Ocorrência endêmica de febre por Oropouche em Belém/PA no período de 2000 a 2001. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **35** (386): 2002.
- AZEVEDO, R.S.S.; NUNES, M.R.T.; CHIANG, J.O.; BENSABATH, G.; VASCONCELOS, H.B.; PINTO, A.Y.N.; MARTINS, L.C.; MONTEIRO, H.A.O.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Reemergence of Oropouche Fever, Northern Brazil. **Emerg. Infect. Disease.** **13**, 912-915, 2007.
- AZEVEDO, R.S.S.; DE SOUSA, J.R.; ARAUJO, M.T.; MARTINS FILHO, A.J.; ALCANTARA, B.N.; ARAUJO, F.M.C.; QUEIROZ, M.G.L.; CRUZ, A.C.R.; BALDEZ, B.H.V.; CHIANG, J.O.; MARTINS, L.C.; CASSEB, L.M.N.; SILVA, E.V.S.; CARVALHO, V.L.; VASCONCELOS, B.C.B.; RODRIGUES, S.G.; OLIVEIRA, C.S.; QUARESMA, J.A.S.; VASCONCELOS, P.F.C. In situ immune

response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. **Sci Rep.** **8** (1): 1–11, 2018.

AYRES, M.; AYRES BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Brasília, Sociedade Civil Mamirauá, CNPq, 2007.

BAKER, R.E.; MAHMUD, A.S.; MILLER, I.F.; RAJEEV, M.; RASAMBAINARIVO, F.; BENJAMIN L.R.; TAKAHASHI, S.; TATEM, A.J.; WAGNER, C.E.; WANG, L.F.; WESOLOWSKI, A.; METCALF, C.J.E. Infectious disease in an era of global change. **Nat. Rev. Microbiol.** **20** (4), 1–13, 2022.

BAKONYI, T.; IVANICS, E.; ERDÉLYI, K.; URSU, K.; FERENCZI, E.; WEISSENBOCK, H.; NOWOTNY, N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. **Emerg. Infect. Dis.** **12**: 618–623, 2006.

BARROS, S.C.; RAMOS, F.; ZÉ-ZÉ, L.; ALVES, M.J.; FAGULHA, T.; DUARTE, M.; HENRIQUES, M.; LUÍS, T.; FEVEREIRO, M. Simultaneous detection of West Nile and Japanese encephalitis virus RNA by duplex TaqMan RT-PCR. **J. Virol. Methods** **193** (2): 554–557, 2013.

BARZON, L.; PACENTI, M.; FRANCHIN, E.; PAGNI, S.; MARTELLO, T.; CATTAL, M.; CUSINATO, R.; PALU, G. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. **J. Infect. Dis.** **208**, 1086–1092, 2013.

BAYEUX, J.J.M.; SILVA, A.S.G.; DE QUEIROZ, G.A.; SANTOS, B.S.A.S.; ROCHA, M.N.; REHFELD, I.S.; FRANKLIN, L.F.S.; VALLE, L.B.; GUEDES, M.I.M.C.; TEIXEIRA, F.B.C.; COSTA, E.A. Epidemiological surveillance of West Nile virus in the world and Brazil: relevance of equine surveillance in the context of “One Health”. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** **56** (4): 2019.

BEASLEY, D. W.; LEWTHWAITE, P.; SOLOMON, T. Current use and development of vaccines for Japanese encephalitis. **Expert. Opin. Biol. Ther.** **8** (1): 95–106, 2008.

BENTES, A.; KROONB, E.G.; ROMANELIA, R.M.C. Neurological manifestations of pediatric arboviral infections in the Americas. **J Clin. Virol.** **116**, 49–57, 2019.

- BENTES, A.A. **Avaliação de fatores preditivos para complicações neurológicas à alta hospitalar e durante seguimento clínico em coorte de crianças e adolescentes com doença neuroinvasiva confirmada por flavivirus.** Tese de Doutorado. Belo Horizonte. 2020, 109p.
- BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance** **19** (13): 8–11, 2014.
- BOGA, J.A.; ALVAREZ-ARGUELLES, M.E.; ROJO-ALBA, S.; MERCEDES RODRÍGUEZ, M.O.; MELÓN, S. Simultaneous detection of Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, Yellow fever virus and West Nile virus. **J. Virol. Methods** **268**, 53–55, 2019.
- BORDIGNON, J.; STROTTMANN, D.M.; MOSIMANN, A.L.P.; PROBST, C.M.; STELLA, V.; NORONHA, L.; ZANATA, S.M.; DOS SANTOS, C.N.D. Dengue Neurovirulence in Mice: Identification of Molecular Signatures in the E and NS3 Helicase Domains. **Med. Virol.** **79**: 1506–1517, 2007.
- BOS, S.; POIRIER-BEAUDOUIN, B.; SEFFER, V.; MANICH, M.; MARDI, C.; DESPRÈS, P.; GADEA, G.; GOUGEON, M.G. Zika Virus Inhibits IFN- α Response by Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Induces NS1-Dependent Triggering of CD303 (BDCA-2) Signaling. **Front. Immunol.** **11**, 2020.
- BOWEN, J.R.; QUICKE, K.M.; MADDUR, M.S.; O'NEAL, J.T.; MCDONALD, C.E.; FEDOROVA, N.B.; PURI, V.; SHABMAN, R.S.; PULENDRAN, B.; SUTHAR, M.S. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses During Infection of Human Dendritic **Cells. PLoS Pathog.** **13** (2): 1-30, 2017.
- BHARUCHA, T.; SENGVILAIPASEUTH, O.; VONGSOUVATH, M.; VONGSOUVATH, M.; DAVONG, V.; PANYANOUVONG, P.; PIORKOWSKI, G.; GARSON, J.A.; NEWTON, P.N.; LAMBALLERIE, X.; DUBOT-PERÈS, A. Development of an improved RT-qPCR Assay for detection of Japanese encephalitis virus (JEV) RNA including a systematic review and comprehensive comparison with published methods. **PLoS ONE** **13** (3): 2018.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância sentinela de doenças neuroinvasivas por arbovírus / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 44 p.: il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019a. 740 p.: il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Outras Meningites. In: Guia de Vigilância em Saúde. Brasília, 2019b. cap. 1, p. 45-68.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Vigilância sentinela das doenças neuroinvasivas por arbovírus, Brasil, 2017 a 2019, v. 5, n.44, Abr. 2020.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 23, 2021. (52) 23: 2021.
- BRASIL, Informe diário. 03 de abril de 2023. Centro de Operações de Emergências em Saúde. Semana Epidemiológica 13. Sinan On-line (banco de dados atualizado em 02/04/2023); Sinan NET atualizado em 31/03/2023.
- BREEN, M.; NOGALES, A.; BAKER, S.F.; MARTÍNEZ-SOBRIDO, L. Replication-competent Influenza A viruses expressing reporter genes. **Viruses** **8**, 2-28, 2016.
- BROWN, P.D.; DAVIES, S.L.; SPEAKE, T.; MILLAR, I.D. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. **Neuroscience** **129**: 957–970, 2004.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: Minimum

information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry** **55** (4): 611–622, 2009.

CALVET, G.; AGUIAR, R.S.; MELO, A.S.O.; SAMPAIO, S.A.; FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E.S.M.; SEQUEIRA, P.C.; MENDONÇA, M.C.L.; OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D.A.; SCHRAGO, C.G.; THOMPSON, F.L.; BRASIL, P.; SANTOS, F.B.; NOGUEIRA, R.M.R.; TANURI, A.; FILIPPIS, A.M.B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect. Dis.** **3099** (16), 1–8, 2016.

CALVET, G.A.; KARA, E.O.; GIOZZA, S.P.; BÔTTO-MENEZES, C.H.A.; GAILLARD, P.; FRANCA, R.F.O.; LACERDA, M.V.G.; CASTILHO, M.C.; BRASIL, P.; SEQUEIRA, P.C.; MELLO, M.B.; BERMUDEZ, X.P.D.; MODJARRAD, K.; MEURANT, R.; LANDOULSI, S.; BENZAKEN, A.S.; FILIPPIS, A.M.B.; BROUTET, N.J.N. The ZIKABRA Study Team. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. **BMC Infectious Diseases** **18**, 2018.

CALVERT, A.E.; HORIUCHI, K.; BOROUGHS, K.L.; ONG, Y.T.; ANDERSON, K.M.; BIGGERSTAFF, B.J.; STONE, M.; SIMMONS, G.; BUSCH, M.P.; HUANG, C.Y.H. The Specificity of the Persistent IgM Neutralizing Antibody Response in Zika Virus Infections among Individuals with Prior Dengue Virus Exposure. **J. Clin. Microbiol.** **59**, 2021.

CÂMARA, F.P.; THEOPHILO, R.L.G.; SANTOS, G.T.; PEREIRA, S.R.F.G.; CÂMARA, D.C.P.; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.** **40** (2):192-196, 2007.

CAMPOS, R.M.; CIRNE-SANTOS, C.; MEIRA, G.L.S.; SANTOS, L.L.R.; DE MENESES, M.D. Prolonged detection of Zika virus RNA in urinesamples during the ongoing Zika virus epidemycin Brazil. **J. Clin. Virol.** **77**, 69–70, 2016.

CARBAUGH, D.L.; LAZEAR, H.M. Flavivirus envelope protein glycosylation: impacts on viral infection and pathogenesis. **J. Virol.** **94** (11): 2020.

- CARNEIRO, Rose Sheyla Rodrigues. **Fatores prognósticos de letalidade na meningoencefalite criptocócica em crianças e adolescentes no estado do Pará.** 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Belém, 2016. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.
- CASSEB, A.R.; SILVA, S.P.; CASSEB, L.M.N.; CHIANG, J.O.; MARTINS, L.C.; VASCONCELOS, P.F.C. Prevalência de anticorpos contra arbovírus da Família Bunyaviridae em búfalos de água. **Cien. Anim. Bras.** **16**: 428–36, 2015.
- CASSEB, A.R.; BRITO, T.C.; DA SILVA, M.R.R.; CHIANG, J.O.; MARTINS, L.C.; DA SILVA, S.P.; HENRIQUES, D.F.; CASSEB, L.M.N.; VASCONCELOS, P.F.C. Prevalence of antibodies to equine alphaviruses in the State of Pará. **Arq. Inst. Biol.** **83**, 1-5, 2016.
- CASTANHA, P.M.S.; CORDEIRO, M.T.; MARTELLI, C.M.T.; SOUZA, W.V.; MARQUES JR, A.; BRAGA, C. Force of infection of Dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiol. Inf.** **141** (5): 1080-1088, 2013.
- CASTRO DIAS, M.; MAPUNDA, J.A.; VLADYMYROV, M.; ENGELHARDT, B. Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. **Int. J. Mol. Sci.** **20** (5372): 1-27, 2019.
- CERVANTES, D.T.; CHEN, S.; SUTOR, L.J.; STONECIPHER, S.; JANOSKI, N.; WRIGHT, D.J.; BUSCH, M.P. West Nile virus infection incidence based on donated blood samples and neuroinvasive disease reports, Northern Texas, USA, 2012. **Emerg. Infect. Dis.** **21**, 681–683, 2015.
- CDC. Intrauterine West Nile virus infection—New York. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.** **51**, 1135–1136, 2002.
- CHAKRABORTY, S. Computational analysis of perturbations in the postfusion dengue virus envelope protein highlights known epitopes and conserved residues in the zika virus. **F1000 Research** **5**, (1150): 2016.

- CHALA, B.; HAMDE, F. Emerging and Re-emerging Vector-Borne Infectious Diseases and the Challenges for Control: A Review. **Front. Public Health** **9** (715759): 1-10, 2021.
- CHALHOUB, F.L.L.; QUEIROZ-JÚNIOR, E.M.; DUARTE, B.H.; PINHEIRO DE SÁ, M.E.; LIMA, P.C.; DE OLIVEIRA, A.C.; CASSEB, L.M.C.; DAS CHAGAS, L.L.; MONTEIRO, H.A.O.; NEVES, M.S.A.S.; CHAVES, C.F.; MOURA, P.J.S.; DO NASCIMENTO, A.M.R.; ET AL. West Nile Virus in the State of Ceará, Northeast Brazil. **Microorganisms** **9** (8):1699, 2021.
- CHALHOUB, F.L.L.; HORTA, M.A.P.; ALCANTARA, L.C.J.; MORALES, A.; DOS SANTOS, L.M.B.; GUERRA-CAMPOS, V.; RODRIGUES, C.D.S.; SANTOS, C.C.; MARES-GUIA, M.A.M.; PAUVOLID-CORRÊA, A.; ET AL. Serological Evidence of Exposure to Saint Louis Encephalitis and West Nile Viruses in Horses of Rio de Janeiro, Brazil. **Viruses** **14**, 2459, 2022.
- CHAN, K.R.; ISMAIL, A.A.; THERGARAJAN, G.; RAJU, C.S.; YAM, H.C.; RISHYA, M.; SEKARAN, S.D. Serological cross-reactivity among common flaviviruses. **Front Cell Infect Microbiol.** **12** (975398): 2022.
- CHAO, L.; RANG, C.U.; WONG, L.E. Distribution of spontaneous mutants and inferences about the replication mode of RNA bacteriophage $\phi 6$. **J. Virol.** **76**, (7): 3276-3281, 2002.
- CHAO, D.Y.; DAVIS, B.S.; CHANG, G.J.J. Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. **J. Clin. Microbiol.** **45** (2): 584–589, 2007.
- CHANG, H., HUBER, R. G., BOND, P. J., GRAD, Y. H., CAMERINI, D., MAURER-STROH, S.; LIPSITCH, M. Systematic analysis of protein identity between zika virus and other arthropod-borne viruses. **Bull. World Health Organ.** **95** (7), 517–525, 2017.
- CHEN, Y.; MAGUIRE, T.; HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; ESKO, J. D.; LINHARDT, R. J.; MARKSET, R.M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.** **3**, 866–871, 1997.

