

DEBORAH DE FARIAS GUIMARÃES

Desenvolvimento e padronização de ensaio imunoenzimático
para detecção de anticorpos contra os vírus do Oeste do Nilo e
da encefalite de São Luís.

Recife/PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Desenvolvimento e padronização de ensaio imunoenzimático
para detecção de anticorpos contra os vírus do Oeste do Nilo e
da encefalite de São Luís.

Deborah de Farias Guimarães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Laura Helena Vega G. Gil

Coorientadora: Dra. Amanda Gomes de Oliveira
Carvalho

Recife/PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Desenvolvimento e padronização de ensaio imunoenzimático
para detecção de anticorpos contra os vírus do Oeste do Nilo e
da encefalite de São Luís.

Dissertação de Mestrado elaborada por:

DEBORAH DE FARIAS GUIMARÃES

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Orientadora – Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Prof. Dr. Fabricio Bezerra de Sá
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE)

Dr. Renato Antônio dos Santos Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Dr. Edmilson Ferreira de Oliveira Filho
Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE)

Dedico este trabalho ao meu pai, Valter Guimarães, por todo amor e carinho.

Agradecimentos

Aos meu pais, por todo apoio e encorajamento em todos os momento da minha vida.

À minha querida orientadora, Dra. Laura Gil, pela confiança, incansável incentivo e por todos os ensinamentos.

À melhor coorientadora do mundo, Dra. Amanda Carvalho, por tudo que me ensinou esses anos, pela amizade, carinho e muito amor.

À minha amigas, Bruna, Janaina, Kennya e Tamisa por estarem presentes em todos os momentos, por todas as conversas e todo incentivo do mundo.

À minha amiga Juliana Gonçales por permanecer sempre perto e disposta a qualquer coisa para ajudar.

Aos meus amigos do Team LGil, Valter, Fábila, Kennya, Amanda, Carol e Juliana por demonstrar que trabalhando em equipe tudo fica mais fácil.

À Danilo e Fernando pelos momentos de descontração nos intervalos.

À Renato, Edmilson e Ricardo por tornar qualquer café o melhor do mundo e por todo carinho.

À todos os meus amigos do LaViTE, por todas as experiências trocadas e por deixar os dias de trabalho mais alegres.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,

muito obrigada!!!!

“Is there anyone so wise as to learn by the experience of others?”

(Voltaire)

RESUMO

O gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, compreende algumas das arboviroses mais importantes para saúde pública, causadoras de doenças em humanos e animais. Alguns membros desta família, como por exemplo, o vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus*, WNV) e vírus da encefalite São Luís (*Saint Louis encephalitis virus*, SLEV) estão relacionados antígenicamente, o que significa que além de desenvolverem sintomatologia bastante parecida, o seu diagnóstico sorológico pode apresentar reação cruzada com outros flavivírus presentes na mesma área geográfica. Dessa forma, percebe-se a urgência de uma plataforma de diagnóstico sorológico diferencial entre as arboviroses anteriormente citadas. Dentre as metodologias atuais, o ELISA é o mais utilizado em flavivírus, com posterior confirmação por teste sorológico ouro, o ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT). Diante disso, o presente trabalho objetivou a construção de uma plataforma de diagnóstico imunoenzimático diferencial para WNV e SLEV, através do ELISA de bloqueio e realizar uma comparação com a metodologia do ELISA de captura utilizando as mesmas amostras. Com isso, analisou-se 155 amostras de soros de equinos do Estado de Pernambuco para o WNV e SLEV por ELISA de bloqueio, resultando em 149 e 132 amostras positivas, respectivamente. Todas as amostras foram testadas por PRNT₇₅ para validação dos resultados do ELISA, identificando neste teste 31 amostras positivas para WNV e 21 para SLEV. Demonstrando que a plataforma de triagem sorológica em larga escala, desenvolvida neste trabalho, é eficiente para as avaliações epidemiológicas e monitoramento de flavivírus no território brasileiro.

Palavras-chave: Flavivirus, Diagnóstico, ELISA

ABSTRACT

The flavivirus genus (family *Flaviviridae*) comprises some of the most relevant arboviruses for public health, that can cause disease in humans and animals. Some members of this Family such West Nile virus (WNV) and Saint Louis Encephalitis virus (SLEV) are antigenically related. They develop similar symptoms and their serological diagnosis may show cross reaction with other Flavivirus, present in the same geographical area. In this context, the establishment of a platform for differential serological diagnosis in these arboviruses, is crucial. Among other methodologies, the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most used technique for flavivirus diagnosis, with subsequent confirmation by plaque reduction neutralization test (PRNT). Thus, the present work aimed to develop a differential immunoassay diagnostic platform for WNV and SLEV, using their structural proteins as antigens, derived from viral chimeras YFV-17D-WNV-3M and YFV-17D-SLEV respectively, previously constructed in our research group (Department of Virology, Fiocruz / PE). We analyzed 155 samples of equine sera from the state of Pernambuco-Brazil, for WNV and SLEV by blocking ELISA technique, resulting in 149 and 132 positive samples among them, respectively. All samples were tested by PRNT₇₅ for validating the results of ELISA confirming 31 positive samples for WNV and 20 for SLEV. These results demonstrated that the platform of large-scale serological screening developed in this work is effective and has the potential use for evaluation of sera, from different species of flavivirus in Brazil.

Key words: Flavivirus, Diagnosis, ELISA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Genoma dos flavivírus e organização das proteínas virais	21
Figura 2 – Ciclo de transmissão dos flavivírus WNV e SLEV	26
Figura 3 – Distribuição mundial do vírus Oeste do Nilo demarcando suas linhagens	27
Figura 4 – Distribuição geográfica dos genótipos (I-VIII) do vírus da encefalite São Luiz pelo continente Americano	29
Figura 5 – Representação esquemática dos tipos de ELISA	32
Figura 6 – Representação de uma placa de PRNT	34
Figura 7 - Representação esquemática de flavivírus quiméricos	34
Figura 8 – Desenho esquemático do ELISA de bloqueio para a pesquisa de anticorpos contra o WNV e SLEV.	40
Figura 10 – Distribuição dos valores inibitórios do ELISA-IgG para os vírus SLEV e WNV	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de arboviroses conhecidas em cada família.	18
Tabela 2 – Associação entre o ELISA (IgG) de bloqueio e de captura para WNV.	42
Tabela 3 – Valores inibitórios do ELISA-IgG para SLEV e WNV em relação aos valores de PRNT para SLEV, WNV.	42
Tabela 4 – Positividade do Elisa de bloqueio e PRNT₇₅ para WNV e SLEV em equinos de Pernambuco	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	micrograma (10 ⁻⁶ gramas)
µL	microlitro (10 ⁻⁶ litros)
3'	Três linha
5'	Cinco linha
Kb	Kilobase
kDa	KiloDálon
mg	miligrama (10 ⁻³ gramas)
°C	Graus Celsius
α	Alfa
pb	Pares de bases
DENV	Vírus dengue (<i>dengue virus</i>)
DMSO	dimetil-sulfóxido (<i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E	Proteína estrutural do Envelope
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ILHV	Vírus Ilhéus (<i>Ilheus virus</i>)
M	Proteína estrutural da Membrana
MEM	Meio essencial mínimo (<i>minimum essential medium</i>)
NB	Nível de Biossegurança
NTP	Nucleotídeo Trifosfato
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas (<i>plaque reduction neutralization test</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
ROCV	Vírus Rocio (Rocio vírus)
SLEV	Saint Louis Encephalitis vírus (Vírus da encefalite São Luis)

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Arbovírus	17
3.2. Flavivirus	19
3.3. Biologia molecular dos flavivírus	20
3.4. Proteínas estruturais	21
3.4.1. Proteína do capsídeo (C)	21
3.4.2. Proteína de membrana (prM/M)	21
3.4.3. Proteína do envelope (E)	22
3.5. Proteínas não-estruturais	22
3.5.1. NS1	22
3.5.2. NS2A e NS2B	22
3.5.3. NS3	23
3.5.4. NS4A e NS4B	23
3.5.5. NS5	23
3.6. Ciclo replicativo dos flavivírus	23
3.7. Aspectos epidemiológicos dos flavivírus	25
3.7.1. Vírus Oeste do Nilo	26
3.7.2. Vírus da encefalite São Luís	27
3.8. Diagnóstico diferencial para flavivírus	29
3.8.1. Vírus quiméricos como ferramenta de diagnóstico para flavivírus	33
4. Materiais e Métodos	35
4.1. Local de Realização da Pesquisa	35

4.2. Estabelecimento de protocolo de diagnóstico sorológico para WNV por meio de ELISA de bloqueio e confirmação por PRNT	35
4.2.1. Produção de antígenos em cultura de células	35
4.2.2. Padronização do ELISA de bloqueio para WNV	36
4.2.3. Condições padronizadas para ELISA de bloqueio	36
4.2.4. Soros testes do ELISA de bloqueio	38
4.2.5. Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT)	38
4.2.6. Análise estatística	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV e SLEV por meio de ELISA de bloqueio	40
5.1.1. Padronização do ELISA de bloqueio para WNV e SLEV	41
5.1.2. Comparação entre ELISA de bloqueio e ELISA de captura para pesquisa de IgG para WNV	41
5.2.3. Comparação do ELISA de bloqueio com PRNT ₇₅	46
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	51
8. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Flavivirus* apresenta alguns dos mais importantes patógenos de humanos e animais. Em meio a endemias e epidemias virais que acontecem devido à circulação sem controle desses vírus por meio de vetores e hospedeiros, é indispensável o conhecimento da biologia e o desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica segura para esses vírus. (Lindenbach e Rice, 2003a; Kalitzky e Borowski, 2013).

Devido ao fato dos flavivírus possuírem correlações antigênicas, isto pode provocar reação cruzada no momento do diagnóstico sorológico. O diagnóstico sorológico geralmente é realizado pelo teste imunoenzimático (ELISA), responsável pela triagem em larga escala, porém necessita ser posteriormente confirmado através do teste de neutralização por redução de placas (PRNT), ensaio ouro, para excluir as reações cruzadas, confirmando a positividade e especificidade do teste. Esse ensaio, em contra partida necessita da utilização de vírus vivos e alguns flavivírus são manipulados em nível de biossegurança (NB) 3, o que dificulta a manipulação dessas amostras em laboratórios com pouco recurso financeiro (Pauvolid-Correa *et al.*, 2010; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011; Heinz e Stiasny, 2012; Pauvolid-Correa *et al.*, 2014). Como alternativa, a construção e utilização de flavivírus quiméricos consegue superar esse problema, já que há a redução do nível de biossegurança devido à atenuação viral, possibilitando a manipulação desses vírus em laboratórios com NB2 (Carvalho, 2015).

Com base na dificuldade da realização do ensaio de neutralização, se torna necessário que o teste de triagem seja capaz de prover um resultado mais preciso, além de possuir um método simples e de baixo custo, fazendo com que o PRNT seja apenas utilizado para confirmação dos positivos. Assim, a técnica do ELISA de bloqueio está sendo cada vez mais utilizada para flavivírus, principalmente para o WNV e SLEV, demonstrando ser bastante sensível e tendo possibilidade de ser utilizada para diagnóstico em uma grande diversidade de espécies de vertebrados por não necessitar de anticorpos de captura.

Diante do que foi exposto, este trabalho teve por objetivo a padronização de um ELISA de bloqueio para os vírus WNV e SLEV para diagnóstico e triagem sorológica de equinos do Estado de Pernambuco.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver ferramenta para o uso em diagnóstico sorológico diferencial de flavivírus.

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico por ELISA de bloqueio para os vírus do Oeste do Nilo e da encefalite São Luís;
- Comparação entre os protocolos de ELISA de bloqueio e de captura;
- Comparação entre os resultados por ELISA de bloqueio e o PRNT₇₅ (padrão ouro).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Arbovírus

O termo arbovírus surgiu como abreviação das palavras “*arthropod borne viruses*” e se refere a um vírus transmitido por vetores artrópodes flebótomos para hospedeiros vertebrados (Gubler, 2001; Kuno e Chang, 2005). Seu modo de transmissão envolvendo vírus, vetor e vertebrado foi descrito pela Organização Mundial de Saúde (W.H.O., 1967), onde foi definido que além de participar da transmissão biológica, esses vírus replicam-se tanto em seu hospedeiro vertebrado quanto nos vetores artrópodes, garantindo assim, sua manutenção na natureza. Mais tarde, em 1985, foi adicionada a descrição de que ainda pode ocorrer transmissão transovariana e venérea em artrópodes (W.H.O., 1985), nestes casos se explicaria a conservação viral em períodos em que os vetores apresentam baixas atividades (Flores, 2007). Juntamente com esses casos, porém com um menor papel na disseminação viral, os vetores ainda podem ser reservatórios virais, tendo em vista que mosquitos hibernados podem apresentar o vírus e transmiti-lo posteriormente, como foi detectado nos estados americanos de Maryland e Pennsylvania, com mosquitos *Culex pipiens* portando o vírus da encefalite São Luís (*Saint Louis encephalitis virus* - SLEV) (Bailey *et al.*, 1978) e no Vale do Sacramento, Califórnia, vírus Oeste do Nilo (*West Nile virus* - WNV) (Bailey *et al.*, 1978; Nelms *et al.*, 2013).