- CHEN, H.; LIU, H.; PENG, X. Reverse genetics in virology: A double edged sword. **Biosafety and Health** **4**, 303–313, 2022.
- CLARKE, D.H.; CASALS, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses. **Am J Trop Med Hyg.** **7**: 561-573, 1958.
- CLARKE, P.; LESER, J.S.; TYLERA, K.L. Intrinsic Innate Immune Responses Control Viral Growth and Protect against Neuronal Death in an Ex Vivo Model of West Nile Virus-Induced Central Nervous System Disease. **J. Virol.** **95** (18): 2021.
- CLÉ, M.; DESMETZ, C.; BARTHELEMY, J.; MARTIN, M.F.; CONSTANT, O.; MAARIFI, G.; FOULONGNE, V.; BOLLORÉ, K.; GLASSON, Y.; DE BOCK, F.; BLAQUIERE, M.; DEHOUCK, L.; PIROT, N.; TUAILLON, E.; NISOLE, S.; NAJIOULLAH, F.; VAN DE PERRE, P.; CABIÉ, A.; MARCHI, N.; GOSSELET, F.; SIMONIN, Y.; SALINAS, S. Zika Virus Infection Promotes Local Inflammation, Cell Adhesion Molecule Upregulation, and Leukocyte Recruitment at the Blood-Brain Barrier. **mBio.** **4** (1): 1-25, 2020a.
- CLÉ, M.; ELDIN, P.; BRIANT, L.; LANNUZEL, A.; SIMONIN, Y.; PERRE, P.V.; CABIÉ, A.; SALINAS, S. Neurocognitive impacts of arbovirus infections. **J. Neuroinflamm.** **17** (233): 1-14, 2020b.
- COHEN, J. F.; KOREVAAR, D.A.; ALTMAN, D.G.; BRUNS, D.E.; GATSONIS, C.A.; HOOFT, L.; IRWIG, L.; LEVINE, D.; REITSMA, J.B.; DE VET, H.C.W.; BOSSUYT, P.M.M. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: Explanation and elaboration. **BMJ Open** **6** (11): 1–17, 2016.
- COLPITTS, T.M.; CONWAY, M.J.; MONTGOMERY, R.R.; FIKRIG, E. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. **Clin. Microbiol. Rev.** **25** (635): 2012.
- CORDEIRO, M.T.; BRITO, C.A.A.; PENA, L.J.; CASTANHA, P.M.S.; GIL, L.H.V.G.; LOPES, K.G.S.; DHALIA, R.; MENESES, J.A.; ISHIGAMI, A.C.; MELLO, L.M.; ALENCAR, L.X.E.; GUARINES, K.M.; RODRIGUES, L.C.; MARQUES, E.T.A. Results of a Zika Virus (ZIKV) Immunoglobulin M-Specific Diagnostic Assay Are Highly Correlated With Detection of Neutralizing Anti-ZIKV Antibodies in Neonates With Congenital Disease. **J. Infect. Dis.** **214** (12): 1897-1904, 2016.

- COSTA, G.B.; MARINHO, P.E.S.; VILELA, A.P.P.; SARAIVA-SILVA, A.T.; CRISPIM, A.P.C.; BORGES, I.A.; DUTRA, A.G.S.; LOBATO, Z.I.P.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, D.B.; DRUMOND, B.P.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.S. Silent Circulation of the Saint Louis Encephalitis Virus among Humans and Equids, Southeast Brazil. **Viruses** **11** (1029): 2019.
- COSTA, E. A.; GIOVANETTI, M.; CATENACCI, L. S.; FONSECA, V.; ABURJAILE, F.F.; CHALHOUB, F.L.L.; XAVIER, J.; IANI, F.C.M.; VIEIRA, M.A.C.S.; HENRIQUES, D.F.; MEDEIROS, D.B.A.; GUEDES, M.I.M.C.; SANTOS, B.S.A.S.; SILVA, A.S.G.; MARANHÃO, R.P.A.; FARIA, N.R.C.; SIQUEIRA, R.F.; OLIVEIRA, T.; CAVALCANTE, K.R.L.J.; MOURA, N.F.O.; ROMANO, A.P.M.; ALBUQUERQUE, C.F.C.; FEITOSA, L.C.S.; BAYEUX, J.J.M.; TEIXEIRA, R.B.C.; LOBATO, O.L.; SILVA, S.C.; FILIPPIS, A.M.B.; CUNHA, R.V.; LOURENÇO, J.; ALCANTARA, L.C.J. West Nile Virus in Brazil. **Pathogens** **10** (896): 1-14, 2021.
- CONSTANT, O.; MAARIFI, G.; BARTHELEMYA, J.; MARTINB, M.F.; TINTOA, B.; SAVINIC, G.; VAN DE PERREA, P.; NISOLE, S.; SIMONIN, Y.; SALINAS, S. Differential effects of Usutu and West Nile viruses on neuroinflammation, immune cell recruitment and blood–brain barrier integrity. **Emer. Microb. Infect.** **12**, 2023.
- CORDERO-RIVERA, C.D.; JESÚS-GONZÁLEZ, L.A.; OSUNA-RAMOS, J.F.; PALACIOS-RÁPALO S.N.; FARFAN-MORALES, C.N.; REYES-RUIZ, J.M.; ÁNGEL, R.M. The importance of viral and cellular factors on flavivirus entry. **Curr. Opin.Virol.** **49**:164–175, 2021.
- CRAVO, L.C.C. **A febre do Oropouche: o olhar retrospectivo de uma década.** / Layna de Cássia Campos Cravo. – Ananindeua, 2021. 47 f.: il.; 30 cm Dissertação (Mestrado em Epidemiologia e Vigilância em Saúde) – Instituto Evandro Chagas, Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia e Vigilância em Saúde, 2021.
- CRUZ, A.C.R.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; FERREIRA, I.I.; ALBUQUERQUE, M. M.; GALLER, R. Ilheus virus (Flaviviridae, Flavivirus) is closely related to japanese encephalitis virus complex. **Intervirology** **40**: 220-225, 1997.
- CULSHAW, A.; LADELL, K.; GRAS, S.; MCLAREN, J.E.; MINERS, K.L.; FARENC, C.; VAN DEN HEUVEL, H.; GOSTICK, E.; DEJNIRATTISAI, W.;

- WANGTEERAPRASERT, A.; DUANGCHINDA, T.; CHOTIYARNWONG, P.; LIMPITIKUL, W.; VASANAWATHANA, S.; MALASIT, P.; DONG, T.; ROSSJOHN, J.; MONGKOLSAPAYA, J.; PRICE, D.A.; SCREATON, G.R. Germline bias dictates cross-serotype reactivity in a common dengue-virus-specific CD8+ T cell response. **Nat Immunol.** **18**, 1228–1237, 2017.
- CUTLER, R.W.P.; WATTERS, G.V.; HAMMERSTAD, J.P. The origin and turnover of cerebrospinal fluid albumin and gamma globulin in man. **J. Neurol. Sci.** **10**: 259–268, 1970.
- DA SILVA PESSOA VIEIRA, C.J.; DE ANDRADE, C.D.; KUBISZESKI, J.R.; FERREIRA DA SILVA, D.J.; BARRETO, E.S.; MASSEY, A.L.; CANALE, G.R.; SÃO BERNARDO, C.S.; LEVI, T.; PERES, C.A.; DE MORAIS BRONZONI, R.V. Detection of Ilheus virus in mosquitoes from southeast Amazon, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **113** (7): 424–427, 2019.
- DAIDOJI, T.; VARGAS, R.E.M.; HAGIWARA, K.; ARAI, Y.; WATANABE, Y.; NISHIOKA, K.; MURAKOSHI, F.; GARAN, K.; SADAKANE, H.; NAKAYA, T. Development of genus-specific universal primers for the detection of flaviviruses. **Virolog. J.** **18** (187): 2021.
- DALRYMPLE, N.A.; CIMICA, V.; MACKOW, E.R. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. **mBio** **6** (3): 1-12, 2015.
- DANFORTH, M.E.; SNYDER, R.E.; FEISZLI, T.; BULLICK, T.; MESSENGER, S.; HANSON, C.; PADGETT, K.; COFFEY, L.L.; BARKER, C.M.; REISEN, W.K.; KRAMER, V.L. Epidemiologic and environmental characterization of the Re-emergence of St. Louis Encephalitis Virus in California, 2015–2020. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **8** (16): 2022.
- DAVSON, H.; HOLLINGSWORTH, G.; SEGAL, M.B. The mechanism of drainage of the cerebrospinal fluid. **Brain** **93** (4): 665–678, 1970.
- DAVSON, H., WELCH, K., SEGAL, M. B. The Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid. Churchill Livingstone, New York, NY, 1987.

- DAVSON, H., SEGAL, M.B. Physiology of the CSF and Blood–Brain Barriers. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996.
- DENG, C.L.; LIU, S.Q.; ZHOU, D.G.; XU, L.L.; LI, X.D.; ZHANG, P.T.; LI, P.H.; YE, H.Q.; WEI, H.P.; YUAN, Z.M.; QIN, C.F.; ZHANG, B. Development of neutralization assay using an eGFP Chikungunya Virus. **Viruses** **8** (7): 1-16, 2016.
- DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; ROUVINSKI, A.; BARBASPETH, G.; DUANGCHINDA, T.; SAKUNTABHAI, A.; CAOLORMEAU, V.M.; MALASIT, P.; REY, F.A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G.R. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. **Nat Immunol.** **17** (9): 1102-1108, 2016.
- DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **46**, 509–520, 1952.
- DONADIEU, E.; LOWENSKI, S.; SERVELY, J.L.; LALOY, E.; LILIN, T.; NOWOTNY, N.; RICHARDSON, J.; ZIENTARA, S.; LECOLLINET, S.; COULPIER, M. Comparison of the Neuropathology Induced by Two West Nile Virus Strains. **PLOS ONE** **8** (12): 2013.
- DOSSOU, N.; GAUBERT, I.; MORICEAU, C.; CORNET, E.; LE HELLO, S.; MALANDAIN, D. Evaluation of Flow Cytometry for Cell Count and Detection of Bacteria in Biological Fluids. **Microbiol. Spectr.** **10** (1): 1-12, 2022.
- DUANGCHINDA, T.; DEJNIRATTISAI, W.; VASANAWATHANA, S.; LIMPITIKULD, W.; TANGTHAWORNCHAIKULB, N.; MALASIT, P.; MONGKOLSAPAYAA, J.; SCREATON, G. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **PNAS** **107**, 16922–16927, 2010.
- EBNET, K.; AURRAND-LIONS, M.; KUHN, A.; KIEFER, F.; BUTZ, S.; ZANDER, K.; MEYER ZU BRICKWEDDE, M.K.; SUZUKI, A.; IMHOF, B.A.; VESTWEBER, D. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: A possible role for JAMs in endothelial cell polarity. **Journal of Cell Science** **116**: 3879–3891, 2003.

- ECHAVARRIA-CONSUEGRA, L.; SMIT, J. M.; REGGIORI, F. Role of autophagy during the replication and pathogenesis of common mosquito-borne flaviviruses and alphaviruses. **Open Biol.** **9**, 1-20, 2019.
- ELIZALDE, M.; CANO-GÓMEZ, C.; LIORENTE, F.; PÉREZ-RAMÍREZ, E.; CASADES-MARTÍ, L.; AGUILERA-SEPÚLVEDA, P.; RUIZ-FONS, F.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M.Á.; FERNÁNDEZ-PINERO, J. A Duplex Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Detection and Differentiation of Flaviviruses of the Japanese Encephalitis and Ntaya Serocomplexes in Birds. **Front. Vet. Sci.** **7** (203): 2020.
- ENFISSI, A.; CODRINGTON, J.; ROOSBLAD, J.; KAZANJI, M.; ROUSSET, D. Zika virus genome from the Americas. **Lancet** **387**, (10015): 227–8, 2016.
- EVANGELISTA, G.A.O.; CARVALHO, R.H.; MENEZES, G.S.A; ABREU, Y.C.; SARDI, S.I.; CAMPOS, G.S. Meningoencephalitis associated with Zika virus and a Chikungunya virus infection. **J. infect. Dis.** **74** (6): 584-586, 2021.
- FALL, G.; FAYE, M.; WEIDMANN, M.; KAISER, M.; DUPRESSOIR, A.; NDIAYE, E.H.; BA, Y.; DIALLO, M.; FAYE, O.; SALL, A.A. Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Genotyping of West Nile Virus Lineages Circulating in Africa. **Vector-Borne Zoonotic Dis.** **16**, (12): 781–789, 2016.
- FALL, G.; DIALLO, D.; SOUMAILA, H.; NDIAYE, E.H.; LAGARE, A.; SADIO, B.D.; NDIONE, M.H.D.; WILEY, M.; DIA, M.; DIOP, M.; BA, A.; SIDIKOU, F.; NGOY, B.B.; FAYE, O.; TESTA, J.; LOUCOUBAR, C.; SALL, A.A.; DIALLO, M.; FAYE, O. First Detection of the West Nile Virus Koutango Lineage in Sandflies in Niger. **Sci Rep** **8** (1): 1, 2021.
- FELGENHAUER, K. The filtration concept of the blood-CSF barrier as basis for the differentiation of CSF proteins. In: Greenwood J, Begley DJ, Segal MB (eds) New concepts of a blood-brain barrier. Plenum Press, New York, pp 209–217, 1995.
- FERLIN, J.; FARHAT, R.; BELOUZARD, S.; COCQUEREL, L.; BERTIN, A.; HOBBER, D.; DUBUISSON J.; ROUILLÉ, Y. Investigation of the role of GBF1 in the replication of positive sense single-stranded RNA viruses. **J. Gen. Virol.** **99**: 1086–1096, 2018.

- FERNANDEZ, E. & DIAMOND, M.S. Vaccination strategies against Zika virus. **Curr. Opin. Virol.** **23**: 59–67, 2017.
- FERREIRA-DE-LIMA, V.H. & LIMA-CAMARA, T.N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors** **11** (1): 77, 2018.
- FIBRIANSAH, G.; TAN, J.L.; SMITH, S.A.; DE ALWIS, R.; NG, T.S.; KOSTYUCHENKO, V.A.; JADI, R.S.; KUKKARO, P.; DE SILVA, A.M.; CROWE, J.E.; LOK, S.M. A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. **Nat Commun.** **6**, 6341, 2015.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil during 1999–2009: A review. **Dengue Bulletin** **34**, 2010.
- FIGUEIREDO, M.L.G. & FIGUEIREDO, L.T.M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Adv. Microbiol.** **4**: 955-961, 2014.
- FISHBURN, A.T.; PHAM, O.H.; KENASTON, M.W.; BEESABATHUNI, N.S.; SHAH, P.S. Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein–Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. **Front. Microbiol.** **13**: 1-21, 2022.
- FREEDMAN, M.S.; THOMPSON, E.J.; DEISENHAMMER, F.; GIOVANNONI, G.; GRIMSLEY, G.; KEIR, G.; OHMAN, S.; RACKE, M.K.; SHARIEF, M.; SINDIC, C.J.M.; SELLEBJERG, F.; TOURTELLOTTE, W.W. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus statement. **Arch Neurol** **62** (2):865–870, 2005.
- FONSECA, G.C.; ROSSI, T.C. Líquido Cefalorraquidiano – O Que O Anestesista Deve Saber. *Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina – Número 7.* Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT (Cáceres). 2017, 65-73p.
- FOSS, L.; FEISZLI, T.; KRAMER, V.L.; REISEN, W.K.; PADGETT, K. Epidemic versus endemic West Nile virus dead bird surveillance in California: Changes in sensitivity and focus. **PLoS ONE** **18** (4): 2023.

- FOY, B.D.; KOBYLINSKI, K.C.; FOY, J.L.C.; BLITVICH, B.J.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; HADDOW, A.D.; LANCIOTTI, R.S.; TESH, R.B. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg. Infect. Dis.** **5**: 880-822, 2011.
- FRANCO, M. C. A.; SANJAD, M.R.; PINTO, P.H.O. Prevalência De Meningite Em Crianças No Hospital Universitário João De Barros Barreto, Período De 1995 A 2004. **Rev.Paraense Med.** **20** (1): 2006.
- FRITSCH, H.; PEREIRA, F.M.; COSTA, E.A.; FONSECA, V.; TOSTA, S.; XAVIER, J.; LEVY, F.; OLIVEIRA, C.D.; MENEZES, G.; LIMA, J. et al. Retrospective Investigation in Horses with Encephalitis Reveals Unnoticed Circulation of West Nile Virus in Brazil. **Viruses** **14**, 1540, 2022.
- GARCÍA-SASTRE, A. Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. **Cell Host Microbe** **22**, 176–184, 2017.
- GAGLIARDI, D. & DZIEMBOWSKI, A. 5' and 3' modifications controlling RNA degradation: from safeguards to executioners. **Phil. Trans. R. Soc. B.** **373** (6): 1–5, 2018.
- GERMI, R.; CRANCE, J.M.; GARIN, D.; GUIMET, J.; LORTAT-JACOB, H.; RUIGROK, R.W.H., ZARSKIE, J.P.; DROUETA, E. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology** **292**, 162–168, 2002.
- GO, Y.Y.; BALASURIYA, U.B.R.; LEE, C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clin. Exp. Vaccine Res.** **3**: 58-77, 2014.
- GOMES DA SILVA, P.; SEIXAS DOS REIS, J.A.; NOGUEIRA RODRIGUES, M.; DA SILVA ARDAYA, Q.; MESQUITA, J.R. Serological Cross-Reactivity in Zoonotic Flaviviral Infections of Medical Importance. **Antibodies** **12**, 18: 2023.
- GOONAWARDANE, N.; UPSTONE, L.; HARRIS, M.; JONES I.M. Identification of Host Factors Differentially Induced by Clinically Diverse Strains of Tick-Borne Encephalitis **Virus. J. Virol.** **96** (18): 1-16, 2022.

- GRIFFIN, D.E. Why does viral RNA sometimes persist after recovery from acute infections? **PLoS Biol** **20** (6): 2022.
- GRYGORCZUK, S.; DUNAJ-MAŁYSZKO, J.; CZUPRYNA, P.; SULIK, A.; TOCZYŁOWSKI, K.; SIEMIENIAKO-WERSZKO, A.; Z'EBROWSKA, A.; PANCEWICZ, S.; MONIUSZKO-MALINOWSKA, A. The Detectability of the Viral RNA in Blood and Cerebrospinal Fluid of Patients with Tick-Borne Encephalitis. **Int. J. Mol. Sci.** **23**, 9332, 2022.
- GUBLER, D.J.; KUNO, G.; SATHER, G. E.; VELEZ, M.; OLIVER, A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **33** (1): 158-165, 1984.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin. Microbiol. Ver.** **11** (3): 480-96, 1997.
- GUBLER, D.J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **951** (1):13-24, 2001.
- GUBLER, D.J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., editors. Fields virology. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2007. p.1153- 253.
- GUIMARÃES, M.C.N.; FREITAS, M.N.O.; SOUSA, A.W.; CUNHA, M.A.C.R.; ALMADA, G.L.; ROMANO, A.P.M.; SANTOS, M.G.D.P.; RODRIGUES, G.A.P.; MARTINS, L.C.; CHIANG, J.O.; CASSEB, L.M.N. Serological Evidence of Arboviruses in Horses During West Nile Fever Monitoring Surveillance in Southeastern Brazil. **Front. Trop. Dis.** **3**: 881710, 2022.
- GUZMAN, M.G.; HALSTEAD, S.B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D.J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H.S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M.B.; PELEGRINO, J.L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R.W. Dengue: A continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.** **8**, 1-26, 2010.

- HADDOW, A.D.; SCHUH, A.J.; YASUDA, C.Y.; KASPER, M.R.; HEANG, V.; HUY, R.; GUZMAN, H.; TESH, R.B; WEAVER, S.C. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neg. Trop. Dis.** **6** (2) 2012.
- HABARUGIRA, G.; SUEN, W.W.; HOBSON-PETERS, J.; HALL, R.A.; BIELEFELDT-OHMANN, H. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and “One Health” Implications. **Pathogens** **589** (9): 1-51, 2020.
- HAKIM, M.S.; AMAN, A.T. Understanding the Biology and Immune Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection for Diagnostic and Vaccine Development. **Viruses** **15**, (48): 2023.
- HARAPAN, M.A.; TEDJO, S.R.; IMRIE, A. Dengue: A Minireview. **Viruses** **12** (8): 829, 2020.
- HASAN, S.S.; SEVVANA, M.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. (Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nat. Struct. Mol. Biol.** **25** (1): 13–20, 2018.
- HASAN, M.R.; SUNDARARAJU, S.; TANG, P.; TSUI, K.M.; LOPEZ, A.P.; JANAHI, M.; TAN, R.; TILLEY, P. A metagenomics-based diagnostic approach for central nervous system infections in hospital acute care setting. **Sci. Rep.** **10**, 11194, 2020.
- HEINZ, F.X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **81**, 2017.
- HENRY, C.; PALM, A.K.E.; KRAMMER, F.; WILSON, P.C. From Original Antigenic Sin to the Universal Influenza Virus Vaccine. **Trends Immunol.** **39**, 70–79, 2018.
- HENRIQUES, D.F. **Infecção Persistente dos Flavivírus Ilhéus e Rocio em Hamsters dourados jovens (Mesocricetus auratus)**. Mestrado em Doenças Tropicais. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. 2009, 99F.
- HENRIQUES, D.F.; QUARESMA, J.A.S.; FUZII, H.T.; SILVA, E.V.P.; AARÃO, T.L.S; AZEVEDO, R.S.S.; CASSEB, S.M.M.; VASCONCELOS, P.F.C. Infecção

persistente pelo vírus Ilheus em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). Ver. **Pan-Amaz. Saude** 7: 189-198, 2016.

HENRIQUES, D.F.; NUNES, J.A.L.; ANJOS, M.V.; MELO, J.M.; ROSARIO, W.O.; AZEVEDO, R.S.S.; CHIANG, J.O.; MARTINS, L.C.; DOS SANTOS, F.B.; CASSEB, L.M.N.; VASCONCELOS, P.F.C; RODRIGUES, S.G. Evaluation of immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assays and commercial tests for flaviviruses diagnosis by a National Reference Laboratory. **J. Virol. Meth.** 286, 2020.

HERVÉ, J.P.; DÉGALLIER, N., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P.; SÁ FILHO, G. C. Aspectos Ecológicos. In: Instituto Evandro Chagas, coordenador. 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical. Belém: IEC 1, 409-437, 1986.

HOFMAN, F.M.; CHEN, T.C. Choroid Plexus: Structure and Function. In: The Choroid Plexus and Cerebrospinal Fluid; Neman, J., Chen, T.C., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 29–40.

HOLMES, E.C. & TWIDDY, S.S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. Infection, genetics and evolution. **Infect. Genet. Evo.** 3, (1): 19-28, 2003.

HOLCOMB, K.M.; MATHIS, S.; STAPLES, J.E.; FISCHER, M.; BARKER, C.M.;3 BEARD, C.B.; NETT, R.J.; KEYEL, A.C.; MARCANTONIO, M.; CHILDS, M.L.; GORRIS, M.E.; ROCHLIN, I.; HAMINS-PUÉRTOLAS, M.; RAY, E.L.; UELMEN, J.A.; DEFELICE, N.; FREEDMAN, A.C.; HOLLINGSWORTH, B.D.; DAS, P.; OSTHUS, D.; HUMPHREYS, J.M.; NOVA, N.; MORDECAI, E.A.; COHNSTAEDT, L.W.; KIRK, D.; KRAMER, L.D.; HARRIS, M.J.; KAIN, M.P.; REED, E.M.X.; JOHANSSON, M.A. Evaluation of an open forecasting challenge to assess skill of West Nile virus neuroinvasive disease prediction. *Parasit. Vectors* 16 (11): 2023.

HOWLEY, PETER, M.; DAVID M. KNIPE. Fields Virology: Emerging Viruses. In: Fields Virology: Emerging Viruses. 7th. ed. [s.l.] Wolters Kluwer Health, 2020. p. 346.