Taxonomicamente, os arbovírus fazem parte de oito famílias e 14 gêneros, englobando 500 vírus (**Tabela 1**) (Gubler, 2001). Entre eles, os principais arbovírus relacionados com doenças em humanos e animais são: o YFV (yellow fever virus), JEV (japanese encephalitis virus), WNV (West Nile virus), SLEV (Saint Louis encephalitis virus), DENV (dengue virus) e ZIKV (zika virus) (Gubler, 2001).

Diversas espécies de artrópodes estão envolvidas como vetores na transmissão dos arbovírus e a distribuição de cada vírus está relacionada com a do vetor. Por exemplo, entre as famílias *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Flaviviridae*, os carrapatos são muito mais envolvidos na transmissão das duas primeiras famílias, já a terceira é mais transmitida por mosquitos flebótomos (Kuno e Chang, 2005; Huang *et al.*, 2014).

Tabela 1 – Número de arboviroses conhecidas em cada família.

Família	Número de gêneros	Número de vírus
<i>Bunyaviridae</i>	5	248
<i>Flaviviridae</i>	1	61
<i>Reoviridae</i>	2	77
<i>Rhabdoviridae</i>	2	68
<i>Togaviridae</i>	1	28
<i>Orthomyxoviridae</i>	1	3
<i>Arenaviridae</i>	1	1
<i>Poxiviridae</i>	1	1
Sem classificação	-	13
8 Famílias	14 gêneros	500 vírus

Fonte: Adaptado de Gubler, 2001.

Os mosquitos são vetores com ampla distribuição mundial e apresentam grande importância para a saúde pública. Esses artrópodes se tornam vetores virais no momento do repasto sanguíneo em vertebrados com elevada viremia ou através da transmissão vertical por passagens transovarianas. Os vírus ingeridos pelos mosquitos, durante o repasto, infectam o tubo digestivo e se replicam nas glândulas salivares, após um período de incubação, podendo os vetores transmiti-los para um novo hospedeiro durante toda sua vida, inclusive em baixas temperaturas (Cordellier e Degallier, 1992; Brooks *et al.*, 2000; Mlera *et al.*, 2014).

Quanto à transmissão de flavivírus, o homem e os animais domésticos são considerados hospedeiros terminais ou acidentais para a maior parte dos arbovírus, pois mesmo apresentando doença, sua viremia não é suficiente para infectar outro artrópode e continuar o ciclo. No entanto algumas arboviroses, como dengue e febre amarela, fazem o oposto, causam alta viremia em aves e com isto, possibilita a transmissão para o vetor. Apesar disso, essa transmissão depende de diversos fatores relacionados com densidade populacional, competência do vetor, umidade e temperatura do ambiente. Já em relação à sua disseminação, as aves migratórias possuem papel fundamental para algumas arboviroses, tornando-se a principal fonte de infecção do vetor, com isso são identificadas como hospedeiros introdutórios ou amplificadores. Isto possivelmente explicaria a introdução dos flavivírus SLEV e WNV nas Américas (Gubler, 2001; Lopes *et al.*, 2014; Pauvolid-Correa *et al.*, 2014).

O ecossistema brasileiro possui condições ideais para existência de diversas arboviroses devido à grande parte de seu território ser recoberto por florestas tropicais. Os arbovírus são mantidos por uma variedade de ciclos zoonóticos, existindo a possibilidade de humanos ou animais infectados, oriundos dessas regiões, serem introduzidos nas cidades próximas. Além de que, mudanças ecológicas causadas pelo homem, podem aumentar a prevalência e criar novos reservatórios de vetores (Gubler, 2001; Figueiredo, 2007; Lopes *et al.*, 2014).

3.2. Flavivirus

A família *Flaviviridae* inclui alguns dos patógenos virais que causam doenças graves e mortalidade em humanos e animais, sendo classificadas em quatro gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus* (Lindenbach *et al.*, 2007; Stapleton *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 50 espécies virais, e destas, 27 são arboviroses transmitidas por mosquitos. Esses vírus podem ser divididos em dois grandes grupos baseados em suas apresentações clínicas em humanos, ecologia e relação sorológica (Gubler *et al.*, 2007).

Os vírus que causam encefalites pertencem ao sorogrupo da encefalite Japonesa que é composto pelos vírus JEV, WNV, SLEV e o MVEV (*Murray Valley encephalitis virus*). Estes vírus são zoonóticos e apresentam ciclo envolvendo aves como hospedeiros naturais e o mosquito da espécie *Culex* como principal vetor (Kuno e Chang, 2005; Lindenbach *et al.*, 2007).

O segundo grupo é formado por vírus que podem desenvolver febre hemorrágica, como o YFV e o DENV. Este grupo possui como hospedeiros humanos e primatas não humanos, e o mosquito *Aedes*, como principal vetor (Gubler *et al.*, 2007).

Dentro do gênero, os vírus também podem ser classificados em três grupos definidos com base no modo de transmissão viral, sendo por: carrapatos, mosquitos e vetores não conhecidos. Além dos grupos, os vírus ainda podem ser classificados em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, em classes, espécies e de acordo com sua filogenia molecular. Esses vírus são distribuídos nos seis continentes, sendo responsáveis por causar endemias e epidemias todos os anos (Lindenbach *et al.*, 2007).

3.3. Biologia molecular dos flavivírus

Os membros que fazem parte do gênero *Flavivirus*, possuem partículas com aproximadamente 50 nm de diâmetro e sua superfície contém duas proteínas virais: envelope (E) e membrana (M). A glicoproteína E é o maior determinante antigênico da partícula viral e possui atividade mediadora na adsorção e fusão durante a entrada do vírus na célula. Já a proteína M, é um fragmento proteolítico do seu precursor, a proteína pré-membrana (prM), sendo produzida durante a maturação da partícula viral (Lindenbach e Rice, 2003a; Lindenbach *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). Interações heterodiméricas entre estas duas proteínas são responsáveis pelo correto dobramento conformacional do envelope e prevenção da fusão prematura dos vírions durante o processo secretório, ocorrendo a clivagem, pela furina do hospedeiro, nos estágios finais de secreção, promovendo a infectividade da progênie viral (Roby *et al.*, 2015)

Possui um capsídeo (C) de simetria icosaédrica que envolve o genoma viral, o qual é constituído por um RNA de fita simples com cerca de 11 kb de tamanho, polaridade positiva, uma estrutura cap na sua região 5' e uma região 3' não poliadenilada. A proteína C interage com o RNA viral formando a estrutura do nucleocapsídeo, que pode ser discretamente identificado ao remover o envelope lipídico com detergente não iônico. Possui ainda, uma única e longa sequência aberta de leitura (*Open Reading Frame* - ORF) de aproximadamente 10 kb, que codifica proteínas, franqueada por regiões não codificantes (UTR) nas extremidades 5' e 3'. A tradução desta ORF produz uma longa poliproteína que é clivada em cerca de 10 proteínas, sendo essas, três estruturais (E, prM e C) para formação do vírion e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), responsáveis por atividades de replicação, virulência e patogenicidade (Lindenbach *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

A poliproteína viral possui domínios transmembrana que determinam se a proteína após clivagem será locada no citoplasma ou no lúmen do retículo endoplasmático (RE). As proteínas C, NS3 e NS5 podem ser encontradas no citoplasma, enquanto que prM, E e NS1 serão locadas no lúmen do RE (**Figura 1**) (Brinton, 2014).

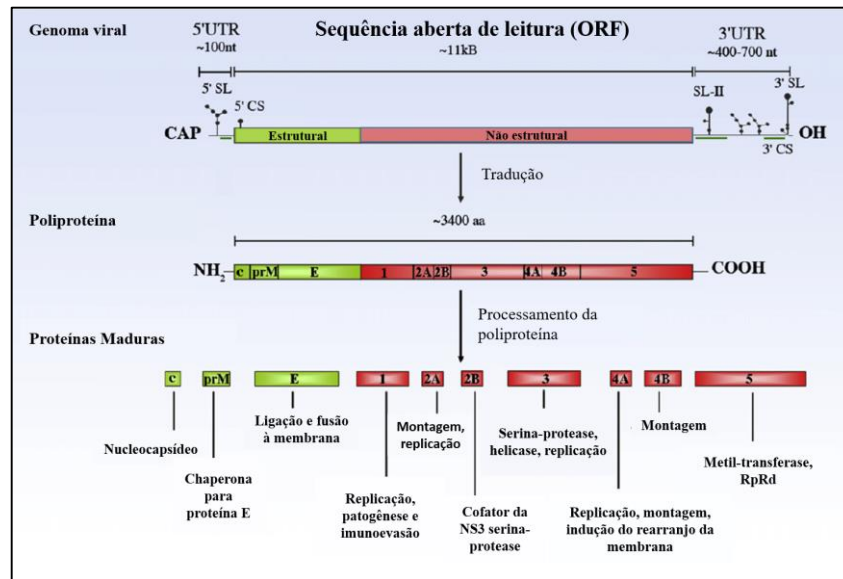


Figura 1 – Genoma dos flavívirus e organização das proteínas virais

Fonte: Adaptado de Fernandez-Garcia *et al.*, 2009

3.4. Proteínas estruturais

As proteínas C, prM e E formam a estrutura da partícula viral e apresentam uma sequência C-terminal hidrofóbica que é responsável pela ligação à membrana celular e pelo direcionamento da poliproteína ao lúmen do retículo endoplasmático (Lindenbach *et al.*, 2007).

3.4.1. Proteína do capsídeo (C)

A proteína C apresenta um peso molecular de cerca de 11 kDa e é altamente básica, devido a isso consegue interagir com o RNA viral formando o nucleocapsídeo. Possui ainda um domínio hidrofóbico conservado em sua região C-terminal que é uma sequência sinal para translocação da proteína prM ao RE (Lindenbach e Rice, 2003a; Kalitzky e Borowski, 2013).

3.4.2. Proteína de membrana (prM/M)

A glicoproteína prM (26 kDa) é precursora da proteína M (8 kDa) e possui um domínio transmembrana na porção C-terminal que indica translocação para o RE. Essa proteína contém ainda sítios de glicosilação na sua região N-terminal, além de resíduos de cisteína o que favorece a formação de pontes de dissulfeto. A proteína prM forma complexos com a proteína E e impede que o envelope sofra ação catalizadora em meios ácidos, como no momento do transporte da partícula viral em compartimentos acidificados. Durante a liberação da partícula

viral acontece a clivagem de prM em M por enzimas furinas da célula hospedeira no complexo de Golgi (Lindenbach *et al.*, 2007; Kalitzky e Borowski, 2013).

3.4.3. Proteína do envelope (E)

O envelope viral é a maior proteína da superfície da partícula viral, apresentando cerca de 53 kDa e é considerado um importante determinante antigênico viral. Compreende atividades como hemaglutinação de eritrócitos, indução de anticorpos neutralizantes, além de mediar a ligação da partícula viral a receptores de superfície celular e a fusão com a membrana plasmática. Após sua síntese, forma um heterodímero com a proteína prM, a qual se mostra como uma chaperona com o objetivo de evitar que a proteína E seja clivada prematuramente durante o processo de maturação da partícula viral (Lindenbach *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2012).

3.5. Proteínas não-estruturais

Estas sete proteínas possuem importantes funções relacionadas com replicação viral.

3.5.1. NS1

A glicoproteína NS1 possui 39 a 41 kDa e apresenta três sítios conservados de glicosilação e doze resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto, essencial para viabilidade viral (Kleinschmidt-Demasters e Beckham, 2015). Pode ser encontrada intracelular ou na superfície da célula na forma de dímeros, além de secretada para o fluido extracelular em mamíferos, mas não em insetos. A translocação da NS1 para o RE acontece devido à sequência sinal localizada na região C-terminal da proteína E. Estudos demonstraram que uma mutação no sítio de glicosilação do YFV resultou em uma drástica diminuição nos níveis da replicação do genoma viral, sugerindo, então, o seu papel tanto na replicação como na patogênese viral (Lindenbach *et al.*, 2007; Kalitzky e Borowski, 2013; Brinton, 2014).

3.5.2. NS2A e NS2B

A NS2A é uma proteína hidrofóbica com 24 kDa, que possui um sítio de clivagem adicional dependente de serina protease, que resulta na liberação do C-terminal. Muito embora não tenha uma função bem definida, acredita-se que esta proteína atue no processamento da NS1 e na replicação viral (Kalitzky e Borowski, 2013). A NS2B (14 kDa) forma um complexo

estável com NS3 e interage com o domínio protease da NS3 na região C-terminal, e funcionando como um cofator (Lindenbach e Rice, 2003a; Brinton, 2014)

3.5.3. NS3

A NS3 possui peso molecular de aproximadamente 70 kDa e realiza diversas funções enzimáticas, como serina protease, NTPase e RNA helicase. Sua região N-terminal apresenta resíduos que tem atividade de serina protease apenas quando associado com a proteína NS2B. Já as atividades de NTPase e RNA helicase, importantes para replicação viral, são demonstradas na porção C-terminal, além de estar envolvida com a formação da estrutura *cap* na região 5' (Lindenbach e Rice, 2003b; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

3.5.4. NS4A e NS4B

As proteínas NS4A e NS4B (peso molecular de 16 kDa e 28 kDa, respectivamente) ainda não estão bem caracterizadas, mas estudos indicaram que existe uma interação entre NS4A e NS1 que pode estar relacionada à replicação viral. A proteína NS4B também parece estar envolvida na replicação viral (Lindenbach e Rice, 2003a; Lindenbach *et al.*, 2007; Brinton, 2014).