- HRISHI, A.P.; SETHURAMAN, M. Cerebrospinal Fluid (CSF) Analysis and Interpretation in Neurocritical Care for Acute Neurological Conditions. *Indian J Crit Care Med.* 23, 2019.
- HTUN, T.P.; XIONGB, Z.; PANG, J. Clinical signs and symptoms associated with WHO severe dengue classification: a systematic review and meta-analysis. ***Emerg. Microb. Infect.* 10**, 1-13, 2021.
- HULL, R.; NATTANMAIA, S.; KRAMERA, L.D.; BERNARDA, K.D.; TAVAKOLI, N.P. A duplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of St. Louis encephalitis and eastern equine encephalitis viruses. ***Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62**, 272–279, 2008.
- JOHANSON, C.E.; STOPA, E.G.; MCMILLAN, P.N. The Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier: Structure and Functional Significance. Chapter 4. Sukriti Nag (ed.), *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols, Methods in Mol. Biol.* 686, 101-131, 2011.
- JOHNSON, B.W.; GOODMAN, C.H.; JEE, Y.; FEATHERSTONE, D.A. Differential Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infections with the Inbios JE Detect TM and DEN Detect TM MAC-ELISA Kits. ***Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94**, 820–828, 2016.
- JOHANSSON, P.A.; DZIEGIELEWSKA, K.M.; EK, C.J.; HABGOOD, M.D.; MØLLGÅRD, K.; POTTER, A.; SCHULIGA M.; SAUNDERS, N.R. Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. ***Cell Tissue. Res.* 322**: 353–364, 2005.
- KADRY, H.; NOORANI, B.; CUCULLO, L. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. ***BMC* 17** (69): 1-24, 2020.
- KANJILAL, S.; CHO, T.A.; PIANTADOSI, A. Diagnostic testing in central nervous system infection. *Semin. Neurol.* 39 (3): 297–311, 2019.
- KAPOOR, H.; SIGNS, K.; SOMSELA, P.; DOWNESE, F.P.; CLARKA, P.A.; MASSEYA, J.P. Persistence of West Nile Virus (WNV) IgM antibodies in

- cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. **J. Clin. Virol.** **31**, 289–291, 2004.
- KARABATSOS, N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 3rd ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.
- KASSAR, T.C.; MAGALHAES, T.; SILVA JUNIOR, J.V.J.; CARVALHO, A.G.O.; SILVA, ANDREA N.M.R.; ALMEIDA-QUEIROZ, S.R.; BERTANI, G.R.; GIL, L. H.V.G. Construction and characterization of a recombinant yellow fever virus stably expressing Gaussia luciferase. **An. Acad. Bras. Ciênc.** **89** (3): 2119-2130, 2017.
- KNYAZHANSKAYA, E.; MORAIS, M.C.; CHOI, K.H. **Enzymes** **49**, 265–303, 2021.
- KIM, J.; ALEJANDRO, B.; HETMAN, M.; HATTAB, E.M.; JOINER, J.; SCHROTEN, H.; ISHIKAWA, H.; CHUNG, D.H. Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier. **PLoS Pathogens.** **16** (5):1-27, 2020.
- KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D.J. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am J Trop Med Hyg.** **36** (1):153-9, 1987.
- KUNO, G.; CHANG, G.J.; TSUCHIYA, K.R.; KARABATSOS, N.; CROPP, C.B. Phylogeny of the genus Flavivirus. **J. virol.** **72** (1): 73–83, 1998.
- LACEN-GO. Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros. Manual para o diagnóstico laboratorial das arboviroses do Estado de Goiás. 1ª versão., 2017, 58p.
- LANCIOTTI, R.S.; CALISHER, C.H.; GUBLER, D.J.; CHANG, G.J.; VORNDAM, A.V. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction. **J Clin. Microbiol.** **30** (3): 545-551, 1992.
- LANCIOTTI, R.S.; KERST, A.J.; NASCI, R.S.; GODSEY, M.S.; MITCHELL, C.J.; SAVAGE, H.M.; KOMAR, N.; PANELLA, N.A.; ALLEN, B.C.; VOLPE, K.E.; DAVIS, B.S; ROEHRIG, J.T. Rapid detection of West Nile virus from human clinical

- specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.** **38** (11): 4066–4071, 2000.
- LANCIOTTI, R. S.; KERST, A. J. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. **J. Clin. Microbiol.** **39** (12): 4506–4513, 2001.
- LANCIOTTI, R.S.; KOSOY, O.L.; LAVEN, J.J.; VELEZ, J.O.; LAMBERT, A.J.; JOHNSON, A.J.; STANFIELD, S.M.; DUFFY, M.R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.** **14**: 1232–1239, 2008.
- LANGE, E.C.M.; UDENAES, M.H. Understanding the Blood-Brain Barrier and Beyond: Challenges and Opportunities for Novel CNS Therapeutics. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 1-16, 2022.
- LEE, K. M.; CHIU, K. B.; SANSING, H. A.; DIDIER, P. J.; LACKNER, A. A.; MACLEAN, A.G. **J Neurovirol** **22** (6): 831–839, 2016.
- LI, Y., LI, L.F., YU, S., WANG, X.; ZHANG, L.; YU, J.; XIE, L.; LI, W.; ALI, R.; QIU, H.J. Applications of replicating-competent reporter-expressing viruses in diagnostic and molecular virology. **Viruses** **8** (5): 2016.
- LI, G.H.; NING, Z.J.; LIU, Y.M.; LI, X.H. Neurological Manifestations of Dengue Infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** **7**: 449, 2017.
- LIDDELOW, S.A. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. **Frontiers in Neuroscience** **9** (32): 1-13, 2015.
- LIMA-CAMARA, T.N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Rev. Saude Publica** **50** (36), p. 1-7, 2016.
- LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. virus res** **59**, 23–61, 2003.
- LOPES, O.S. Encefalite pelo vírus Rocio. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46 (1/2):95-101, 1986.

- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saude** 5 (3): 55-64, 2014.
- LORENZ, W.W.; CORMIER, M.J.; O'KANE, D.J.; HUA D.; ESCHER, A.A.; SZALAYET, A.A. Expression of the Renilla reniformis luciferase gene in mammalian cells. **J. biolumin. Ch.** 11 (1): 31-37, 1996.
- LYONS, J.L. Viral meningitis and encephalitis. *Continuum Journal.com.* 24: 1284–1297, 2018.
- MACKENZIE, J.S.; WILLIAMS, D.T.; VAN DEN HURK, A.F.; SMITH, D.W.; CURRIE, B.J. Japanese Encephalitis Virus: The Emergence of Genotype IV in Australia and Its Potential Endemicity. **Viruses** 14 (2480): 1-26, 2022.
- MARTIN, D.A.; MUTH, D.A.; BROWN, T.; JOHNSON, A.J.; KARABATSOS, N.; ROEHRIG, J.T. Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. **J. Clin. Microb.** 38 (5): 1823-1826, 2000.
- MATTIA, K.; PUFFER, B.A.; WILLIAMS, K.L.; GONZALEZ, R.; MURRAY, M.; SLUZAS, E.; PAGANO, D.; AJITH, S.; BOWER, M.; BERDOUGO, E.; HARRIS, E.; DORANZ, B.J. Dengue Reporter Virus Particles for Measuring Neutralizing Antibodies against Each of the Four Dengue Serotypes. **Plos One** 6 (11): 1-9, 2011.
- MAURYA, P.K.; KULSHRESHTHA, D.; SINGH, A.K.; THACKER, A.K. Rapidly resolving weakness related to hypokalemia in patients infected with dengue virus. **J. Clin. Neuromuscul. Dis.** 18, 72–78, 2016.
- MAXIMOVA, O.A. & PLETNEV, A.G. Flaviviruses and the central nervous system: revisiting neuropathological concepts. **Annu. Rev. Virol.** 5, 255–272: 2018.
- MCCABE, S.M.; ZHAO, N. The Potential Roles of Blood–Brain Barrier and Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier in Maintaining Brain Manganese Homeostasis. **Nutrients** 13 (1833):1-14, 2021.

- MEDEIROS, D.B.A.; NUNES, M.R.T.; VASCONCELOS, P.F.C.; CHANG, G.J.J.; KUNO, G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in São Paulo state. **J. Gen. Virol.** **88** (8): 2237–2246, 2007.
- MEDEIROS, D.B.A.; VASCONCELOS, P.F.C. Is the Brazilian diverse environment is a crib for the emergence and maintenance of exotic arboviruses? *An. Acad. Bras. Ciênc. (Online)* 91: 1-6, 2019.
- MEHTA, R.; SOARES, C.N.; MEDIALDEA-CARRERA, R.; ELLUL, M.; DA SILVA, M.T.T.; ROSALA-HALLAS, A.; JARDIM, M.R.; BURNSIDE, G.; PAMPLONA, L.; BHOJAK, M.; MANOHAR, R.; SILVA, G.A.M.; ADRIANO, M.V.; BRASIL, P.; NOGUEIRA, R.M.R.; SANTOS, C.C.; LANCE TURTLE, L.; SEQUEIRA, P.C.; BROWN, D.W.; GRIFFITHS, M.J.; FILIPPIS, A.M.B., SOLOMON, T. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **12** (2): 2018.
- MELANDRI, V.; GUIMARÃES, A.E.; KOMAR, N.; NOGUEIRA, M.L.; MONDINI, A.; FERNANDEZ-SESMA, A.; ALENCAR, J.; BOSCH, I. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **107** (8): 1073-1075, 2012.
- MELLO, C.S.; CABRAL-CASTRO, M.J.; FARIA, L.C.S.; PERALTA, J.M.; PUCCIONI-SOHLER, M. Use of Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Neuroinvasive Dengue, Zika, and Chikungunya: A 19-year systematic review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **54**: 1-7, 2021.
- MILHIM, B.H.G.A.; ESTOFOLETE, C.F.; DA ROCHA, L.C.; LISO, E.; BRIENZE, V.M.S.; VASILAKIS, N.; TERZIAN, A.C.B.; NOGUEIRA, M.L. Fatal Outcome of Ilheus Virus in the Cerebrospinal Fluid of a Patient Diagnosed with Encephalitis. **Viruses** **12**, (957): 1-10, 2020.
- MILLER, J. L.; DE WET, B.J.M.; DEWET, B.J.M.; MARTINEZ-POMARES, L., RADCLIFFE, C.M.; DWEK, R.A.; RUDD, P.M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **Plos Pathog.** **4** (2): 1-11, 2008.

- MONDINI, A.; CARDEAL, I.L.S.; LÁZARO, E., NUNES, S.H.; MOREIRA, C.C.; RAHAL, P.; MAIA, I.L.; FRANCO, C.; GÓNGORA, D.V.N.; GÓNGORA-RUBIO, F.; CABRERA, E.M.S.; FIGUEIREDO, L.T.M.; FONSECA, F.G.; BRONZONI, R.V.M.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Saint Louis Encephalitis Virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13, (1): 2007.
- MONGKOLSAPAYA, J.; DEJNIRATTISAI, W.; XU, X.; VASANAWATHANA, S.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; CHAIRUNSRI, A.; SAWASDIVORN, S.; DUANGCHINDA, T.; DONG, T.; ROWLAND-JONES, S.; YENCHITSOMANUS, P.; MCMICHAEL, A.; MALASIT, P.; SCREATON, G. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nat. Med.** 9, 921–927, 2003.
- MORAES, M.M.; KUBISZESKI, J.R.; VIEIRA, C.J.S.P.; GUSMAO, A.F.; PRATIS, T. S.; COLOMBO, T.E.; THIES, S.F.; CARMO ARAUJO, F.; ZANELLI, C.F.; MILHIM, B.H.G.A.; SILVA, GISLAINE, C.D.; NOGUEIRA, M.L.; PACCA, C.C.; BRONZONI, R.V.M.; MONDINI, A. Detection of Saint Louis encephalitis virus in two Brazilian states. **J. Med. Virol.** 1-6, 2021.
- MORAES-RÊGO, S.F.; RODRIGUES, A.L.; MORAES-RÊGO, K.G. Contagem específica de células do Líquido Céfaloraquídeo em câmara usando coloração supravital. **Arq. Neuro-Psiquiat.** 48 (3): 329-335, 1990.
- MOREL, A.P.; WEBSTER, A.; ZITELLI, L.C.; UMENO, K.; SOUZA, U.A.; PRUSCH, F.; ANICET, M.; MARSICANO, G.; BANDARRA, P.; TRAININI, G.; STOCKER, J.; GIANI, D.; FORTES, F.B.; GOENAGA, S.; RECK J. Serosurvey of West Nile virus (WNV) in free-ranging raptors from Brazil. *Braz. J. Microb.* 52: 411–418, 2021.
- MORITA, E.; SUZUKI, Y. Membrane-Associated Flavivirus Replication Complex—Its Organization and Regulation. **Viruses** 13 (1060): 1-15, 2021.
- MORRISON, B.M. Physiology of Cerebrospinal Fluid Secretion, Recirculation, and Resorption. In: *Cerebrospinal Fluid in clinical practice*. Irani, D.N. (ed.) 2009. 11-17p.
- MISHRA, N.; NG, J.; RAKEMAN, J.L.; PERRY, M.J.; CENTURIONI, D.A.; DEAN, A.B.; PRICE, A.; THAKKAR, R.; ANGUS, A.G.; WILLIAMSON, P.; DELWART, E.;

- CARRINGTON, C.; SAHADEO, N.; CHE, X.; BRIESE, T.; TOKARZ, R.; LIPKIN, W.I. One-step pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of zika, dengue, chikungunya, West Nile viruses and a human housekeeping gene. **J. Clin. Virol.** **120**, 44–50, 2019.
- MUBEMBA, B.; MBURU, M.M.; CHANGULA, K.; MULEYA, W.; MOONGA, L.C.; CHAMBARO, H.M.; KAJIHARA, M.; QIU, Y.; ORBA, Y.; HAYASHIDA, K.; SUTCLIFFE, C.G.; NORRIS, D.E.; THUMA, P.E.; NDUBANI, P.; CHITANGA, S.; SAWA, H.; TAKADA, A.; SIMULUNDU, E. Current knowledge of vector-borne zoonotic pathogens in Zambia: A clarion call to scaling up “One Health” research in the wake of emerging and re-emerging infectious diseases. **PLOS Neg.Trop. Dis.** **16** (2): 1-20, 2022.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** **3** (1): 13–22, 2005.
- MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; LAURENT-ROLLE, M.; ASHOUR, J.; MARTÍNEZ-SOBRIDO, L.; ASHOK, M.; LIPKIN, W.I.; GARCÍA-SASTREET, A. Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. **J Virol.** **79**: 8004–8013, 2005.
- MURRAY, K.O.; MERTENS, E.; DESPRES, P. West Nile Virus and Its Emergence in the United States of America. **Vet. Res.** **41**, 67, 2010.
- MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C.; BIERLAIRE, D.; ZISOU, K.; YAN, A.S.; CAO-LORMEAU, V. M.; BROULT, J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance** **19** (14), 1-3, 2014.
- MUSTAFÁ, Y.M.; MEUREN, L.M.; COELHO, S.V.A.; DE ARRUDA, L.B. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. **Front. Microbiol.** **10** (525): 1-14, 2019.
- NEVES, A. S.; MACHADO, C. J. A reemergência do vírus Rocio no Brasil. **Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba** **18** (1): 61-2, 2016.