3.5.5. NS5

A NS5 é a maior e mais conservada proteína dos flavivírus, possui peso molecular de 104 a 106 kDa e apresenta o motivo ácido aspártico glicina-glicina (Gly-Gly-Asp - GDD), o qual é encontrado em todas as RNA polimerases dependentes de RNA (RpRd). Possui ainda, na região N-terminal, uma sequência homóloga de metil-transferase que provavelmente está relacionada à metilação da estrutura 5' cap (Brinton, 2014; Brinton e Basu, 2015).

3.6. Ciclo replicativo dos flavivírus

Para iniciar o mecanismo de replicação, há uma interação da glicoproteína E viral com receptores de membrana da célula hospedeira, promovendo a internalização via endocitose. Para liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, então, é necessária a acidificação desse endossomo. Devido ao baixo pH apresentado pela vesícula, há uma indução à uma mudança conformacional no envelope, gerando a fusão entre vírus e membrana endossomal (Heinz e Allison, 2001; Edgil *et al.*, 2003; Lindenbach e Rice, 2003a; Gubler *et al.*, 2007). A eficiência

do processo de fusão pode ser aumentada ou inibida dependendo de certos lipídeos que compõe a membrana alvo, como o colesterol e a lisofosfatidilcolina, respectivamente (Stiasny *et al.*, 2003; Stiasny e Heinz, 2004).

Após a liberação do genoma viral no citosol o processo de tradução é iniciado a partir da estrutura *cap* na extremidade 5', em um mecanismo comum ao mRNA da célula hospedeira, resultando em uma longa poliproteína. Sequencialmente à tradução, acontece a clivagem da poliproteína por proteases virais e do hospedeiro, que resulta em 10 proteínas clivadas. Essas proteínas serão utilizadas nos processos de replicação e formação de novas partículas virais (Flores, 2007; Brinton, 2014).

Durante este período existe uma utilização alternada do genoma viral para a tradução do mRNA e para a síntese de RNA de cadeia negativa. A síntese de RNA de cadeia negativa é realizada após o genoma viral se apresentar de forma circular e para que isso ocorra duas regiões conservadas da extremidade 3'UTR precisam ser reconhecidas e são responsáveis por aproximar as extremidades 5' e 3', já para a tradução, o genoma deve estar linear. A síntese e processamento da poliproteína viral são interrompidos após a ligação da RNA polimerase-RNA dependente (RpRd) a uma estrutura secundária (*stem loop*) presente na extremidade 5' UTR. Esta replicase utiliza o mesmo RNA positivo, que foi molde para síntese proteica, na transcrição de um RNA complementar de polaridade negativa (Alvarez *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008; Brinton, 2014; Brinton e Basu, 2015).

Porém, a síntese de RNA viral é assimétrica, pois existe um acúmulo de cerca de 10 vezes o número de fitas de RNA positivas em relação às negativas. Essas fitas positivas tanto podem ser utilizadas em um novo ciclo de tradução quanto para serem empacotadas pelas proteínas estruturais, neste último caso, elas são endereçadas ao RE, onde serão processadas para formação de novas partículas virais. Após o processamento, as partículas sofrem maturação no complexo de Golgi, momento em que a proteína prM é clivada em M por enzimas furinas. Na fase de montagem, somente os RNAs de cadeia positiva poderão ser empacotados em novas partículas virais, com posterior liberação da partícula viral por exocitose através da membrana celular (Lindenbach e Rice, 2003a; Santos *et al.*, 2008; Brinton, 2014; Fernández *et al.*, 2014).

3.7. Aspectos epidemiológicos dos flavivírus

Ao todo, os flavivírus afetam milhares de pessoas todos os anos, apesar disso, não existem vacinas para um número restrito de flavivírus, e em sua maior parte, não há medidas profiláticas adequadas (Apte-Sengupta *et al.*, 2014).

A distribuição de forma geográfica dos flavivírus se apresenta bastante dinâmica, o que permite a incidência da doença de forma rápida. Um exemplo disto, foi a rápida dispersão do WNV por todo o território dos Estados Unidos em uma faixa de tempo de apenas 4 anos, logo após a sua introdução em 1999 (Lindenbach *et al.*, 2007). A propagação viral também está intimamente relacionada às atividades humanas de translocações. Isto é evidenciado na introdução de diversos flavivírus a novos ambientes, que antes apenas eram endêmicos no continente africano. Nas Américas, esta introdução se deu durante o processo de tráfico de escravos através de pessoas ou mosquitos infectados nos navios (Petersen e Marfin, 2005; Gubler *et al.*, 2007; Lindenbach *et al.*, 2007).

A infecção causada por flavivírus pode ser assintomática ou apresentar uma sintomatologia que agrega a maior parte das viroses deste gênero, iniciando com febre, dor de cabeça, mialgia, fadiga e artralgia. Os vírus que contemplam o sorogrupo das encefalites podem apresentar, além dos sintomas dispostos anteriormente, encefalite e meningite. Porém, neste último caso, apenas cerca de 1% dos infectados apresentam doença neurológica (Petersen *et al.*, 2013; Winkelmann *et al.*, 2016).

Os flavivírus como WNV e SLEV, são mantidos na natureza por transmissão mosquito-ave em um ciclo enzoótico/silvático. As aves desenvolvem alta viremia e, com isso, possuem capacidade de infectar outros mosquitos flebótomos (*Culex*). Além desse tipo de transmissão, os mosquitos podem ser infectados verticalmente, e os pássaros, por via fecal-oral. Os mosquitos também podem infectar equinos e humanos em uma transmissão acidental/terminal, pois estes não produzem viremia suficiente para infectar outros mosquitos. Entre os humanos esses vírus ainda podem ser transmitidos via transplantes ou transfusões sanguíneas (**Figura 2**) (Colpitts *et al.*, 2012; Chancey *et al.*, 2015).

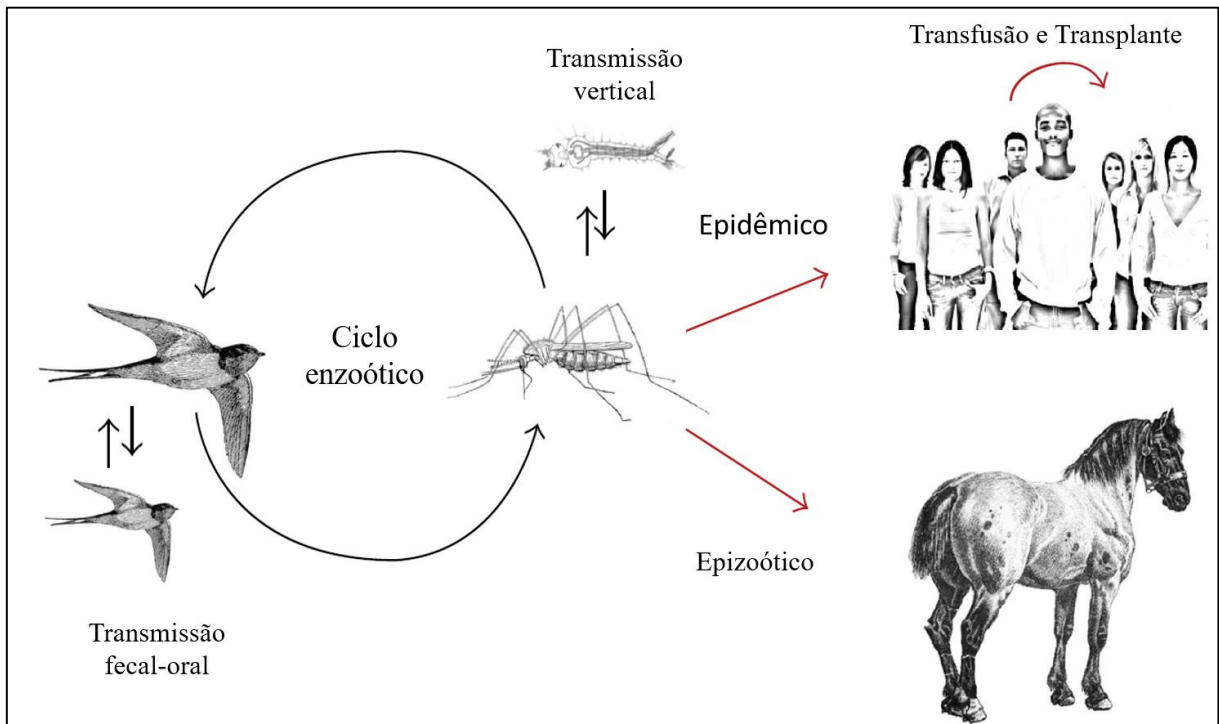


Figura 2 – Ciclo de transmissão dos flavivírus WNV e SLEV.

Fonte: Adaptado de Chancey *et al.*, 2015.

3.7.1. Vírus Oeste do Nilo

O WNV foi isolado pela primeira vez em 1937, a partir de um paciente febril no distrito de West Nile, Uganda. Mais tarde o vírus foi detectado ao longo da África, Ásia e Europa em episódios esporádicos, apenas demonstrando síndrome febril (Pauvolid-Correa *et al.*, 2011; Kalitzky e Borowski, 2013). Contudo, em meados de 1990 houve a maior epidemia de WNV na Europa com apresentações de doença neurológica em humanos e animais caracterizando um grave problema de saúde pública. Já no final da década de 90, mais propriamente em 1999, o vírus foi detectado em Nova York causando encefalite em humanos, equinos e uma extensiva morte de aves (Soares *et al.*, 2010; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011) e desde que se tornou emergente, vem causando anualmente inúmeros casos de doença e óbitos em humanos, sendo os casos reportados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - EUA) (Borisevich *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2013). Essa epidemia também evidenciou as aves migratórias como importantes disseminadores do vírus pelos continentes (Ebel *et al.*, 2002).

O WNV possui cinco linhagens, porém apenas a primeira, a segunda e a quinta estão associadas à doença em humanos e infecções zoonóticas (May *et al.*, 2011) (**Figura 3**). A segunda linhagem se restringe a infecções na África e se diferencia por mutações nas sequências

codificantes de alguns aminoácidos da proteína envelope viral (Brinton, 2014). Embora o WNV esteja amplamente distribuído e causando infecções por todo o mundo, apenas nos EUA e em Israel ocorreu mortalidade (Guharoy *et al.*, 2004). No Brasil, já foi identificado sorologia positiva em equinos (Pauvolid-Correa *et al.*, 2011) e galinhas na região do Pantanal (Melandri *et al.*, 2012), em equinos no Mato Grosso do Sul e Paraíba (Silva *et al.*, 2013) e um caso confirmado em humano no Estado do Piauí (Vieira *et al.*, 2015).

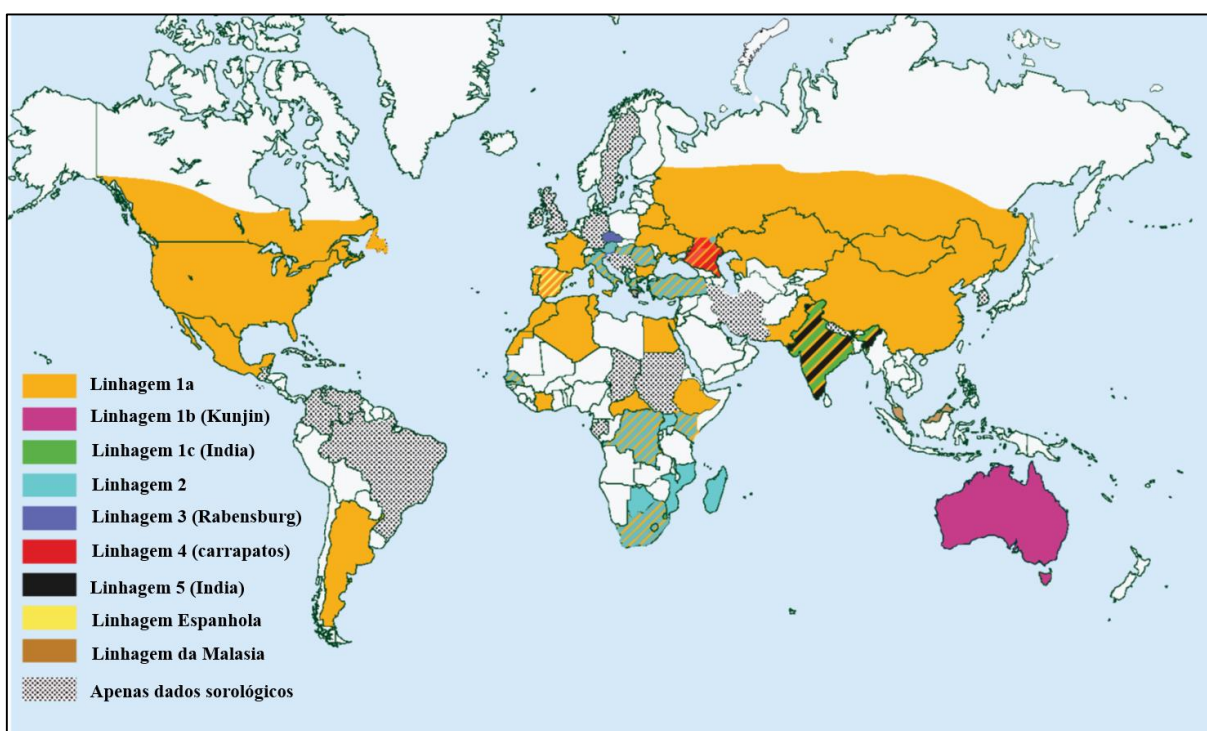


Figura 3 – Distribuição mundial do vírus Oeste do Nilo demarcando suas linhagens.

Fonte: Adaptado de Ciota e Kramer, 2013.

3.7.2. Vírus da encefalite São Luís

O SLEV é transmitido através do mosquito *Culex* e a epidemia deste vírus está intimamente associada à geografia e distribuição do vetor. Apesar de divergências quanto a sua chegada ao continente Americano, sugere-se que o SLEV, proveniente da África, foi introduzido pela América do Sul, evoluiu gradualmente e se dispersou até o norte da América do Norte e permanece endêmico nestas regiões. Sua relação genética com os vírus WNV, ZIKV, Ntaya vírus (NTAV), entre outros, corrobora com a ideia de sua chegada a partir do continente Africano (Kalitzky e Borowski, 2013). O vírus foi primeiramente identificado em 1933 em Saint Louis, Missouri nos EUA. Com base nas sequências completas do genoma, foi

identificado que o SLEV apresenta 7 genótipos (I-VII), onde o I e II são amplamente distribuídos nos EUA e os outros, nos países da América Central e do Sul (Kramer e Chandler, 2001). Posteriormente, o genótipo VIII foi identificado apenas na região Amazônica Brasileira (**Figura 4**) (Rodrigues, S. G. *et al.*, 2010).

É reemergente no Brasil e Argentina sendo que neste último, um surto em 2005 resultou em 47 casos com 9 mortes em humanos (Diaz *et al.*, 2016). Já no Brasil o primeiro isolamento viral do SLEV foi em 1960 em mosquitos capturados no estado do Pará (Maia *et al.*, 2014) e já foram relatados casos em humanos (Rocco e Al., 2005; Maia *et al.*, 2014; Heinen *et al.*, 2015; Vedovello *et al.*, 2015), primatas não-humanos (Svoboda *et al.*, 2014) e equinos (Pauvolid-Correa *et al.*, 2010; Rodrigues, Sueli Guerreiro *et al.*, 2010; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). No trabalho de Rosa e colaboradores foi observado pela primeira vez a presença do vírus em equinos com distúrbios neurológicos (Rosa *et al.*, 2013).

O SLEV apresenta como hospedeiros reservatórios: pássaros silvestres, marsupiais, tatus e preguiças. Apesar de várias espécies de aves não apresentarem formas clínicas da doença, elas permanecem com níveis virêmicos suficientes para infecção de novos mosquitos (Rocco e Al., 2005; Figueiredo, 2007; Pauvolid-Correa *et al.*, 2010). Os humanos e equinos são seus hospedeiros acidentais ou terminais, pois, ao contrário das aves, não atingem níveis importantes para infectar mosquitos durante o repasto sanguíneo. E mesmo sem uma total compreensão do real envolvimento dos equinos neste ciclo de transmissão, eles são utilizados como sentinelas para comprovar a circulação do SLEV em determinadas áreas da América do Sul (Rocco e Al., 2005; Pauvolid-Correa *et al.*, 2010; Maia *et al.*, 2014).

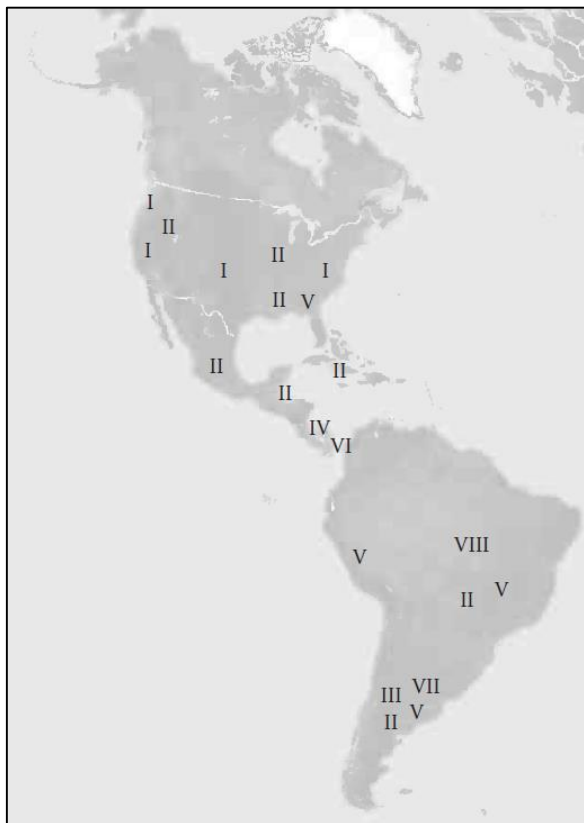


Figura 4 – Distribuição geográfica dos genótipos (I-VIII) do vírus da encefalite São Luís pelo continente Americano.

Fonte: (Singh e Ruzek, 2013).

3.8. Diagnóstico diferencial para flavivírus

Para o diagnóstico das infecções causadas pelos flavivírus, são realizados métodos sorológicos, moleculares e de isolamento viral. Dentre os testes sorológicos, descritos atualmente na literatura, a detecção de imunoglobulinas (Ig) M e IgG tanto por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) quanto por imunofluorescência indireta e o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) são as metodologias mais utilizadas como também a inibição da hemaglutinação pode ser realizada (Kitai et al, 2007).

Ao iniciar a infecção celular, os flavivírus se replicam e desenvolvem viremia. A partir desse momento o RNA viral pode ser detectado por reação de amplificação por transcriptase reversa, seguida de uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), além do isolamento viral em culturas de células (Maeda e Maeda, 2013). A partir do início dos sintomas clínicos, a pesquisa de anticorpos IgM e IgG pode delimitar o período da infecção, sendo primária quando ocorrem altos níveis de IgM após 5 dias de infecção e baixos níveis de IgG, ou secundária

quando ocorrem altos níveis de IgG posterior ao 7º dia de infecção, com baixos níveis de IgM (Cordeiro, 2012). No caso de presença de IgM no líquido cefalorraquidiano (LCR) indica infecção do sistema nervoso central (SNC), pois esse anticorpo não cruza a barreira hematoencefálica (Petersen *et al.*, 2013). O vírus, no entanto consegue entrar no SNC através de diversos mecanismos, dependentes ou não do hospedeiro (Salimi *et al.*, 2016).

O ELISA baseia-se na imobilização do complexo antígeno-anticorpo em suporte (geralmente placa de 96 poços) seguido de lavagens após cada etapa para remoção de reações inespecíficas, bloqueio de regiões não ocupadas pelo antígeno ou anticorpo ligados a superfície da placa, ou ainda para diminuir ligações não específicas e por fim serem analisadas por reação colorimétrica através da adição de um anticorpo ou antígeno ligado à uma enzima, e por sua vez, um substrato enzimático para conseguir resultado colorimétrico. Existem quatro metodologias diferentes para o ELISA: o direto, indireto, de captura e o de bloqueio (**Figura 5**). Para a realização do teste, primeiro é necessário escolher o que mais se encaixa na pesquisa. O ELISA direto é uma técnica mais simples utilizada para determinar a presença de antígenos ou anticorpo, a partir de anticorpos específicos conjugados com cromógeno. O ELISA indireto por sua vez, apresenta uma etapa a mais que o direto, utilizando além de um anticorpo primário, um secundário, marcado com uma enzima, que reconheça os anticorpos da amostra (Engvall e Perlmann, 1971; Hornbeck, 2001; Aydin, 2015).

Outro tipo de ELISA muito utilizado para detecção de anticorpos na amostra, é o de captura ou sanduíche, o qual é formado pelo revestimento de anticorpos de captura (mono ou policlonal) à superfície da placa. Estes, por sua vez, detectarão outros anticorpos no soro, seguido de outra incubação com antígenos que se ligarão ao anticorpo alvo, finalizando com a adição de um anticorpo secundário específico para o antígeno, marcado com um cromógeno. Com a adição do substrato da enzima, a reação de cor indica um resultado positivo enquanto a falta de coloração indica resultado negativo. É um dos ensaios mais utilizados em diagnóstico de viroses, reportado como o mais sensível na fase primária ou convalescente da infecção, porém ele demonstra-se menos específico por não apresentar diferenciação de reações cruzadas entre flavivírus (Hogrefe *et al.*, 2004; Drebot e Artsob, 2005).

O ELISA de bloqueio, não necessita de anticorpos de captura. A superfície da placa é sensibilizada com antígeno viral proveniente de cultura, incubada com amostra, onde anticorpos específicos para o antígeno se ligarão bloqueando todos ou grande parte dos epítomos antigênicos. Posteriormente, um anticorpo monoclonal também será incubado com o objetivo de se ligar ao antígeno, e então, com um anticorpo secundário marcado com cromógeno

específico para o anticorpo monoclonal. A amostra sendo positiva bloqueará os epítomos, fazendo com que o monoclonal não consiga se ligar e será desprezado durante a lavagem, assim como seu anticorpo secundário. Na amostra negativa, por outro lado, os epítomos estarão livres, o monoclonal e seu anticorpo secundário serão ligados e com utilização do substrato enzimático produzirá cor (Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003).

Apesar do ensaio ELISA ser bastante sensível, para flavivírus ainda se faz necessária a confirmação dos positivos por um teste padrão ouro para excluir possíveis reações cruzadas com outros vírus semelhantes ao da pesquisa (Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003; Aydin, 2015)

O PRNT, dentre os testes sorológicos é o mais vírus-específico, sendo considerado o padrão-ouro para o diagnóstico diferencial dos flavivírus, e é utilizado para excluir reações cruzadas entre soros de infectados (Blitvich, Marlenee, *et al.*, 2003). Sua metodologia é baseada em expor uma monocamada celular a um vírus e quantificar a atuação de anticorpos neutralizantes produzidos em resposta a esta exposição. Então, a partir do momento em que a monocamada celular é exposta ao agente, e este inicia sua replicação através das células vizinhas, é formada um espaço de células mortas no tapete que é possível ser contada (placas) (**Figura 6**). Com isso, a presença de anticorpos neutralizantes no soro reduz o número dessas placas formadas ao inibir o vírus. A leitura desse teste pode variar entre PRNT₅₀ e PRNT₉₀ e diluições seriadas do soro, sendo o PRNT₅₀ correspondente à diluição do soro que obteve 50% de redução na formação de placas em relação ao controle, onde apenas o vírus foi inoculado. Já a escolha do ponto de avaliação é dependente do tipo de estudo a ser realizado, a Organização Mundial de Saúde recomenda a utilização do PRNT₅₀ em estudos para ensaios vacinais e PRNT₉₀ para estudos epidemiológicos (Salje *et al.*, 2014). Apesar da especificidade o teste possui alto custo, longo tempo de execução e necessidade de profissional altamente treinado para executá-lo e interpretar o resultado. Além disso, para essa técnica é necessário a utilização de vírus vivos, o que impossibilita sua realização em laboratórios com nível de biossegurança (NB) menos que 3, no caso por exemplo do WNV e SLEV (Cordeiro, 2012; Maeda E Maeda, 2013; Salje *et al.*, 2014).