- NEUFELDT, C.J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E.G.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nat. Rev. Genet.** **16**, 125–142, 2018.
- NG, W.C.; SOTO-ACOSTA, R.; BRADRICK, S.S.; GARCIA-BLANCO, M.A.; OOI, E.E. The 5' and 3' untranslated regions of the flaviviral genome. **Viruses** **9**, 137; 2017.
- NGONO, A.E. & SHRESTA, S. Immune response to dengue and Zika. **Annu. Rev. Immunol.** **36**, 279–308, 2018.
- NOUDA, R.; MINAMIA, S.; KANAIA, Y.; KAWAGISHIA, T.; NURDINA, J.A.; YAMASAKIA, M.; KUWATAB, R.; SHIMODA, H.; MAEDA, K.; KOBAYASHIA, T. Development of an entirely plasmid-based reverse genetics system for 12-segmented double-stranded RNA viroses. **PNAS** **118** (42): 2021.
- NUNES, B.T.D.; MENDONÇA, M.H.R.; SIMITH, D.B.; MORAES, A.F.; CARDOSO, C.C.; PRAZERES, I.T.E.; AQUINO, A.A.; SANTOS, A.C.M.; QUEIROZ, A.L.N.; RODRIGUES, D.S.G.; ANDRIOLO, R.B.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; MARTINS, L.C.; VASCONCELOS, P. F.C.; MEDEIROS, D.B.A. Development of RT-qPCR and semi-nested RT-PCR assays for molecular diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **13** (12): 1–24, 2019.
- OLIVEIRA-FILHO, E.F.; FISCHER, C.; BERNECK, B.S.; CARNEIRO, I.O., KÜHNE, A.; CAMPOS, A.C.A.; RIBAS, J.R.L.; NETTO, E.M.; FRANKE, C.R.; ULBERT, S.; DREXLER, J.F. Ecologic Determinants of West Nile Virus Seroprevalence among Equids, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.** **27** (9): 2021.
- OLIVEIRA, C.S. & VASCONCELOS, P.F.C. Microcephaly and Zika virus. **J. pediatr.** **92** (2), 103-105, 2016.
- OLIVEIRA, J.P.S.; MENDES, N.T.; MARTINS, A.R.; SANVITO, W.L. Líquido cefalorraquidiano: história, técnicas de coleta, indicações, contraindicações e complicações. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** **56**: 1-11, 2020.
- OLIVEIRA, G., VOGELS, C.B.F.; ZOLFAGHARI, A.; SARAF, S.; KLITTING, R.; WEGER-LUCARELLI, J.; LEON, K.P.; ONTIVEROS, C.O.; AGARWAL, R.;

- KONSTANTIN, A.; TSETSARKIN, K.A.; HARRIS, E.; EBEL, G.D.; WOHL, S.; GRUBAUGH, N.D.; ANDERSEN, K.G. Genomic and phenotypic analyses suggest moderate fitness differences among Zika virus lineages. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **17** (2): 1-21, 2023.
- OTTO, F.; HARRER, C.; PILZ, G.; WIPFLER, P.; HARRER, A. Role and Relevance of Cerebrospinal Fluid Cells in Diagnostics and Research: State-of-the-Art and Underutilized Opportunities. **Diagnostics** **12** (79): 1-15, 2022.
- PAHO. Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Washington, D.C. 102p. 2017.
- PAPA, M.P.; MEUREN, L.M.; COELHO, S.V.A.; DE O LUCAS, C.G.; MUSTAFÁ, Y.M.; MATASSOLI, F. L.; SILVEIRA, P.P.; FROST, P.S.; PEZZUTO, P.; RIBEIRO, M.R.; TANURI, A.; NOGUEIRA, M.L.; CAMPANATI, L.; BOZZA, M.T.; PAULA NETO, H.A.; PIMENTEL-COELHO, P.M.; FIGUEIREDO, C.P.; AGUIAR, R.S.; ARRUDA, L.B. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. **Front. Microbiol.** **8** (2557): 1-17, 2017.
- PAN, Y.; CAI, W.; CHENG, A.; WANG, M.; YIN, Z.; JIA, R. Flaviviruses: Innate Immunity, Inflammasome Activation, Inflammatory Cell Death, and Cytokines. **Front. Immunol.** **13**, 1-15, 2022.
- PANNING, M. ZIKA Virus Serology: More Diagnostic Targets, more Reliable Answers? **EBioMedicine** **16**, 12–13, 2017.
- PARISIEN, J.P.; LENOIR, J.J.; ALVARADO, G.; HORVATH, C.M. The Human STAT2 Coiled-Coil Domain Contains a Degron for Zika Virus Interferon Evasion. **J. Virol.** **96** (1): 1-12, 2022.
- PAUVOLID-CORRÊA, A.; KENNEY, J.L.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z.M.S.; SCHATZMAYR, H.G.; Nogueira, R.M.R.; Brault, A.C.; Komar, N. Ilheus Virus Isolation in the Pantanal, West-Central Brazil. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **7** (7): 1-8, 2013.

- PENG, B.H. & WANG, T. West Nile Virus Induced Cell Death in the Central Nervous System. **Pathogens** **8** (215): 2019.
- PEREIRA, L.H.S.; DE SOUZA, T.P.P.; CAMARGOS, V.N.; DE OLIVEIRA BARBOSA, L.A.; TARANTO, A.G.; JUNIOR, M.C.; SANTOS, H.L.; LOPES, D.O.; FERREIRA, J.M.S.; SANTOS, L.L. Assays with recombinant soluble isoforms of DC-SIGN, a dengue virus ligand, show variation in their ability to bind to mannose residues. **Arch. Virol.** **164**, 2793–2797, 2019.
- PETERSEN, L.R. Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. **J Medical Entomology** **56** (6): 1456–1462, 2019.
- PIERSON, T.C. & DIAMOND, M.S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nat. Microb.** **5** (796): 796–812, 2020.
- PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; TRAVASSOS DA ROSA, J.F.; ISHAK, R.; FREITAS, R.B.; GOMES, M.L. et al. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **Am J Trop Med Hyg.** **30**: 149–60, 1981.
- PINHEIRO, F.P.; LEDUC, J.W.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; LEITE, O.F. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** **30** (1): 145-8, 1981.
- PINHEIRO, T.J.; GUIMARÃES, L.F.; SILVA, M.T.T.; SOARES, C.N. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. Manifestações neurológicas das infecções pelos vírus Zika e Chikungunya. **Arq. Neuropsiquiatr.** **74** (11): 937-943, 2016.
- PIANTADOSI, A.; KANJILAL, S. Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States. **J. Clin. Microbiol.** **58** (12): 2020.
- PIAZZETTA, G.R; PEREIRA, H.C.P. Punção lombar. **Revista de Ciências da Saúde** **33** (1): 111-123, 2021.
- PIANTADOSI, A.; MUKERJI, S.S.; YE, S.; LEONE, M.J.; FREIMARK, L.M.; PARK, D.; ADAMS, G.; LEMIEUX, J.; KANJILAL, S.; SOLOMON, I.H.; AHMED, A.A.;

- GOLDSTEIN, R.; GANESH, V.; OSTREM, B.; CUMMINS, K.C.; THON, J.M.; KINSELLA, C.M.; ROSENBERG, E.; FROSCH, M.P.; GOLDBERG, M.B.; CHO, T.A.; SABETI, P. Enhanced virus detection and metagenomic sequencing in patients with meningitis and encephalitis. **mBio** **12** (4): 1-13, 2021.
- POPLIN, V.; BOULWARE, D.R.; BAHR, N.C. Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. **Biomark. Med.** **14** (6): 459–479, 2020.
- POSSAS, C.; BRASIL, P.; MARZOCHI, M.C.A.; TANURI, A.; MARTINS, R.M.; MARQUES, E.T.A.; BONALDO, M.C.; FERREIRA, A.G.P.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, R.M.R.; SEQUEIRA, P.C.; MARZOCHI, K.B.F.; HOMMA, A. Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **112** (5): 319-327, 2017.
- PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K.M.; HUDSON, W.H.; ONLAMOON, N.; SEWATANON, J.; EDUPUGANTI, S.; PATTANAPANYASAT, K.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; MULLIGAN, M.J.; WILSON, P.C.; AHMED, R.; SUTHAR, M.S.; WRAMMERT, J. Human Antibody Responses after Dengue Virus Infection Are Highly Cross-Reactive to Zika Virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **113**, 7852–7857, 2016.
- PRIYAMVADA, L.; HUDSON, W.; AHMED, R.; WRAMMERT, J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. **Emerg. Microbes Infect.** **6** (33): 1-6, 2017.
- PUCCIONI-SOHLER, M. & SOARES, C.N. Líquido Cefalorraquidiano – Parte I. Capítulo 5. NETO, J.P.B.; TAKAYANAGUI, O.M. In: Tratado de Neurologia da Academia Brasileira de Neurologia. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 1525p.
- QUEIROZ, A.L.N.; BARROS, R.S.; SILVA, S.P.; RODRIGUES, D.S.G.; CRUZ, AC.R.; DOS SANTOS, F.B.; VASCONCELOS, P.F.C.; TESH, R.T.B.; NUNES, B.T.D.; MEDEIROS, D.B.A. The Usefulness of a Duplex RT-qPCR during the Recent Yellow Fever Brazilian Epidemic: Surveillance of Vaccine Adverse Events, Epizootics and Vectors. **Pathogens** **10** (693): 2021.
- RACANIELLO, V.; BALTIMORE, D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. **Science** **214**, (4523): 916–919, 1981.

- RATHORE, A.P.S.; ST. JOHN, A.L. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. **Front. Immunol. 11**: 334, 2020.
- REIBER, H.; PETER, J.B. Cerebrospinal fluid analysis: Disease-related data patterns and evaluation programs. **J Neurol Sci 184**: 101–122, 2001.
- REIS, L.A.M.; NETO, J.P.N. Ilheus virus: Revisão sobre um Arbovírus Emergente. **Braz. J. Develop.7** (4): 37675-37695, 2021.
- RICE, C.M.; LENCHES, E.M.; EDDY, S.R.; SHIN, S.J.; SHEETS, R.L.; STRAUSS, J.H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science 229**:726-733, 1985.
- RHEE, C.; EATON, E.; CONCEPCION, W.; BLACKBURN, B. West Nile virus encephalitis acquired via liver transplantation and clinical response to intravenous immunoglobulin: Case report and review of the literature. **Transpl. Infect. Dis. 13**, 312–317, 2011.
- REISEN, W.K. Epidemiology of St. Louis encephalitis virus. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ, editors. *Advances in virus research*. San Diego: Academic Press; 2003. Vol. 61, p. 139-83.
- REISEN, W.K.; WHEELER, S.S. Surveys for antibodies against mosquito borne encephalitis viruses in California birds. **Vector Borne Zoo Dis. 6**, 248–260, 2016.
- ROBBIANI, D. F.; BOZZACCO, L.; KEEFFE, J.R.; KHOURI, R.; OLSEN, P.C.; GAZUMYAN, A.; SCHAEFER-BABAJEW, D.; AVILA-RIOS, S.; NOGUEIRA, L.; PATEL, R.; AZZOPARDI, S.A.; UHL, L.F.; SAEED, M.; SEVILLA-REYES, E.E.; AGUDELO, M.; YAO, K.H.; GOLIJANIN, J.; GRISTICK, H.B.; HURLEY, A.; CASKEY, M.; PAI, J.; OLIVEIRA, T.; WUNDER JR., E.A.; SACRAMENTO, G.; NERY JR., N.; ORGE, C.; COSTA, F.; REIS, M.G.; THOMAS, N.M.; EISENREICH, T.; WEINBERGER, D.M.; DE ALMEIDA, A.R.P.; WEST JR., A.P.; RICE, C.M.; BJORKMAN, P.J.; TERAN, G.R.; KO, A.I.; MACDONALD, M.R.; NUSSENZWEIG, M.C. Recurrent potent human neutralizing antibodies to zika virus in Brazil and Mexico. **Cell 169** (4), 597–609, 2017.

- ROBY, J.A.; PIJLMAN, G.P.; WILUSZ, J.; KHROMYKH, A.A. Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA: Multiple Functions in West Nile Virus Pathogenesis and Modulation of Host Responses. **Viruses** 6 (2): 404–427, 2014.
- RODRIGUES, S.G.; NUNES, M. R. T.; CASSEB, S. M. M.; PRAZERES, A. S. C.; RODRIGUES, D. S. G.; SILVA, M. O.; CRUZ, A. C. R.; TAVARES NETO, J. C.; VASCONCELOS, P. F. C. Molecular epidemiology of the Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **J. Gen. Virol.** (Print). 2420-2427, 2010a.
- RODRIGUES, S. G.; OLIVA, O. P.; ARAÚJO, F. A. A.; MARTINS, L. C.; CHIANG, J. O.; HENRIQUES, D. F.; et al. Epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon region and in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil: elevated prevalence of antibodies in horses. **Rev Pan-Amaz Saude** 1: 81-86, 2010b.
- ROSSI, S.L.; FAYZULIN, R.; DEWSBURY, N.; BOURNE, N.; MASON, P.W. Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. **Virology** 1 (364): 184–195, 2007.
- ROZELLE, D.; FILONE, C.M.; DOWER, K.; CONNOR, J.H. Vaccinia Reporter Viruses for Quantifying Viral Function at All Stages of Gene Expression. **J Visualized Experiments** 87: 51522, 2014.
- SAIVISH, M.V.; DA COSTA, V.G.; RODRIGUES, R.L.; FERES, V.C.R.; MONTOYA-DIAZ, E.; MORELI, M.L. Detection of Rocio Virus SPH 34675 during Dengue Epidemics, Brazil, 2011–2013. **Emerg. Infect. Dis.** 26, 797–799, 2020.
- SAITOU, M.; FURUSE, M.; SASAKI, H.; SCHULZKE, J.D.; FROMM, M.; TAKANO, H.; NODA, T.; TSUKITA, S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. **Mol. Biol. Cell** 11, 4131–4142, 2000.
- SANGUANSEMSRI, B. T., PONEPRASERT, B. PHORNPHUTKEL. Acute Encephalopathy. Associated with Dengue Infection, SEAMEO TROPMED, Bangkok, 1976, pp. 10–11.