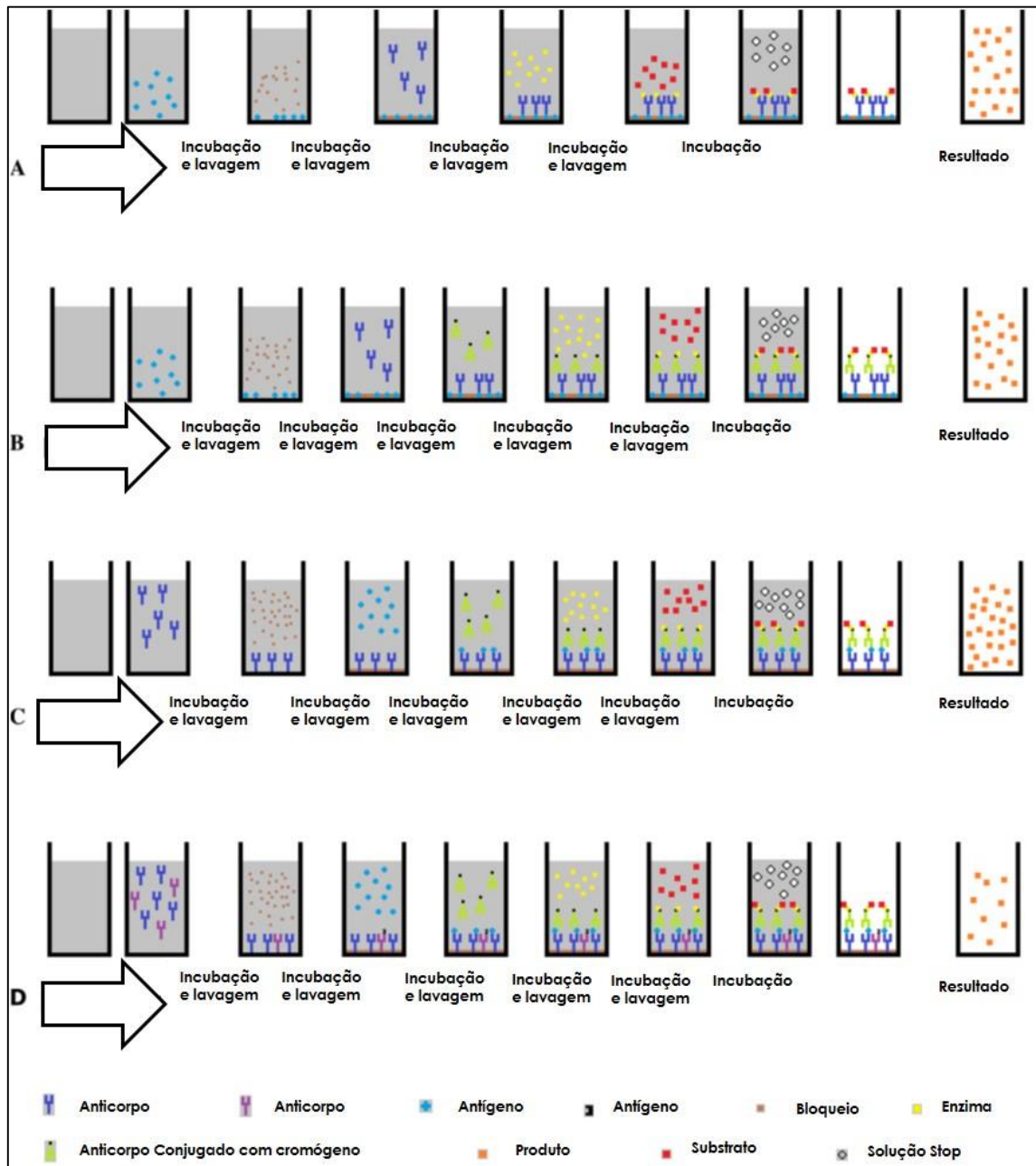


Figura 5 – Representação esquemática dos tipos de ELISA. A - ELISA direto, apresenta interação antígeno-anticorpo e resultado colorimétrico. B - ELISA indireto, demonstra interação antígeno-anticorpo, porém a utilização de um anticorpo secundário conjugado com cromógeno, que reconhece o anticorpo presente na amostra torna este ensaio indireto. C – ELISA de captura. A placa é sensibilizada com anticorpos de captura específicos para o antígeno alvo, em seguida anticorpos secundários marcados com cromógeno também específicos para o antígeno são incubados a solução. D – ELISA de bloqueio. Nesta metodologia, o antígeno sensibilizado na placa é específico ao anticorpo alvo na amostra. Existindo anticorpo no soro, todos os antígenos serão bloqueados, com isso o próximo anticorpo (também específico para o antígeno) não conseguirá se ligar e será desprezado durante o processo de lavagem.

Fonte: Adaptado de Aydin, (2015).

Diante do que foi exposto, conclui-se que os testes sorológicos através do ELISA são os mais indicados para utilização em grande escala, sendo mais rápidos e com baixo custo para facilitar o diagnóstico em locais onde há coexistência de diversos flavivírus (Ebel *et al.*, 2002). O ELISA de bloqueio foi desenvolvido, com o objetivo de reduzir as reações cruzadas, devido ao uso de anticorpos monoclonais específicos para o antígeno viral (Kitai *et al.*, 2007; Li *et al.* 2012). Esse teste foi previamente avaliado como efetivo e específico, na identificação de galinhas infectadas com o vírus Kunjin na Austrália (Hall *et al.*, 1995). Também foi avaliada a sua habilidade em detectar anticorpos de WNV em animais domésticos (Blitvich, 2003). Já no pantanal brasileiro, foi utilizado para identificar WNV e mais 11 diferentes flavivirose em equinos, ovelhas e em jacarés, evidenciando a importância da detecção dessas arboviroses diferencialmente (Pauvolid-Correa *et al.*, 2014) e em galinhas (Melandri *et al.*, 2012). Sendo ainda possível utilizá-lo em grande espectro de animais vertebrados por não utilizar anticorpos de captura espécie-específicos (Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003; Blitvich, Marlenee, *et al.*, 2003).

3.8.1. Vírus quiméricos como ferramenta de diagnóstico para flavivírus

A genética reversa foi significativamente importante para o estudo dos flavivírus, tendo em vista que é uma tecnologia que proporciona a manipulação do genoma viral e consequentemente a avaliação direta das modificações realizadas sob a biologia e patogenicidade viral (Davidson, 2014; Aubry *et al.*, 2015; Nolden *et al.*, 2016). Devido ao histórico de segurança e eficiência que a vacina de febre amarela 17D apresenta, vem sendo usada como vetor suporte, ou *backbone*, para criação de vírus recombinantes (quiméricos), replicons e clones infecciosos. Essas e outras estratégias utilizando a genética reversa têm o intuito de avançar em estudos do gênero *Flavivirus*, com vacinas e diagnóstico diferencial devido à grande ocorrência de reações cruzadas entre membros do gênero devido a sua semelhança genética (Aubry *et al.*, 2014; Davidson, 2014; Aubry *et al.*, 2015).

Essa tecnologia de desenvolvimento de vírus quiméricos se baseia em utilizar um vírus como suporte e substituir as proteínas estruturais prM e E por proteína equivalentes de outro vírus semelhante, sem afetar sua capacidade de replicação (**Figura 7**). Essas proteínas são importantes determinantes antigênicos e induzem anticorpos neutralizantes. Com isso, há formação de uma imunidade duradoura devido a um vírus atenuado como apoio para os antígenos imunizantes. A utilização de vírus quiméricos confere a possibilidade de se trabalhar com flavivírus antes apenas manipuláveis em NB 3, em laboratórios com NB 2, facilitando o

diagnóstico e segurança ao operador do teste, devido à atenuação viral promovida no seu desenvolvimento. Como é o caso do PRNT, que necessita de vírus vivo para desenvolvimento do teste, a utilização de vírus quiméricos facilitaria sua manipulação (Pugachev *et al.*, 2004; Heinz e Stiasny, 2012).

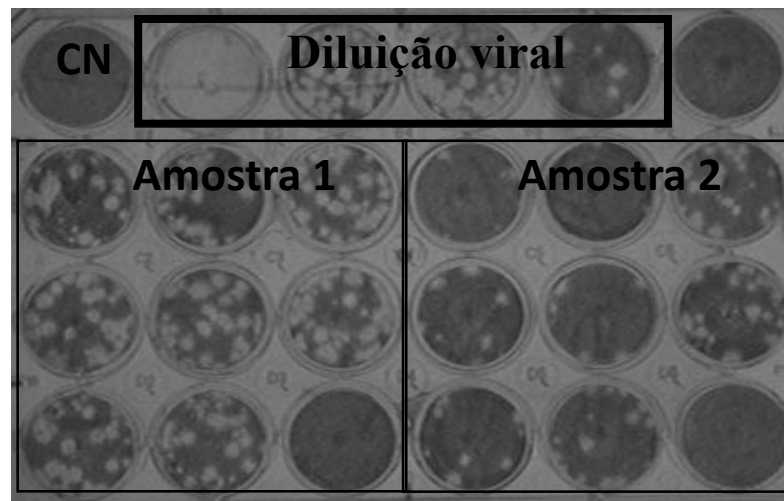


Figura 6 – Representação de uma placa de PRNT. Pode ser evidenciado o tapete formado por monocamada celular e espaços de células mortas formando “placas”. Estas placas podem ser contadas para identificação do título viral. CN – Controle negativo. A diluição viral é composta, geralmente, por 3 diluições apenas do vírus, sendo a utilizada no ensaio em duplicata. As amostras são inculcadas com o vírus e apresentam 3 diluições: 1:5, 1:20, 1:80 e 1:320.

Fonte: Da autora

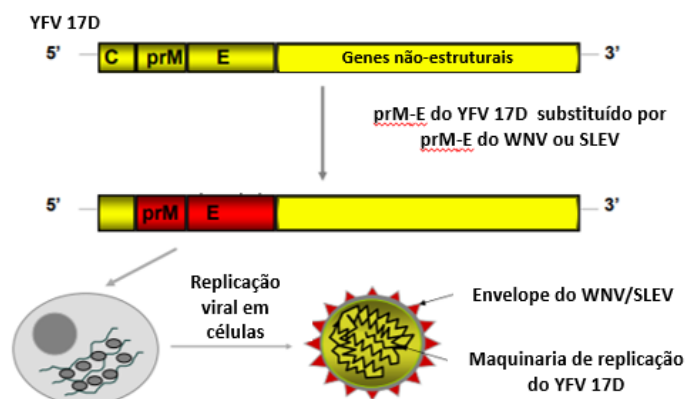


Figura 7 – Representação esquemática de flavivírus quiméricos. Evidenciando a adição das proteínas prM e E a um vetor suporte semelhante geneticamente e apresentando suas proteínas não estruturais. Após a replicação viral, a partícula apresenta maquinaria proveniente do vetor suporte e proteínas estruturais de outro vírus.

Fonte: Adaptado de

4. Materiais e Métodos

4.1. Local de Realização da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Departamento de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ/PE.

4.2. Estabelecimento de protocolo de diagnóstico sorológico para WNV por meio de ELISA de bloqueio e confirmação por PRNT

Foi realizado uma padronização de um teste de ELISA para detecção de anticorpos para WNV em soros de equinos, utilizando-se os vírus quiméricos YFV-WNV-3M e YFV-17D-SLEV que foram previamente construídos no nosso laboratório. Todos os soros utilizados para padronização da reação de ELISA de bloqueio foram testados por PRNT para confirmação anteriormente (Carvalho, 2015).

4.2.1. Produção de antígenos em cultura de células

Células C6/36 foram utilizadas para crescimento dos vírus quiméricos YFV-WNV-3M e YFV-17D-SLEV em seis garrafas T175 (175 cm²) separadamente, com uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células e MOI de 0,5 para a inoculação viral. Para a produção de antígeno negativo, seis garrafas T175 de células foram crescidas livres de inoculação viral. A adsorção foi feita por uma hora em estufa a 28°C, e as garrafas foram inoculadas durante 7 dias, até observação do efeito citopático. Após este período, o sobrenadante foi removido e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X estéril. Adicionou-se 1 mL de PBS 1X estéril em cada frasco para seguir com congelamento à -80°C e descongelamento em temperatura ambiente, por sete vezes para lise celular e consequentemente liberação de antígenos virais. O conteúdo da garrafa foi transferido para tubo tipo Falcon de 15 mL, onde foi adicionado Tween 20 em uma concentração final de 1% e efetuada incubação por 20 minutos a 4°C. Em seguida, adicionou-se albumina sérica bovina (BSA) com concentração final de 1% e após aferição do volume, adicionou-se o mesmo volume de glicerol (proporção de 1:1). Foram feitas alíquotas e o estoque mantido a -80°C.

4.2.2. Padronização do ELISA de bloqueio para WNV

O teste foi desenhado com base no protocolo descrito por Blitvich *et al* (2003) com pequenas modificações. As placas de ELISA com 96 poços e meio diâmetro (Costar) foram sensibilizadas com antígeno preparado de cultivo celular em diluições testes de 1:2, 1:5 e 1:10 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas a 4°C por 16 horas. As placas foram então lavadas 6 vezes com PBS1X- 0,1 Tween 20 para remoção de antígeno que não foi adsorvido. A superfície dos poços foi bloqueada com 100 µL de solução de bloqueio (PBS1X- 10% leite desnatado) e incubada por 1 hora à 37°C. A seguir, foram realizadas 6 lavagens e adicionado 100 µL de cada amostra de soro equino positivo e negativo, diluídos 1:20 em PBS1X- 1% leite desnatado. Foi feita uma incubação por 1h a 37°C. Após mais 6 lavagens, foi adicionado 50 µL do anticorpo monoclonal (6B6C-1 Anti – St Louis encephalitis/ West Nile produzido em *mouse*) diluído 1:100 em PBS 1X- 1% leite desnatado e incubado por 1h à 37°C. Mais 6 lavagens são realizadas e foi adicionado 50 µL do anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-Mouse) na diluição de 1:16.000. A incubação foi feita ao abrigo da luz por 1h à 37°C. Após 6 lavagens, 100 µL do substrato da peroxidase (TMB) foi adicionado, seguido de incubação a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Após a reação do substrato, foi acrescentado 50 µL da solução de parada (H₄SO₄ a 12,5%) e feita a leitura da densidade ótica no comprimento de 450 nm em espectrofotômetro. As amostras positivas apresentaram pouca ou nenhuma reação de cor, enquanto as negativas apresentaram intensidade de cor amarelo. Isso se deve ao monoclonal ser específico ao antígeno sensibilizado na placa.