- SANTIAGO, G.A.; VERGNE, E.; QUILES, Y.; COSME, J.; VAZQUEZ, J.; MEDINA, J.F.; MEDINA, F.; COLÓN, C.; MARGOLIS, H.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. **PLoS Negl Trop Dis** **7** (7): 2013.
- SANTIAGO, G.A.; VÁZQUEZ, J.; 1, COURTNEY, S.; MATÍAS, K.Y.; ANDERSEN, L.E.; COLÓN, C.; BUTLER, A.E.; ROULO, R.; BOWZARD, J.; VILLANUEVA, J.M.; MUÑOZ-JORDAN, J.L. Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nat. Commun.** **9**: 1391, 2018.
- SANTINI, M.; HABERLE, S.; ŽIDOVEC-LEPEJ, S.; SAVIĆ, V.; KUSULJA, M.; PAPIĆ, N.; VIŠKOVIĆ, K.; ŽUPETIĆ, I.; SAVINI, G.; BARBIĆ, L.; TABAIN, I.; KUTLEŠA, M.; KRAJINOVIĆ, V.; POTOČNIK-HUNJADI, T.; DVORSKI, E.; BUTIGAN, T.; KOLARIC-SVIBEN, G.; STEVANOVIĆ, V.; GORENEC, L.; GRGIĆ, I.; GLAVAČ, F.; MEHMEDOVIC, A.; LISTEŠ, E.; VILIBIĆ-C'AVLEK, T. Severe West Nile Virus Neuroinvasive Disease: Clinical Characteristics, Short- and Long-Term Outcomes. **Pathogens** **11** (52): 1-16, 2022.
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo Protocolo de Coleta para o Diagnóstico Laboratorial dos Enterovírus. **Rev. Saúde Pública** **40** (4): 748-50, 2006.
- SCARAMOZZINO, N.; CRANCE, J.M.; JOUAN, A.; DEBRIEL, D.A.; STOLL, F.; GARIN, D. Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences. **J. Clin. Microbiol.** **39** (5): 1922–1927, 2001.
- SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **J. Appl. Bioinform. Comput. Biol.** **27** (6); 863–86410, 2011.
- SCHWAIGER, M.; CASSINOTTI, P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. **J. Clin. Virol.** **27** (2): 136–145, 2003.

- SERGEEVAA, M.V.; PULKINAA, A.A.; ROMANOVSKAYA-ROMANKOA, E.A.; MUSTAFAEVAC, A.S.; EGOROVA, A.YU.; STUKOVAA, M.A. Rapid Assessment of Neutralizing Antibodies Using Influenza Viruses with a Luciferase Reporter. *Appl. Biochem. Microbiol.* 58 (7): 878–886, 2022.
- SEJVAR, J.J. & MARFIN, A.A. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Rev. Med. Virol.* 16: 209–224, 2006.
- SETH, R.B.; SUN, L.; CHEN, Z.J. Antiviral innate immunity pathways. **Cell Res.** 16, 141–147, 2006.
- SICONELLI, M.J.L.; JORGE, D.M.M.; CASTRO-JORGE, L.A.; FONSECA-JÚNIOR, A.A.; NASCIMENTO, M.L.; FLORIANO, V.G.; DE SOUZA, F.R.; QUEIROZ-JÚNIOR, E.M.; CAMARGOS, M.F.; COSTA, E.D.L.; CARVALHO, A.A.B.; FONSECA, B.A.L. Evidence for current circulation of an ancient West Nile virus strain (NY99) in Brazil. **J. Braz. Soc. Trop. Med.** 54: (e0687-2020), 2021.
- SILVA, A.S.G.; MATOS, A.C.D.; CUNHA, M.A.C.R.; REHFELD, I.S.; GALINARI, G.C.F.; MARCELINO, S.A.C.; SARAIVA, L.H.G.; MARTINS, N.R.D.S.; MARANHÃO, R.P.A.; LOBATO, Z.I.P.; PIEREZAN, F.; GUEDES, M.I.M.C.; COSTA, E.A. West Nile virus associated with equid encephalitis in Brazil, 2019. **Transbound Emerg. Dis.** 66 (1): 445-53, 2019.
- SIQUEIRA, R.F.; HANSEN, V.S.; MARTINS M.F.M.; LEAL, M.L.R; BONDAN. E.F. Infecção pelo vírus da Febre do Nilo Ocidental em equinos no Estado de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae.** 50 (737), 2022.
- SHAN, C.; ORTIZ, D.A.; YANG, Y.; WONG, S.J.; KRAMER, L.D.; SHI, P.Y.; LOEFFELHOLZ, M.J; REN, P. Evaluation of a novel reporter virus neutralization test for serological diagnosis of Zika and dengue virus infection. **J. Clin. Microbiol.** 55 (10): 3028-3036, 2017a.
- SHAN, C.; XIE, X.; REN, P.; LOEFFELHOLZ, M.J.; YANG, Y.; FURUYA, A.; DUPUIS, A.P.; KRAMER, L.D.; WONG, S.J.; SHI, P.Y. A Rapid Zika Diagnostic Assay to Measure Neutralizing Antibodies in Patients. **EBioMedicine.** 17: 157–162, 2017b.

- SHAN, C.; MURUATO, A.E.; NUNES, B.T.D.; LUO, H.; XIE, X.; MEDEIROS, D.B.A.; WAKAMIY, M.; TESH, R.B.; BARRETT, A.D.; WANG, T.; WEAVER, S.C.; VASCONCELOS, P.F.C.; ROSSI, S.L.; SHI, P.Y. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. **Nat. Med.** 23 (6): 763-767, 2017c.
- SHAN, C.; XUPING, X.; SHI, P. Zika virus vaccine: Progress and Challenges. **Cell Host & Microbe.** 24 (1): 12–17, 2018.
- SHAO, Q.; HERRLINGE, S.; ZHU, Y.N.; YANG, M.; GOODFELLOW, F.; STICE, S. L.; QI, X.P.; BRINDLEY, M. A.; CHEN, J.F. The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. **Development** 144, 4114–4124, 2017.
- SHOPE, R.E. The use of micro-hemagglutination-inhibition test to follow antibody response after arthropodborne virus infection in a community of forest animals. **Anais de Microbiologia** 11, 67-171, 1963.
- SLONCHAK, A.; PARRY, R.; PULLINGER, B.; SNG, J.D.J.; WANG, X.; BUCK, T.F.; TORRES, F.J.; HARRISON, J.J.; COLMANT, A.M.G.; HOBSON-PETERS, J.; HALL, R.A.; TUPLIN, A.; KHROMYKH, A.A. Structural analysis of 3'UTRs in insect flaviviruses reveals novel determinants of sfRNA biogenesis and provides new insights into flavivirus evolution. **Nature Communications** 3 (1): 1–16, 2022.
- SPECTOR, R., KEEP, R.F., SNODGRASS, S.R., SMITH, Q.R., JOHANSON, C.E. A balanced view of choroid plexus structure and function: focus on adult humans. **Exp. Neurol.** 267, 78–86, 2015a.
- SPECTOR, R.; SNODGRASS S. R.; JOHANSON, C.E. A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans Reynold. **Experimental Neurology** 273, 57–68, 2015b.
- SOLAR, P.; ZAMANI, A.; KUBICKOVA, L.; DUBOVY, P.; JOUKAL, M. Choroid plexus and the blood-cerebrospinal fluid barrier in disease. **Fluids Barriers CNS** 17 (35): 1-29, 2020.

- SOLBRIG, M.V.; PERNG, G.C. Current neurological observations and complications of dengue virus infection. **Curr. Neurol. Neurosci. Rep.** **15**: 29, 2015.
- SOLOMON, I. H. Molecular and Histologic Diagnosis of Central Nervous System Infections. **Surg. Pathol.** **13**: 277–289, 2020.
- SONGJAENG, A.; THIEMMECA, S.; MAIRIANG, D.; PUNYADEE, N.; KONGMANAS, K.; HANSUEALUEANG, P.; TANGTHAWORNCHAIKUL, N.; DUANGCHINDA, T.; MONGKOLSAPAYA, J.; SRIRUKSA, K.; LIMPITIKUL, W.; MALASIT, P.; AVIRUTNAN, P. Development of a Singleplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Pan-Dengue Virus Detection and Quantification. **Viruses** **14** (1271): 2022.
- SOUSA JR., I.P.; DOS SANTOS, F.B.; DE PAULA, V.S.; VIEIRA, T.C.R.G.; DIAS, H.G.; BARROS, C.A.; DA SILVA, E.E. Viral and Prion Infections Associated with Central Nervous System Syndromes in Brazil. **Viruses** **13**, 1370, 2021.
- SHRESTHA, B.; BRIEN, J.D.; SUKUPOLVI-PETTY, S.; AUSTIN, K.; EDELING, M.A.; KIM, T.; O'BRIEN, K.M.; NELSON, C.A.; JOHNSON, S.; FREMONT, D.H.; DIAMOND, M.S. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS Pathog.** **6** (4): 2010.
- STAPLETON, J.T.; FOUNG, S.; MUERHOFF, A.S.; BUKH, J.; SIMMONDS, P. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **J. Gen. Virol.** **92** (2): 233–46, 2011.
- STEINEMANN, A.; GALM, I.; CHIP, S.; NITSCH, C.; MALY, I.P. Claudin-1, -2 and -3 Are Selectively Expressed in the Epithelia of the Choroid Plexus of the Mouse from Early Development and into Adulthood While Claudin-5 is Restricted to Endothelial Cells. **Front. Neuroanat.** **10** (16): 1-10, 2016.
- STROMINGER, I.; ELYAHU, Y.; BERNER, O.; RECKHOW, J.; MITTAL, K.; NEMIROVSKY, A.; MONSONEGO, A. The Choroid Plexus Functions as a Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System. **Front. Immunol.** **9** (1066), 2018.

- SUKUPOLVI-PETTY, S.; AUSTIN, S.K.; PURTHA, W.E.; OLIPHANT, T.; NYBAKKEN, G.E. Type-and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. **J Virology** **81** (23): 12816–12826, 2007.
- SÜSSMUTH, S.D.; TUMANI, H. CSF Cells: Cell Count, Cytomorphology, Cytology, and Immunophenotyping In: TEUNISSEN, C.E.; ZETTERBERG, H. Cerebrospinal Fluid Biomarkers, New York, NY, Springer Science, 2021. 238p.
- SUWANMANEE, S. & LUPLERTLOP, N. Dengue and Zika viruses: lessons learned from the similarities between these Aedes mosquito-vectored arboviruses. **J. Microbiol.** **55** (2): 81-89, 2017.
- SWANSTROM, J.A.; PLANTE, J.A.; PLANTE, K.S.E.F.; MCGOWAN, Y.E.; GALLICHOTTE, E.N.; WIDMAN, D.G.; HEISE, M.T.; DE SILVA, A.M.; BARIC, R.S. Dengue virus envelope dimer epitope monoclonal antibodies isolated from dengue patients are protective against Zika Virus. **MBio** **7**, (4): 2016.
- SZCZEPKOWSKA, A.; KOWALEWSKA, M.; SKIPOR, J. Melatonin from slow-release implants upregulates claudin-2 in the ovine choroid plexus. **J. Physiol. Pharmacol.** **70**: 249–254, 2019.
- TAHERKHANI, R.; FARSHADPOUR, F. Molecular identification and clinical characteristics of mumps virus and human herpesviruses associated with aseptic meningitis in South of Iran. **Virus Disease** **32** (4): 666–673, 2021.
- TANG, Y.; HAPIP, A.C.; LIU, B.; FANG, C.T. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. **J. Clin. Virol.** **36** (3): 177–182, 2006.
- TAVAKOLIAN, S.; GOUDARZI, H.; ESLAMI, G.; DARAZAM, I.A.; DEGHAN, G.; FAGHIHLOO, E. Detection of Enterovirus, Herpes Simplex, Varicella Zoster, Epstein-Barr and Cytomegalovirus in cerebrospinal fluid in meningitis patients in Iran. **J. Clin. Lab. Anal.** **35**, 1-6, 2021.
- TEUNISSEN, C.E.; ZETTERBERG, H. Cerebrospinal Fluid Biomarkers. *Neuromethods* 168. New York: Springer Protocols, 2021. 236p.

- THOMPSON, E.J. Proteins of the Cerebrospinal Fluid. Analysis and Interpretation in the Diagnosis and Treatment of Neurological Disease, second edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005. 329p.
- TOMAR, P.S.; KUMAR, S.; PATEL, S.; KUMAR, J.S. Development and Evaluation of Real-Time Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid and Sensitive Detection of West Nile Virus in Human Clinical Samples. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** **10** (619071): 2021.
- TOMAS-OJER, P.; PUTHENPARAMPIL, M.; CRUCIANI, C.; DOCAMPO, M.J.; MARTIN, R.; SOSPEDRA, M. Characterization of Antigen-Induced CD4+ T-Cell Senescence in Multiple Sclerosis. **Front. Neurol.** **13** (790884): 1-12, 2022.
- TURTZO, L.C. Chapter 8. Cerebrospinal Fluid Acquisition and Analysis in Modern Clinical Practice. In: IRANI, D.N. Cerebrospinal Fluid in Clinical Practice. Philadelphia, PA.. Saunders of Elsevier, 2009. 297p.
- TUMANI, H. Anatomy of CSF-Related Spaces and Barriers Between Blood, CSF, and Brain. In: Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology. Deisenhammer et al. (eds.) 2015a. 17-24p.
- TUMANI, H. Physiology and Constituents of CSF. In: Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology. Deisenhammer et al. (eds.) 2015b. 25-34p.
- TYLER, K.L.; PAPE, J.; GOODY, R.J.; CORKILL, M.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K. CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. **Neurology** **66**: 361–365, 2006.
- UMEDA, K.; IKENOUCI, J.; KATAHIRA-TAYAMA, S.; FURUSE, K.; SASAKI, H.; NAKAYAMA, M.; MATSUI, T.; TSUKITA, S.; FURUSE, M.; TSUKITA, S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. **Cell** **126**: 741–754, 2006.
- UNTERGASSER, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3--new capabilities and interfaces. **Nucleic acids res.** **40** (15) 2012.

- VALLONE, P. M.; BUTLER, J. M. AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **BioTechniques** **37** (2): 226–231, 2004.
- VAN LEUR, S.W.; HEUNIS, T.; MUNNUR, D.; SANYAL, S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. **Virulence** **12** (1): 2814–2838, 2021.
- VASCONCELOS, H. B.; AZEVEDO, R. S. S.; CASSEB, S. M.; NUNES-NETO, J. P.; CHIANG, J. O.; CANTUÁRIA, P. C.; SEGURA, M. N.; MARTINS, L. C.; MONTEIRO, H. Á.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R.; VASCONCELOS, P. F. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. **J. Clin. Virol.** **44** (2): 129–133, 2009.
- VATTI, A.; MONSALVE, D.M.; PACHECO, Y.; CHANG, C.; ANAYA, J.M.; GERSHWIN, M.E. Original Antigenic Sin: A Comprehensive Review. **J. Autoimmun.** **83**, 12–21, 2017.
- VÁZQUEZ, A.; HERRERO, L.; NEGREDO, A.; HERNÁNDEZ, L.; SÁNCHEZ-SECO, M.P.; TENORIO, A. Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. **J Virol Methods** **236**: 266-270, 2016.
- VENEGAS, E.A.; AGUILAR, P.V.; CRUZ, C.; GUEVARA, C.; KOCHER, T.J.; VARGAS, J.; HALSEY E.S. Ilheus virus infection in human, Bolivia. **Emerg. Infect. Dis.** **18** (3): 516–518, 2012.
- VENISNIK, K.M.; OLAFSEN, T.; LOENING, A.M.; IYER, M.; GAMBHIR, S.S.; WU, A.M. Bifunctional antibody-Renilla luciferase fusion protein for in vivo optical detection of tumors. **Protein Engineering, Design and Selection** **19** (10): 453-460, 2006.
- VENKATACHALAM, R. & SUBRAMANIYAN, V. Homology and conservation of amino acids in e-protein sequences of dengue serotypes. Asian Pacific. **J. Trop. Dis.** **4**, 573–577, 2014.
- VERMETTE, D.; HU, P.; CANARIE, M.F.; FUNARO, M.; GLOVER, J.; PIERCE, R.W. Tight junction structure, function, and assessment in the critically ill: A systematic review. **Intensive Care Med. Exp.** **6** (37): 1-18, 2018.

- VIEIRA, M. A.; ROMANO, A. P.; BORBA, A. S.; SILVA, E. V.; CHIANG, J. O.; EULÁLIO, K. D.; AZEVEDO, R. S.; RODRIGUES, S. G.; ALMEIDA-NETO, W. S.; VASCONCELOS, P. F. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **93** (2): 377-399, 2015.
- VIEIRA, M.A.C.S.; CRUZ, A.C.R.; BARROS, A.N.M.; COSTA, D.L.; SILVA, E.V.D.; BATISTA, F.M.A.; AZEVEDO, R.S.S.; RODRIGUES, S.G.; ARAÚJO-JÚNIOR, R.C.; VASCONCELOS, P.F.C. Guillain-Barré syndrome and dengue-like disease in 2015: temporal relationship in Piauí state and implications on Zika virus surveillance. **Rev. Ins. Med. Trop.** **59**: 1-3, 2017.
- VIEIRA, M.A.C.S.; CASTRO, A.A.S.; HENRIQUES, D.F.; SILVA, E.V.P.; TAVARES, F.N.; MARTINS, L.C.; GUIMARÃES, L.M.; MONTEIRO, T.A.F.; AZEVEDO, R.S.S.; CRUZ, A.C.R.; VASCONCELOS, P.F.C. Encephalitis associated with Zika virus infection and reactivation of the varicella-zoster virus in a Brazilian child. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **51** (3): 390-392, 2018.
- VIEIRA, M.A.C.S. **Investigação Etiológica dos Casos Suspeitos de Síndromes Neuroinvasivas Causadas por Agentes Virais no Estado do Piauí: 2014-2018.** Tese (Doutorado do Instituto Evandro Chagas) – Ananindeua, Instituto Evandro Chagas, 2020. 98p.
- VIGLIETTA, M.; BELLONE, R.; BLISNICK, A.A.; FAILLOUX, A.B. Vector Specificity of Arbovirus Transmission. **Front. Microbiol.** **12** (773211): 1-24, 2021.
- WANG, J.; MENG, M.; XU, H.; WANG, T.; LIU, Y.; YAN, H.; LIU, P.; QIN, D.; YANG, Q. Analysis of enterovirus genotypes in the cerebrospinal fluid of children associated with aseptic meningitis in Liaocheng, China, from 2018 to 2019. **BMC Infect. Diseases.** **21** (405): 1-9, 2021.
- WARANG, A.; ZHANG, M.; ZHANG, S.; SHEN, Z. A panel of real-time PCR assays for the detection of Bourbon virus, Heartland virus, West Nile virus, and *Trypanosoma cruzi* in major disease – transmitting vectors. **J. Vet. Diagn. Invest.** **33** (6): 1115-1122 2021.

- WEAVER, S.C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu. Rev. Med.** **69**: 395-408, 2018.
- WEISKOPF, D.; ANGELO, M.A.; BANGS, D.J.; Sidney, J.; Paul, S.; Peters, B.; Silva A.D.; Lindow, J.C.; Diehl, S.A.; Whitehead, S.; Durbin, A.; Kirkpatrick, B.; Setteal, A. The Human CD8 + T Cell Responses Induced by a Live Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine Are Directed against Highly Conserved Epitopes. **J Virol.** **89**, 120–128, 2015.
- WAHALA, W.M.; SILVA, A.M. The human antibody response to dengue virus infection. **Viruses.** **3**: 2374–2395. 2011.
- WILSON, M.R.; ZIMMERMANN, L.L.; CRAWFORD, E.D.; SAMPLE, H.A., SONI, P.R.; BAKER, A.N.; KHAN, L.M.; DERISI, J.L. Acute West Nile virus meningoencephalitis diagnosed via metagenomic deep sequencing of cerebrospinal fluid in a renal transplant patient. **Am. J. Transplant.** **17**: 803– 808, 2017.
- WILSON, M.R.; SAMPLE, H.A.; ZORN, K.C.; AREVALO, S.; YU, G.; NEUHAUS, J.; FEDERMAN, S.; STRYKE, D.; BRIGGS, B.; LANGELIER, C.; BERGER, A.; DOUGLAS, V.; JOSEPHSON, S.A.; CHOW, F.C.; FULTON, B.D.; DERISI, J.L.; GELFAND, J.M.; NACCACHE, S.N.; BENDER, J.; DIEN BARD, J.; MURKEY, J. CARLSON, M.; VESPA, P.M.; VIJAYAN, T.; ALLYN, P.R.; CAMPEAU, S.; HUMPHRIES, R.M.; KLAUSNER, J.D.; GANZON, C.D.; MEMAR, F.; OCAMPO, N.A.; ZIMMERMANN, L.L.; COHEN, S.H.; POLAGE, C.R.; DEBIASI, R.L.; HALLER, B.; DALLAS, R.; MARON, G.; HAYDEN, R.; MESSACAR, K.; DOMINGUEZ, S.R.; MILLER, S.; CHIU, C.Y. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. **N Engl J Med.** **380** (24): 2327–2340, 2019.
- WIMBERLY, M.C.; DAVIS, J.K.; HILDRETH, M.B.; CLAYTON, J.L. Integrated Forecasts Based on Public Health Surveillance and Meteorological Data Predict West Nile Virus in a High-Risk Region of North America. **Environ. Health Perspect.** **8**, (130): 2022.

- WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. 2009, Geneva: World Health Organization. 1-147.
- WHO. World Health Organization, 2016. Zika virus, Microcephaly and Guillain-barré Syndrome Situation Report.
- WHO, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. Acesso em: 31/03/2023.
- WHO, 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 18/04/2022.
- WOJCIK, E.; CARRITHERS, L.M.; CARRITHERS, M.D. Characterization of epithelial V-like antigen in human choroid plexus epithelial cells: Potential role in CNS immune surveillance. **Neuroscience Letters** **495**: 115–120, 2011.
- WONG, V.; GUMBINER, B.M. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. **J. Cell Biol.** **136**: 399–409, 1997.
- XIA, H.; LUO, H.; SHAN, C.; MURUATO, A.E.; NUNES, B.T.D.; MEDEIROS, D.B.A.; ZOU, J.; XIE, X.; GIRALDO, M.I.; VASCONCELOS, P.F. C.; WEAVER, S.C.; WANG, T.; RAJSBAUM, R.; SHI, P.Y. An Evolutionary NS1 Mutation Enhances Zika Virus Evasion of Host Interferon Induction. **Nat. Commun.** **9** (1): 1-13, 2018.
- XU, Z.; PENG, Y.; YANG, M.; LI, X.; WANG, J.; ZOU, R.; LIANG, J.; FANG, S.; LIU, Y.; YANG, Y. Simultaneous detection of Zika, chikungunya, dengue, yellow fever, West Nile, and Japanese encephalitis viruses by a two-tube multiplex real-time RT-PCR assay. **J. Med. Virol.** **94** (6): 2528–2536, 2022.
- YANG, D.; KWEON, C.H.; KIM, B.H.; LIM, S.I.; KIM, S.H.; KWON, J.H.; HAN, H.R. TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus. **J Vet Sci** **5** (4): 345–351, 2004.
- YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T.L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics** **13** (1): 134, 2012.

- YU, X. & CHENG, G. Adaptive Evolution as a Driving Force of the Emergence and Re-Emergence of Mosquito-Borne Viral Diseases. **Viruses** **14** (435): 1-11, 2022.
- ZHANG, Z.; WAGNER, L.; MILLER, W.; SCHWARTZ, S. A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. **J. Computat. Biol.** **7** (1–2): 203–214, 2000.
- ZANOTTO, P.M.A. & LEITE, L.C.C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Front Immunol.** **9** (1964): 2018.
- ZANLUCA, C.; MELO, V.C.A.; GLAUCO, A.L.P.M.; SANTOS, I.V.; SANTOS, C.N.D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **110**, 569–572, 2015.
- ZHU, Z.; CHAN, J.F.W.; TEE, K.M.; KWAN-YUE CHOI, G.; KAR-PUI LAU, S.; CHIU-YAT WOO, P.; TSE, H.; YUEN, K.Y. Comparative genomic analysis of preepidemic and epidemic Zika virus strains for virological factor potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerg Microbes Infect.** **5**, (3): 2016.
- ZINK, S.D.; JONES, S.A.; MAFFEI, J.G.; KRAMER, L.D. Quadruplex qRT-PCR assay for the simultaneous detection of Eastern equine encephalitis virus and West Nile virus. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** **77** (2): 129–132, 2013.
- ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic acids research** **31** (13): 3406–15, 2003.