O resultado final da reação do teste não ocorreu como esperado, com isso, outras modificações foram testadas seguindo com a padronização do teste. O próximo passo foi a realização de uma titulação dos anticorpos utilizados na reação. Testou-se o Anticorpo monoclonal (6B6C-1 - Millipore®) nas diluições de 1:50, 1:100 e 1:500 juntamente com as diluições de 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000 e 1:4000 do anticorpo secundário (Anti-mouse IgG-preroxidade/produzido em ovelha - Sigma®).

4.2.3. Condições padronizadas para ELISA de bloqueio

Todas as amostras foram triadas para anticorpos IgG para SLEV e WNV. Para sensibilização da placa de 96 poços foi padronizado a diluição de 1:2 de antígeno tanto de SLEV quanto de WNV. Para diluição dos anticorpos, foi usada uma solução de PBS 1X/ BSA 1%. Também foi percebido um melhor rendimento com as diluições para o anticorpo monoclonal e

secundário em 1/500 e 1/2000, respectivamente. Com os anticorpos devidamente titulados, o bloqueio foi avaliado com teste de diluições com PBS 1X/ 1% leite desnatado e PBS 1X / BSA 5%. Tendo PBS 1X/BSA 5% mostrado melhor resultado. As demais condições foram mantidas.

Todas as amostras foram testadas em duplicata, e com isso foi calculado o percentual de inibição (Hall *et al.*, 1995) com o cálculo: $100 - [(ST - B)/(SC - B)] \times 100$, onde ST é a média da densidade ótica do soro teste; B é a média da densidade ótica do branco e SC é a média da densidade ótica do soro controle (equino não infectado). O percentual de inibição foi calculado uma vez que a densidade ótica dos poços da amostra controle exceder 0,3. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram um percentual de inibição $\geq 30\%$.

As placas de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno produzido com lisado viral de cultura celular para os dois vírus. Seguindo as etapas de adição do soro equino, anticorpo monoclonal (produzido em *mouse*) específico para epítomos antigênicos, conjugado anti-*mouse* marcado com peroxidase, solução reveladora/TMB, solução de parada (ácido sulfúrico 12,5%) (Figura 8).

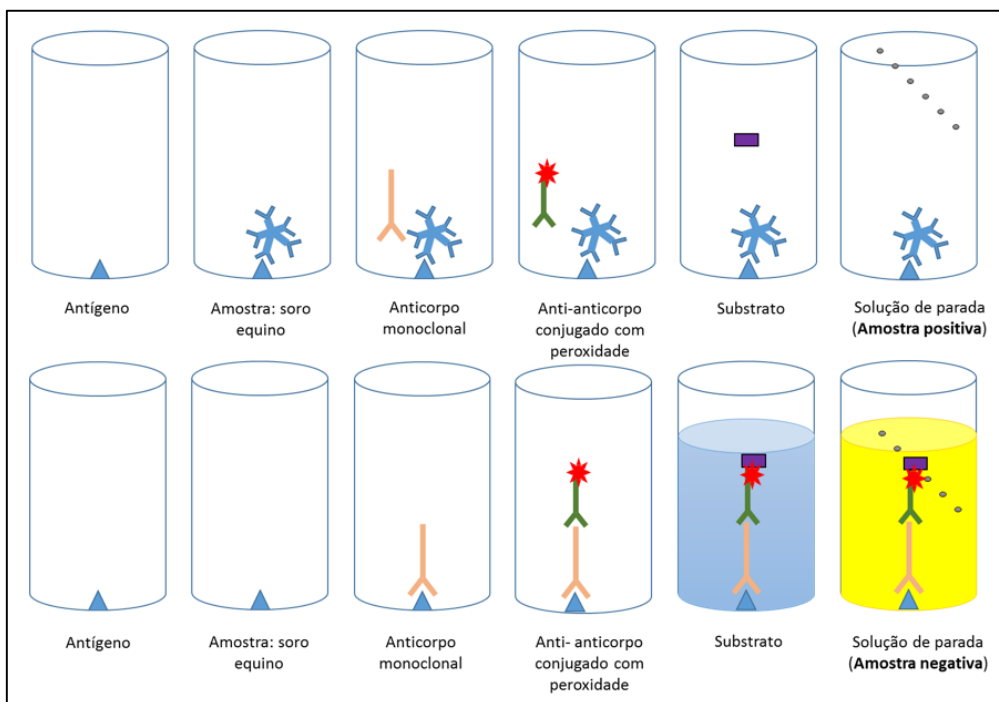


Figura 8 - Desenho esquemático do ELISA de bloqueio para a pesquisa de anticorpos contra o WNV e SLEV.

Fonte: Da autora.

4.2.4. Soros testes do ELISA de bloqueio

Foram recebidas 164 amostras de soros de equinos do Estado de Pernambuco, gentilmente cedidas pelo Dr. Giovani Bertani. Essas amostras foram triadas anteriormente neste laboratório na produção e padronização de um teste de ELISA de captura para detecção de IgM e IgG para o WNV, onde 63 foram consideradas positivas (Carvalho, 2015). Dessas 164, foram utilizadas neste estudo 155, pois 9 não possuíam volume suficiente.

4.2.5. Ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT)

Todas as amostras positivas no ELISA de bloqueio foram submetidas ao PRNT para determinar a especificidade do primeiro teste, devido a possibilidade de reações cruzadas do WNV com outros flavivírus. Foram utilizados vírus quiméricos produzidos neste laboratório anteriormente para realização do teste (YFV17D-WNV, YFV17D-ILHV, YFV17D-ROCV, YFV17D-SLEV). Os soros foram diluídos em 1:5, 1:20, 1:80 e 1:320 (crescentes na base 4) e incubadas com os vírus, por 1 hora à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a incubação, um volume de 100 µL de cada diluição foi adicionado por poço em placa de 24 poços semeadas com células BHK-21 no dia anterior (concentração de 6×10^4 células por poço).

Para controles positivos, os vírus foram incubados em ausência das amostras de soro. As placas foram incubadas por uma hora em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Após incubação, os sobrenadantes foram aliquotados e 1 mL de meio semi-sólido (agarose 1%, MEM 1X, 0,1% SFB, 0,05% penicilina/estreptomicina) foi adicionado em cada poço. Para cada placa, duas amostras de soro serão analisadas e a revelação foi realizada após quatro dias de incubação em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. O meio semi-sólido foi retirado, e as células fixadas com formalina (1:3,6) por 1 hora e coradas com cristal violeta por 1 hora. Para o cálculo dos títulos neutralizantes (PRNT₇₅), as amostras com PRNT₇₅ iguais ou superiores a 1:20 foram consideradas positivas. Para a definição do vírus prevalente foi considerado o critério de 4X, conseguindo assim distinguir reações cruzadas (Pauvolid-Correa *et al.*, 2014).

4.2.6. Análise estatística

O teste de Fisher foi utilizado para avaliar a frequência de positividade entre o teste de ELISA de bloqueio e o teste de ELISA de captura (Carvalho, 2015), ambos pesquisando IgG para WNV. A análise foi realizada utilizando o programa GraphPrism 5.0.

5. RESULTADOS

5.1. Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico sorológico para o WNV e SLEV por meio de ELISA de bloqueio

Os vírus quiméricos, YFV-WNV-3M e YFV17D-SLEV foram propagados em cultura celular para criação de estoques, sendo, posteriormente titulados e utilizados para preparação de antígenos em células C6/36, seguindo com a padronização do ELISA de bloqueio. Neste presente estudo, o ELISA de bloqueio foi realizado em 155 amostras de equinos provenientes do estado de PE. As amostras positivas no ELISA foram submetidas ao ensaio ouro PRNT₇₅. E dentre as amostras positivas no ELISA, obteve-se: 149 amostras positivas para WNV e 132 para SLEV. Sendo estas submetidas ao PRNT₇₅. No ensaio ouro, 31 amostras foram confirmadas para WNV e 21 para SLEV. Cinquenta e nove amostras já possuíam o resultado do teste de neutralização e foram cedidos gentilmente por Carvalho, 2015, as demais, foram realizados neste trabalho (**Figura 9**).

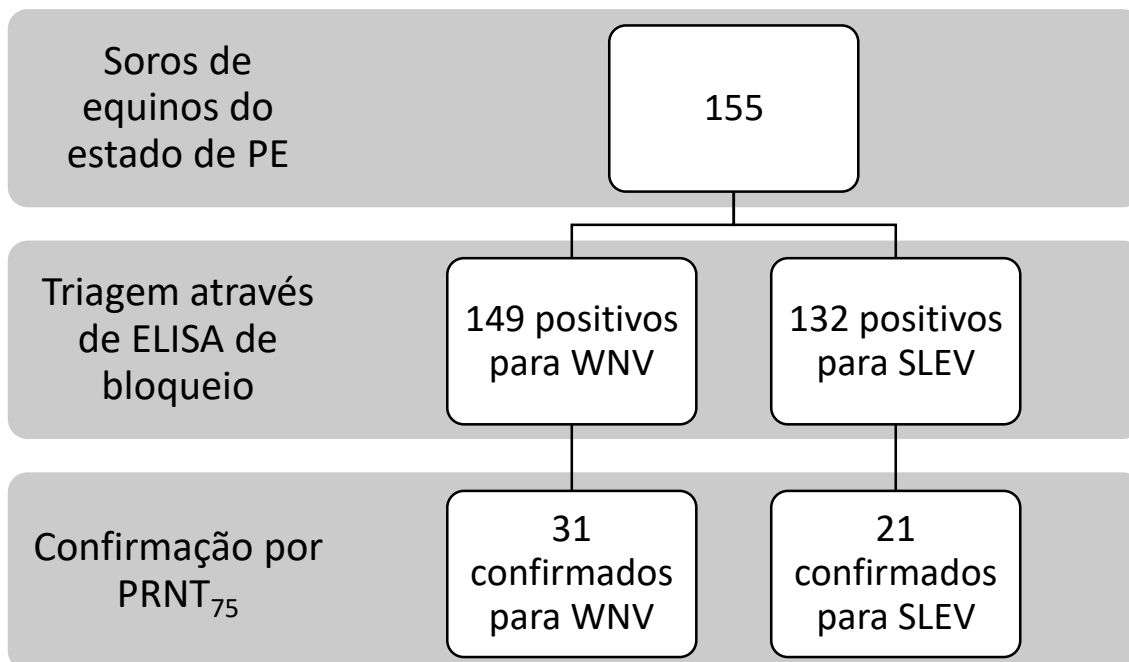


Figura 9 – Fluxograma demonstrando o quantitativo de resultados do ELISA e PRNT₇₅. 59 resultados de PRNT foram cedidos por Carvalho, 2015.

Fonte: Da autora

5.1.1. Padronização do ELISA de bloqueio para WNV e SLEV

Para a padronização do teste foram utilizadas cinco amostras positivas para WNV, cedidas pela Dra. Judi Galeota Wheeler (Virology Diagnostic Center, University of Nebraska at Lincoln, Lincoln, NE). Essas amostras foram utilizadas como controle positivo no teste. A metodologia do ELISA de bloqueio foi baseado no trabalho de Blitvich, et al, (2003) com algumas modificações.

Posteriormente á padronização foram realizadas as análises das 155 amostras de equinos pelo ELISA de bloqueio, para IgG de WNV e SLEV. Para o cutt off as amostras positivas deveriam ter um percentual de inibição ≥ 30 . Com isso, destas 155 amostras, 149 foram IgG positivas para WNV e 132 foram IgG positivas para SLEV (**Figura 10**).

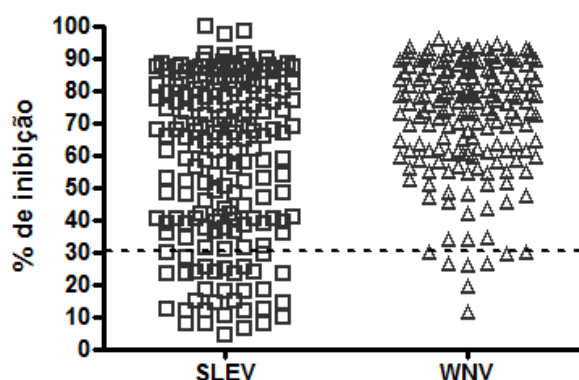


Figura 10 – Distribuição dos valores inibitórios do ELISA-IgG para os vírus SLEV e WNV.

Fonte: Da autora

5.1.2. Comparação entre ELISA de bloqueio e ELISA de captura para pesquisa de IgG para WNV

Em trabalho anterior (Carvalho, 2015), utilizando-se o método de ELISA de captura, todas as 155 amostras foram testadas tanto para IgG quanto para IgM, sendo identificadas 29 amostras IgG e 30 IgM positivas, dentre eles, 11 positivos para ambos os isotipos. Salientando que no trabalho de Carvalho (2015) a triagem em larga escala foi realizada apenas para o WNV.

Das 155 amostras testadas 96 amostras foram negativas no ELISA de captura. Porém, no presente estudo, os 155 soros de equinos foram testados pelo ELISA de bloqueio para WNV, apenas para IgG, resultando em 149 amostras positivas para esta imunoglobulina (**Tabela 4**).

Tabela 2 – Associação entre o ELISA (IgG) de bloqueio e de captura para WNV.

	Elisa de Bloqueio	Elisa de Captura
Positivo	149/155 (96%)	29/155 (18.7%)
Negativo	6/155 (4%)	126/155 (81.3%)

$p < 0.0001$ - Obtido através do Teste exato de Fisher ($p \leq 0.05$, significativo).