8. ANEXO 1

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "AVALIAÇÃO DO TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO UTILIZANDO VÍRUS REPORTER PARA O DIAGNÓSTICO DE VÍRUS DENGUE E ZIKA EM ÁREA ENDÊMICA DE

Pesquisador: DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07166918.5.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.601.702

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa otimizar o processamento das amostras pelo Teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT). Assim, a proposta desse trabalho é avaliar o desempenho do Teste de Neutralização por Redução de Placa utilizando vírus repórter (Report virus neutralization test - RVNT) no diagnóstico sorológico do vírus Dengue e Zika em áreas endêmicas para flavivírus. Serão testadas amostras de indivíduos encaminhadas a Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB) do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará (IEC/PA), para esclarecimento diagnóstico de dengue e Zika, e que durante o fluxo de rotina tiveram diagnóstico confirmado para essas arboviroses. O teste RVNT será executado em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica da Universidade do Texas Divisão Médica (University of Texas Medical Branch - UTMB), em Galveston, Texas, Estados Unidos, detentor da tecnologia do RVNT, de acordo com o escopo da concessão de auxílio financeiro à pesquisa para a chamada cedido pelo MCTIC/FNDCT-CNPq/ MEC-CAPES/ MS-Decit / N°14/2016 – Processos n°440405/2016-5 e 303999/2016-0. As amostras foram enviadas na vigência ao projeto de desenvolvimento da Vacina para vírus Zika sob o consentimento e aprovação da chefia da SAARB e da Direção do IEC. Nesse trabalho, o vírus repórter pode auxiliar o diagnóstico sorológico diferencial de arboviroses, e consequentemente, o entendimento do impacto no perfil sorológico que a introdução e reemergência de lavivírus, como VZIK e VDEN, causam em áreas endêmicas como o Brasil. Além de teste de neutralização, metodologias utilizando vírus repórter já são viáveis em triagem de drogas antivirais e avaliação de

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2237

Fax: (91)3214-2233

E-mail: cep@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 3.601.702

eficácia de candidatos vacinais.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa apresenta os seguintes objetivos:

Objetivo Primário:

Avaliar o desempenho do Teste de Neutralização por Redução de Placa utilizando Vírus Repórter (Report virus neutralization test - RVNT) para diagnóstico sorológico do vírus Zika em áreas endêmicas para outros flavivírus.

Objetivo Secundário:

Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do RVNT, utilizando amostras humanas procedentes de áreas no qual há a co-circulação de diversos flavivírus; Comparar o desempenho do teste repórter com a técnica convencional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador responsável os riscos inerentes ao projeto dizem respeito ao Risco Biológico sobretudo para equipe que executará o teste de neutralização: Manipulação de amostras biológicas (soros) de pacientes com suspeita de infecção por vírus Zika e Dengue; Manipulação de cepas virais de vírus Zika e vírus Dengue no PRNT. Entretanto, não foi citado o risco de perda de confidencialidade das amostras e o que fazer para minimizá-la.

Quanto aos benefícios da pesquisa, é citado que o vírus reporter pode auxiliar o diagnóstico sorológico diferencial de arboviroses, e conseqüentemente, o entendimento do impacto no perfil sorológico que a introdução e remergência de flavivírus, como VZIK e VDEN, causam em áreas endêmicas como o Brasil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de grande relevância científica, a pesquisadora respondeu que não se trata de estudo internacional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram contemplados.

Recomendações:

DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2237

Fax: (91)3214-2233

E-mail: cep@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 3.601.702

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 466/12 Publicada no DOU nº 12, 13 de junho de 2013 – Seção 1 – Página 59 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

PROJETOS COM MAIS DE TRÊS ANOS

1. Deverá ser encaminhado relatório semestral e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

PROJETOS COM MENOS DE TRÊS ANOS

1. Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma proposta.

Considerações Finais a critério do CEP:

DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS

Conforme Res. CNS 466/12, a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais da pesquisa. Nesse sentido, ressaltamos as seguintes atribuições do pesquisador:

1. Apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa;
2. Desenvolver o projeto conforme delineado;
3. Elaborar e apresentar os relatórios parcial (is) e final;
4. Apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
5. Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda responsabilidade, por um período de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa;
6. Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
7. Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2237

Fax: (91)3214-2233

E-mail: cep@ec.pa.gov.br

**INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS**



Continuação do Parecer: 3.601.702

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1252599.pdf	26/06/2019 05:51:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Brochura_Investigador.pdf	26/06/2019 05:40:11	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Certificado_de_aprovacao_CEUA.pdf	23/06/2019 22:37:42	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Regulamento_para_Biorrepositorios.pdf	05/02/2019 12:42:50	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	TCLE_Biobanco.pdf	05/02/2019 12:35:43	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Declaracao_de_Anuencia.pdf	05/02/2019 12:34:06	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia.pdf	05/02/2019 12:33:42	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	05/02/2019 12:31:17	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANANINDEUA, 26 de Setembro de 2019

Assinado por:
Arnaldo Jorge Martins Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2237

Fax: (91)3214-2233

E-mail: cep@iec.pa.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS EM CASOS DE DOENÇA NEUROINVASIVA EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO NO ESTADO DO PARÁ

Pesquisador: DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56449722.3.0000.0019

Instituição Proponente: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Patrocinador Principal: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.461.824

Apresentação do Projeto:

Este projeto trata-se de um estudo retrospectivo que irá realizar a investigação de arbovírus como agentes etiológicos em casos suspeitos de doença neuroinvasiva em um Hospital Universitário de referência no diagnóstico de doenças infecciosas no Estado do Pará. Para isso, amostras de LCR encaminhadas à Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) para análise bioquímica e citológica com diagnóstico negativo para infecção bacteriana ou fúngica serão submetidas aos testes de RT-PCR, IH, ELISA para avaliação laboratorial de arbovírus. As amostras negativas para arbovírus serão submetidas a investigação metagenômica. Os soros oriundos desses casos suspeitos também serão testados. Serão incluídas nesse estudo, amostras que foram encaminhadas ao laboratório e que se encontram retidas na ULAC desde janeiro/2022, e a seleção dessas amostras ocorrerá a partir de agosto de 2022 podendo chegar até agosto de 2023, tempo estipulado para se alcançar as 1500 amostras previstas na pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

- Realizar a investigação de arbovírus como agentes etiológicos em casos suspeitos de doença neuroinvasiva de pacientes atendidos em Hospital Universitário Referência em Diagnóstico de Doenças Infecciosas no Estado no Pará.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

UF: PA

Município: ANANINDEUA

CEP: 67.030-000

Telefone: (91)3214-2165

E-mail: cep@iec.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 5.461.824

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Investigar laboratorialmente a etiologia das infecções virais em LCR e/ou soro de pacientes com doença neuroinvasiva; - Realizar diagnóstico laboratorial confirmatório (sorológico e/ou virológico) para casos suspeitos de doença neuroinvasiva causada por arbovírus; - Relacionar os achados bioquímicos e citológicos de amostras de LCR com resultados obtidos a partir do diagnóstico confirmatório (sorológico e/ou virológico); 12- Analisar a prevalência das doenças neuroinvasiva de etiologia viral Hospital Universitário Referência em Diagnóstico de Doenças Infecciosas no Estado no Pará;- Propor um fluxograma para a ULAC -HUJBB de encaminhamento de diagnóstico de doença neuroinvasiva de etiologia viral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

-As amostras dos pacientes serão identificadas por numeração referente ao pedido do exame solicitado que é gerado no momento do cadastro inicial na ULAC. Essa numeração será utilizada para orientar a identificação das amostras durante a execução dos testes. As informações como nome e endereço do paciente serão acessadas com o objetivo apenas para auxiliar a coleta de dados como gênero, idade e origem urbana ou rural do paciente. Nas quais, apenas um integrante da pesquisa que possua senha individual ao sistema de acesso restrito do laboratório terá acesso. Esse integrante terá que assinar o termo de confidencialidade e sigilo referente a essas informações. Durante a divulgação dos resultados da pesquisa, as informações iniciais e e produzidas na forma de dados previamente tratados, sem qualquer forma de identificação do paciente.Os integrantes clínicos-técnicos da pesquisa utilizarão os devidos equipamentos de proteção individuais (EPIs) e coletivos (EPCs) e seguirão as boas práticas de biossegurança durante a manipulação de amostras de LCR e soros durante a realização do diagnóstico laboratorial.

BENEFÍCIOS

- A pesquisa pretende contribuir para o fortalecimento da vigilância epidemiológica das doenças neuroinvasivas, sobretudo as de etiologia viral. Os dados gerados serão divulgados por meio de artigos científicos em revistas de relevância nacional e internacional, conseqüentemente, de

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2165

E-mail: cep@iec.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 5.461.824

elaborar o documento de tese; Além de realizar palestras como forma de divulgar os resultados do trabalho, afim de sensibilizar os atores do processo para envio de amostra aos laboratórios da rede regional/nacional de diagnóstico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Esta Pesquisa está bem fundamentada no ponto de vista científico com objetivos factíveis, que visa contribuir para o esclarecimento laboratorial das doenças infecciosas que atingem o sistema nervoso, fortalecendo a vigilância epidemiológica das doenças neuroinvasivas por arbovírus.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- vide campo de conclusões ou pendências e lista de inadequações.

Recomendações:

1. Recomenda-se que a pesquisadora responsável pela pesquisa inclua as informações descritas no documento CARTA_RESPOSTA_CEP.pdf de 18/05/2022 tanto nas informações básicas do projeto quanto no projeto original.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Ajustar no formulário do biorrepositório o responsável pelo gerenciamento do material Biológico Humano armazenado neste Biorrepositório, uma vez que esta função cabe ao pesquisador responsável (Resolução 441 de 12/05/2011 e Resolução 466 de 12/12/2012).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Argumentar e fundamentar a justificativa para a dispensa do TCLE atentando para a Resolução 466 de 12/12/2012, item IV).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Esclarecer qual o período de coleta das 1.500 amostras (LCR/soro) que serão utilizadas no projeto, uma vez que nas informações básicas do projeto - Plataforma Brasil não está claro esse período, nem no item critério de inclusão ,metodologia e nem desenho do estudo, e essa informação é importante para a análise da dispensa do TCLE e outros aspectos éticos do projeto.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2165

E-mail: cep@iec.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 5.461.824

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n.º 466, de 2012, e na Norma Operacional n.º 001, de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Carta_Resposta_CEP_IEC.pdf	18/05/2022 10:18:16	Joyce Favacho Cardoso Nogueira	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1854940.pdf	29/04/2022 06:00:18		Aceito
Outros	TCLE.pdf	29/04/2022 05:56:42	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_CEP.pdf	29/04/2022 05:56:06	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	Formulario_Biorrepositorio_II.pdf	29/04/2022 05:53:53	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	CRONOGRAMA.pdf	29/04/2022 05:52:56	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	Declaracao_anuencia_Secao.pdf	06/03/2022 23:20:23	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Birrepositorio_parteIII_.pdf	06/03/2022 23:18:43	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Outros	Biorrepositorio_parte_I_.pdf	06/03/2022 23:17:27	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_INVESTIGACAO_ETIOLOGICA_DE_DOENCA_NEUROINVASIVA.pdf	06/03/2022 23:17:01	DANIELE BARBOSA DE ALMEIDA MEDEIROS	Aceito
Declaração de concordância	declaracao_concordancia_2022.pdf	04/03/2022 14:54:50	CRISTINA SANCHES	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Solicitacao_de_mudanca_de_Pesquisador_responsavel.pdf	16/02/2022 00:18:09	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	17_DECLARACAO_DE_ISENCAO_ONUS_FINANCEIRO.pdf	05/02/2022 22:23:55	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	16_DECLARACAO_DE_INSTITUICAO_	05/02/2022	JANNYCE GUEDES	Aceito

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2165

E-mail: cep@ec.gov.br

INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS/IEC/SVS/MS



Continuação do Parecer: 5.461.824

Outros	OPARTICIPANTE.pdf	22:23:29	DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	15_TERMOS_CONSENTIMENTO_UTILIZACAO_DADOS.pdf	05/02/2022 22:22:57	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	11_DECLARACAO_DE_RESPONSABILIDADE.pdf	05/02/2022 22:20:15	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	10_CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO.pdf	05/02/2022 22:19:34	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	9_CURRICULO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	05/02/2022 22:17:52	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	8_FICHA_DE_CADASTRO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	05/02/2022 22:15:21	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	7_CURRICULO_PESQUISADOR_PRINCIPAL.pdf	05/02/2022 22:14:37	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	6_FICHA_DE_CADASTRO_PESQUISADOR_PRINCIPAL.pdf	05/02/2022 22:12:47	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Outros	5_FICHA_DE_REQUERIMENTO.pdf	05/02/2022 22:11:54	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Orçamento	4_ORCAMENTO.pdf	05/02/2022 22:05:36	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito
Folha de Rosto	2_FOLHA_DE_ROSTO.pdf	05/02/2022 21:58:19	JANNYCE GUEDES DA COSTA NUNES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ANANINDEUA, 10 de Junho de 2022

Assinado por:

Arnaldo Jorge Martins Filho
(Coordenador(a))

Endereço: Rodovia BR-316, Km 07, S/N

Bairro: Levilândia

CEP: 67.030-000

UF: PA

Município: ANANINDEUA

Telefone: (91)3214-2165

E-mail: cep@iec.gov.br

9. ANEXO 2

Quadro 13. Tabela de contingência

Teste Avaliado	Teste de Referência		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	Verdadeiros positivos (a)	Falsos positivos (b)	a+b
Negativo	Falsos negativos (c)	Verdadeiros negativos (d)	c+d
Total	a+c	b+d	N

Fonte: adaptado de Ayres et al (2007).

Quadro 14. Quadro demonstrando os conceitos e fórmulas dos valores estatísticos que foram calculados.

Valor estatístico	Conceito	Fórmula
Sensibilidade	Capacidade de detectar a doença quando de fato está presente.	$S = \frac{a}{a + c}$
Especificidade	Avalia a capacidade do teste ser negativo na ausência de doença.	$E = \frac{d}{b + d}$
Valor Preditivo Positivo	É a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo.	$VPP = \frac{a}{a + b}$
Valor Preditivo Negativo	Proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo.	$VPN = \frac{d}{c + d}$
Acurácia	Proporção de acertos de um teste diagnóstico.	$A = \frac{a + d}{a + b + c + d}$