Tabela 3 – Valores inibitórios do ELISA-IgG para SLEV e WNV em relação aos valores de PRNT para SLEV, WNV

ID	ELISA		PRNT	
	%WNV*	%SLEV*	WNV	SLEV
01	47,9	46	(-)	(-)
02	63,2	(-)	(-)	F
03	80	53,6	(-)	(-)
04	72,9	(-)	(-)	F
05	70,1	74,3	F	(-)
06	60,3	40,4	(-)	(-)
07	61,6	40,1	(-)	(-)
08	34	(-)	1:20 [#]	F
09	81,1	67,9	(-)	(-)
10	69,5	39,5	(-)	(-)
11	59,2	40,8	(-)	1:320**
12	78,7	52	(-)	(-)
13	46,8	41,7	(-)	F
14	58,5	(-)	1:80 [#]	F
16	76,3	58,5	(-)	(-)
17	52,1	41,7	1:5**	(-)
19	50,6	(-)	(-)	F
20	78,1	36,4	1:5 [#]	(-)
21	54,2	(-)	(-)	F
22	54,7	(-)	1:5 [#]	F
23	61,3	(-)	1:5 [#]	F
24	45,1	35,8	(-)	1:5 [#]
25	72,8	69,5	(-)	1:5 [#]
26	(-)	34,2	F	(-)
27	68,6	38,7	(-)	1:20 [#]
28	58	37,1	1:5 [#]	1:5 [#]

30	89,2	56,3	(-)	1:5 [#]
31	55	(-)	(-)	F
32	73,2	48,4	1:5 [#]	1:5 [#]
34	94	61,5	(-)	1:20 [#]
35	59,1	(-)	1:5 [#]	1:5 [#]
36	78,1	39	(-)	1:5 [#]
37	92,6	67,2	(-)	1:5 [#]
38	84,6	71,6	(-)	1:5 [#]
39	64,5	(-)	1:5 [#]	F
40	55,7	(-)	(-)	F
42	79,5	64,4	(-)	1:5 [#]
43	89,2	61,1	(-)	(-)
44	78,7	57,8	(-)	1:80 [#]
45	69,5	31,9	1:5 [#]	1:5 [#]
46	(-)	39,9	F	(-)
47	30	(-)	(-)	F
48	87,9	82,4	1:320 ^{**}	1:320 ^{**}
50	86	58,7	(-)	1:80 [#]
51	94,5	86,2	1:80 ^{**}	1:5 ^{**}
52	93	83,1	(-)	(-)
53	88,7	81,7	1:320 ^{**}	1:320 ^{**}
54	81,5	77,9	(-)	1:5 ^{**}
55	68,4	66,8	(-)	(-)
56	93,5	76,3	(-)	1:5 [#]
57	90,4	84,7	(-)	(-)
58	41,6	(-)	(-)	F
59	83,2	40,9	1:5 [#]	1:20 [#]
60	(-)	31	F	(-)
61	79,1	70	(-)	(-)
62	61,3	47,6	(-)	1:5 [#]
63	61,1	(-)	(-)	F
64	56	43,5	(-)	1:20 ^{**}
65	43,1	52,8	(-)	(-)
66	67,4	65,7	F	(-)
67	89	58,6	(-)	1:5 [#]
68	71,4	73,1	F	(-)
69	81,4	44,5	(-)	1:5 [#]
70	75,9	75,4	(-)	(-)
71	47,5	48,2	(-)	(-)

72	61,2	51,2	(-)	(-)
73	65,2	62,7	(-)	(-)
74	73,2	80,4	(-)	(-)
75	60,7	31,1	(-)	1:20 [#]
77	65,2	65,2	1:5 ^{**}	F
78	74,4	72,4	(-)	(-)
79	92,2	69,3	(-)	1:5 [#]
80	51,3	50,3	(-)	1:5 [#]
81	64,9	57,7	1:320 ^{**}	(-)
82	81,2	88,7	1:320 ^{**}	F
83	64,5	66,6	1:320 ^{**}	F
84	71,8	78,1	1:80 ^{**}	F
85	83,8	38,29	(-)	1:20 [#]
86	60,1	66,8	(-)	1:20 [#]
87	75,3	83,3	1:320 ^{**}	F
88	63,5	75,4	1:320 ^{**}	1:20 ^{**}
89	34,1	74,5	1:320 ^{**}	F
90	89,3	79,7	1:5 ^{**}	(-)
91	84	87,4	(-)	(-)
92	77,6	81,5	(-)	F
93	69,9	80,4	1:320 ^{**}	F
94	78,5	75,6	1:320 ^{**}	F
95	76,2	88,1	1:320 ^{**}	F
96	85,1	82,9	(-)	(-)
97	92,8	89,6	(-)	1:320 ^{**}
98	81,5	73,8	(-)	1:5
100	91,2	88,5	(-)	(-)
101	69,9	40,5	1:5 ^{**}	(-)
102	88,8	67,4	1:320 ^{**}	F
103	85,6	89,3	(-)	(-)
104	86,3	78	1:5 ^{**}	(-)
105	81,7	77	(-)	(-)
106	85,2	87,5	(-)	F
107	83,9	(-)	(-)	F
108	74,2	65	1:320 ^{**}	(-)
109	84,6	67,7	1:320 ^{**}	F
110	90,5	72,1	1:5 ^{**}	(-)
111	78,1	79,7	1:320 ^{**}	(-)
112	90,2	91,5	1:320 ^{**}	1:320 ^{**}

113	82,4	84,1	(-)	F
114	75,6	65,7	1:80**	F
115	85,8	87,3	1:320**	F
116	93	91	(-)	(-)
117	90,1	82,2	1:80**	(-)
118	89,1	87,3	1:320**	(-)
119	84,4	86,6	1:320**	(-)
120	83,4	78,7	1:80**	(-)
121	76,8	86,3	1:320**	(-)
122	91,4	76,44	1:20 [#]	1:5 [#]
123	82,5	82,9	1:320**	F
124	48,2	(-)	(-)	F
125	86,7	87,3	(-)	(-)
126	73,7	31,24	(-)	1:20 [#]
127	87,6	87,3	1:5**	(-)
128	83,2	61,1	(-)	F
129	92,2	88,3	1:80**	1:320**
130	85,6	89,3	(-)	F
131	86,2	88	1:320**	F
132	80,7	77,5	(-)	F
133	91,5	81,2	(-)	F
134	90,1	85,6	(-)	F
135	90,2	86,3	(-)	1:20**
136	72,5	46,9	(-)	F
137	78,6	(-)	(-)	1:5 [#]
138	86,4	69,4	1:20**	1:5**
139	71,5	81,7	F	F
140	89,2	86,3	(-)	F
141	93,2	85,8	(-)	F
142	92,6	86,1	(-)	F
143	87,2	68,7	(-)	F
144	89,1	61,83	(-)	(-)
145	78,4	64,3	(-)	F
146	92,4	86,6	(-)	F
147	77,6	84,4	(-)	F
148	73,2	79,5	(-)	F
149	78,3	73,3	(-)	(-)
150	95,6	98,5	(-)	F
151	101,7	97,3	(-)	1:320**

152	76,9	(-)	(-)	F
153	90,7	78,3	(-)	
154	101,4	100	(-)	1:80**
155	87,1	87,5	(-)	F
156	92,2	48,62	(-)	(-)
157	91,6	87,8	(-)	F
158	90,1	91,5	F	F
159	56,2	52,6	(-)	1:5 [#]
160	59,4	(-)	(-)	1:20 [#]
<hr/>				
	% WNV	%SLEV	PRNT WNV	PRNT SLEV
	149	132	31	21

**PRNT75 realizado pela autora. #PRNT cedido por Carvalho, (2015). O PRNT foi considerado positivo a partir de titulações 1:20. (-) amostras negativas. F ensaios em andamento.

Tabela 4 – Positividade do ELISA de bloqueio e PRNT₇₅ para WNV e SLEV em equinos de Pernambuco.

	ELISA de Bloqueio WNV	PRNT WNV
Positivo	149/155 (96.1%)	31/148 (21%)
Negativo	6/155 (3.9%)	117/148 (79%)
	ELISA de Bloqueio SLEV	PRNT SLEV
Positivo	132/155 (85.2%)	21/116 (18%)
Negativo	23/155 (14.8%)	50/116 (43.1%)

5.2.3. Comparação do ELISA de bloqueio com PRNT₇₅

Foram realizados o teste de neutralização por redução de placas em 75% (PRNT₇₅) em apenas uma parte do total de amostras positivas nos testes de ELISA de bloqueio: em **148/149** amostras positivas no ELISA de bloqueio para WNV e para SLEV em **116/132** amostras, sendo o PRNT o padrão ouro para diagnóstico de flavivírus, nossos resultados do ELISA foram então, correlacionadas com ele. Os demais ensaios de PRNT com as amostras positivas no ELISA estão em andamento. Dentre as amostras testadas para o PRNT, 21% (31/148) foram positivas para WNV e 18.1% (21/116) para SLEV. Os dados contendo os resultados do ELISA e do PRNT estão apresentados na tabela 2 e tabela 3.

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico de flavivírus, em locais que apresentam co-circulação de membros do gênero necessita de uma interpretação cuidadosa e complexa devido à grande possibilidade de ocorrência de reações cruzadas (Pauvolid-Correa *et al.*, 2011). Considerando isso, uma gama de estudos utiliza o ELISA como um teste de triagem, em larga escala, seguido do teste de PRNT vírus específico para confirmação de positivos (Long *et al.*, 2006; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011; Pauvolid-Correa *et al.*, 2014). O teste de PRNT determina por titulação a quantidade de anticorpos neutralizantes nas amostras, esses anticorpos são produzidos durante a infecção inicial e geram maior proteção contra reinfecção, tornando-o o teste padrão-ouro para diagnóstico de flavivírus. Porém, este é um teste que consome tempo e experiência do operador, além de ter um maior custo e necessitar de um laboratório com nível de biossegurança 3 em alguns casos, como a manipulação dos vírus SLEV, ROCV ou WNV ou de nível 2 no caso da utilização de vírus quiméricos (Maeda e Maeda, 2013). Com isso, uma metodologia imunoenzimática adequada pode ser uma ferramenta eficiente para triagem de amostras sorológicas em larga escala.

Entre as metodologias imunoenzimáticas, o ELISA de bloqueio de epítomos vem sendo muito utilizado para detecção de flavivírus, sobretudo para vigilância de animais sentinela para monitoramento de atividade migratória em pássaros (Blitvich, Marlenee, *et al.*, 2003), equinos, felinos e suínos (Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003; Prow *et al.*, 2013) e galinhas (Hall *et al.*, 1995). No Brasil, essa mesma técnica foi utilizada para detectar anticorpos contra os vírus SLEV em equinos na região do Pantanal brasileiro (Pauvolid-Correa *et al.*, 2010) e posteriormente, também em equinos foi evidenciado a presença dos vírus WNV, SLEV, ROCV, ILHV e Cacipacore, na mesma região do Pantanal, demonstrando ampla distribuição viral no Brasil (Pauvolid-Correa *et al.*, 2014).

As amostras analisadas por ELISA de bloqueio, neste trabalho, para WNV e SLEV apresentaram uma média de inibição de 96,1% e 85,2%, respectivamente. Esses dados diferem do encontrado por (Blitvich, Marlenee, *et al.*, 2003) o qual demonstrou uma média de inibição de 64,4% para WNV e 79,8% para SLEV, porém esse estudo foi realizado em outra região e com amostragem menor.

Quando se comparam os métodos de bloqueio e captura para WNV-IgG com as mesmas amostras, Carvalho *et al.*, (2015) apresentou uma frequência na positividade de 18,7% (29/155) em ELISA de captura, enquanto que o nosso estudo encontrou uma positividade de 96%

(149/155). Com isso, o ELISA de captura para WNV-IgG negativou 126 soros em contraste ao ELISA de bloqueio que negativou 6. As amostras negativadas pelo ELISA de captura, no trabalho de Carvalho et al. (2015), não foram testadas no PRNT, porém ao serem avaliadas neste estudo, foi identificado que destas 126 amostras, 22.2% (28/126) apresentaram um percentual de neutralização maior ou igual a 75% no teste de PRNT para WNV realizado após ELISA de bloqueio, demonstrando falso-negativos no ELISA de captura. De acordo com outros estudos, o ELISA de bloqueio demonstrou ser mais sensível para detecção de anticorpos para WNV e SLEV em aves migratórias, o que justificaria essa diferença na frequência desta positividade e corroborando com a maior positividade encontrada neste tipo de ensaio descrito por Blitvich, Marlenee, *et al.*, (2003). Uma outra vantagem deste tipo de ELISA é a não necessidade de utilização de anticorpos espécie específicos de captura, podendo ser utilizado para diagnóstico em qualquer espécie de animal vertebrado (Pauvolid-Correa *et al.*, 2011).

Quando se observa o PRNT, entre as amostras analisadas 3,5 % (5/144) apresentaram positividade para ambos WNV e SLEV, apontando para uma possível reação cruzada no ELISA de bloqueio, corroborando com dados de estudos anteriores (Hall *et al.*, 1995; Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003; Blitvich, Marlenee, *et al.*, 2003; Pauvolid-Correa *et al.*, 2010; Pauvolid-Correa *et al.*, 2011; Prow *et al.*, 2013; Pauvolid-Correa *et al.*, 2014), que se deve principalmente, devido à similaridade genética entre eles, em particular em epítopo da proteína E (Blitvich, Bowen, *et al.*, 2003). Contudo o ELISA de bloqueio foi capaz de detectar todas as amostras com títulos reagentes para WNV no PRNT. Ao comparar o ELISA de bloqueio com o PRNT₇₅ obtivemos uma positividade de 20% (31/148) corroborando com estudo realizado por Pauvolid-Correa *et al.*, (2014) que encontraram uma positividade de 22,6% (172/396) em equinos no Pantanal. Em contraste, os resultados do ELISA de captura apresentam uma positividade de 1,9 % (3/155) ao comparar seus resultados com o PRNT, demonstrando uma falta de especificidade no ELISA.

A presença de IgG para SLEV em equinos de Pernambuco corrobora com dados de Laroque *et al.*, 2014, que demonstraram a presença do vírus em uma espécie de macaco no Nordeste brasileiro. Entretanto, a presença de anticorpos para WNV em equinos no estado foi relatada somente por Carvalho et al., 2015 (dados não publicados). Esses resultados apontam a importância do monitoramento destas espécies no estado de PE, uma vez que ambas causam patologias em humanos.

Diante do que foi exposto, apesar de apresentar reações cruzadas com outros vírus do mesmo gênero, o teste apresentou uma grande positividade em amostras reativas em teste padrão ouro evidenciando a circulação dos vírus WNV e SLEV no estado de Pernambuco,

podendo assim ser uma ferramenta importante para triagem de amostras e vigilância epidemiológica em equinos.

7. CONCLUSÕES

O protocolo de ELISA de bloqueio foi capaz de detectar maior número de amostras positivas para os flavivírus WNV e SLEV na triagem de soros de equinos do Estado de Pernambuco, demonstrando a possibilidade de uso para triagem de amostra em estudos epidemiológicos.

As amostras de equinos positivas no ELISA de bloqueio e PRNT₇₅ sugerem a circulação dos vírus WNV e SLEV no estado de Pernambuco.

O ELISA de bloqueio demonstrou ser mais sensível que o ELISA de captura, podendo então ser utilizado para triagem.

8. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, D. E. et al. LongFrangle RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. **J Virol**, v. 79, n. 11, p. 6631F43, Jun 2005.

APTEFSENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R. J. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. **Curr Opin Virol**, v. 9, p. 134-42, Dec 2014.

AUBRY, F. et al. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective. **Antiviral Res**, v. 114, p. 67-85, Feb 2015.

AUBRY, F. Single-stranded positive-sense RNA viruses generated in days using infectious subgenomic amplicons. **J Gen Virol**, v. 95, n. Pt 11, p. 2462-7, Nov 2014.

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

BAILEY, C. L. et al. Isolation of St. Louis encephalitis virus from overwintering *Culex pipiens* mosquitoes. **Science**, v. 199, p. 1346-1349, 1978.

BLITVICH, B. J. et al. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of West Nile Virus Antibodies in Domestic Mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2676-2679, 2003. ISSN 0095-1137.

BLITVICH, B. J. et al. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Detection of Serum Antibodies to West Nile Virus in Multiple Avian Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1041-1047, 2003.

BLITVICH, B. J. B., R. A.; MARLENEE, N. L.; HALL, R. A.; BUNNING, M. L.; BEATY, B. J. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of West Nile Virus Antibodies in Domestic Mammals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2676F2679, 2003.

BORISEVICH, V. et al. Biological properties of chimeric West Nile viruses. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 371-81, Jun 2006.

BRINTON, M. A. Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 13-53, Jan 2014.

BRINTON, M. A.; BASU, M. Functions of the 3' and 5' genome RNA regions of members of the genus Flavivirus. **Virus Res**, v. 206, p. 108-19, Aug 3 2015.

BROOKS, F. B.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. 21. Rio de Janeiro/RJ: Guanabara Koogan, 2000.

CARVALHO, A. G. O. **Utilização do vírus da febre amarela no desenvolvimento de ferramentas para o uso em diagnóstico diferencial e descoberta de novos antivirais contra flavivírus**. 2015. 93 (Doutorado). Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

CHANCEY, C. et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 376230, 2015.

CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. **Viruses**, v. 5, n. 12, p. 3021-47, Dec 2013.

COLPITTS, T. M. et al. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 25, n. 4, p. 635-48, Oct 2012.

CORDELLIER, R.; DEGALLIER, N. Environment, arbovirus transmission and control of epidemics. **Cad. Saúde Pública**, v. 8, n. 3, p. 249-253, 1992.

DAVIDSON, A. D. Development and application of dengue virus reverse genetic systems. **Methods Mol Biol**, v. 1138, p. 113-30, 2014.

DIAZ, L. A. et al. Activity Patterns of St. Louis Encephalitis and West Nile Viruses in Free Ranging Birds during a Human Encephalitis Outbreak in Argentina. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161871, 2016.

DREBOT, M. A.; ARTSOB, H. West Nile virus. Update for family physicians. **Can Fam Physician**, v. 51, p. 1094-9, Aug 2005.

EBEL, G. D. et al. Detection by EnzymeFLinked Immunosorbent Assay of Antibodies to West Nile virus in Birds. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 979–982, 2002.

EDGIL, D. et al. Translation efficiency determines differences in cellular infection among dengue virus type 2 strains. **Virology**, v. 317, n. 2, p. 275-290, 2003.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. EnzymeFLinked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-4, 1971.

FERNANDEZFGARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-28, Apr 2009.

FERNÁNDEZ, I. V. et al. Development of a novel protocol for generating flavivirus reporter particles. **J Virol Methods**, v. 208, p. 96-101, Nov 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria, RS: 2007. 888.

GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, 2001.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: WILKINS, L. W. (Ed.). **FIELDS' Virology**. 5. Philadelphia, 2007. p.1154F1252.

GUHARROY, R. et al. West Nile virus infection. **Am J Health Syst Pharm**, v. 61, n. 12, p. 1235F41, Jun 2004.

HALL, R. A. et al. Immunodominant epitopes on the NS1 protein of MVE and KUN viruses serve as targets for a blocking ELISA to detect virus-specific antibodies in sentinel animal serum. **Journal of Virological Methods**, v. 51, p. 201-210, 1995.

HEINEN, L. B. et al. Saint Louis Encephalitis Virus in Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 215-20, May-Jun 2015.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 450F455, 2001.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-6, Jun 19 2012.

HOGREFE, W. R. et al. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus and other flavivirus-specific antibodies. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4641-8, Oct 2004.

HORNBECK, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. In: (Ed.). **Current Protocols in Immunology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

HUANG, Y. J. et al. Flavivirus-mosquito interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4703-30, Nov 2014.

KALITZKY, M.; BOROWSKI, P. **Molecular Biology of the Flavivirus**. Horizon Bioscience, 2013.

KLEINSCHMIDT-DEMESTERS, B. K.; BECKHAM, J. D. West Nile Virus Encephalitis 16 Years Later. **Brain Pathol**, v. 25, n. 5, p. 625-33, Sep 2015.

KRAMER, L. D.; CHANDLER, L. J. Phylogenetic analysis of the envelope gene of St. Louis encephalitis virus. **Arch Virol**, v. 146, n. 12, p. 2341-55, Dec 2001.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 608-37, Oct 2005.

LAROQUE, P. O. et al. Levantamento soropidemiológico para arbovírus em macaco-ferreteiro (Cebus flavius) de vida livre no Estado da Paraíba e em macaco-ferreteiro (Cebus libidinosus) de cativeiro do Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 34, n. 5, p. 462-468, 2014.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular Biology of Flaviviruses. **Adv Virus Res.**, v. 59, p. 23-61, 2003a.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.F.J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: (Ed.). **Fields Virology**. 5. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 33,

LONG, M. T. et al. Diagnostic Performance of the Equine IgM Capture ELISA for Serodiagnosis of West Nile Virus Infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 608-613, 2006.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista PanF Amazônia de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Vet J**, v. 195, n. 1, p. 33-40, Jan 2013.

MAIA, F. G. et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **Int J Infect Dis**, v. 26, p. 96-7, Sep 2014.

MAY, F. J. et al. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. **J Virol**, v. 85, n. 6, p. 2964-74, Mar 2011.

MELANDRI, V. et al. Serological detection of West Nile virus in horses and chicken from Pantanal, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 1073-5, Dec 2012.

MLERA, L.; MELIK, W.; BLOOM, M. E. The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathog Dis**, v. 71, n. 2, p. 137-63, Jul 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan 2005.

NELMS, B. M. et al. Overwintering Biology of Culex (Diptera: Culicidae) Mosquitoes in the Sacramento Valley of California. **J Med Entomol**, v. 50, n. 4, p. 773-790, 2013.

NOLDEN, T. et al. Reverse genetics in high throughput: rapid generation of complete negative strand RNA virus cDNA clones and recombinant viruses thereof. **Sci Rep**, v. 6, p. 23887, 2016.

PAUVOLID, CORREA, A. et al. Serological evidence of widespread circulation of West Nile virus and other flaviviruses in equines of the Pantanal, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 2, p. e2706, Feb 2014.

PAUVOLID, CORREA, A. et al. Neutralising antibodies for West Nile virus in horses from Brazilian Pantanal. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 467-474, 2011.

PAUVOLID, CORREA, A. et al. Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolandia subRegion in South Pantanal, CentralWest Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 829-833, 2010.

PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R. S. West Nile virus: review of the literature. **JAMA**, v. 310, n. 3, p. 308-15, Jul 2013.

PETERSEN, L. R.; MARFIN, A. A. Shifting Epidemiology of Flaviviridae. **Journal of Travel Medicine**, v. 12, n. 1, p. S3-S11, 2005.

PROW, N. A. et al. Natural exposure of horses to mosquito-borne flaviviruses in south-east Queensland, Australia. **Int J Environ Res Public Health**, v. 10, n. 9, p. 4432-43, Sep 2013.

PUGACHEV, K. V. et al. Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool. **Am J Trop Med Hyg**, v. 71, n. 5, p. 639-45, Nov 2004.

ROBY, J. A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **J Gen Virol**, v. 96, n. Pt 7, p. 1551-69, Jul 2015.

ROCCO, I. M.; AL., E. St. Louis Encephalitis Virus: First Isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-285, 2005.

RODRIGUES, S. G. et al. Molecular epidemiology of Saint Louis encephalitis virus in the Brazilian Amazon: genetic divergence and dispersal. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 10, p. 2420-7, Oct 2010.

RODRIGUES, S. G. 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. **Revista PanF Amazônia de Saúde**, v. 1, n. 1, 2010.

SALIMI, H.; CAIN, M. D.; KLEIN, R. S. Encephalitic Arboviruses: Emergence, Clinical Presentation, and Neuropathogenesis. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 3, p. 514-34, Jul 2016.

SALJE, H. et al. Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1-10, 2014.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução a virologia humana**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SILVA, J. R. et al. Serologic survey of West Nile virus in horses from Central West, Northeast and Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 7, p. 921-923, 2013.

SILVA, J. R. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 4, p. 414-7, Jul 2014.

SINGH, S. K.; RUZEK, D. **Neuroviral Infections: RNA Viruses and Retroviruses**. 1st. CRC Press 2013.

SOARES, C. N. et al. Is West Nile virus a potential cause of central nervous system infection in Brazil? **Arq Neuropsiquiatr**, v. 68, n. 5, p. 761-3, 2010.

STAPLETON, J. T. et al. The GB viruses: a review and proposed classification of GBVFA, GBVFC (HGV), and GBVFD in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 2, p. 233-46, Feb 2011.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Effect of membrane curvature-modifying lipids on membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. **J Virol**, v. 78, n. 16, p. 8536-42, Aug 2004.

STIASNY, K.; KOESSL, C.; HEINZ, F. X. Involvement of Lipids in Different Steps of the Flavivirus Fusion Mechanism. **Journal of Virology**, v. 77, n. 14, p. 7856-7862, 2003.

SVOBODA, W. K. et al. Serological evidence for Saint Louis encephalitis virus in free-ranging New World monkeys and horses within the upper Paraná River basin region, Southern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 3, p. 280-6, 2014

TSAI, W. Y. et al. C-terminal helical domains of dengue virus type 4 E protein affect the expression/stability of prM protein and conformation of prM and E proteins. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52600, 2012.

VEDOVELLO, D. et al. First genome sequence of St. Louis encephalitis virus (SLEV) isolated from a human in Brazil. **Arch Virol**, v. 160, n. 5, p. 1189-95, May 2015.

VIEIRA, M. A. et al. West Nile Virus Encephalitis: The First Human Case Recorded in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 93, n. 2, p. 377-9, Aug 2015.

W.H.O. **Arboviruses and human disease**. World Health Organization technical report series. Geneva, Switzerland, p.84. 1967

W.H.O. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases**. World Health Organization Technical Report Series. Geneva, Switzerland, p.116. 1985

WINKELMANN, E. R.; LUO, H.; WANG, T. West Nile Virus Infection in the Central Nervous System. **F1000Res**, v. 5, 2016.

YU, L. et al. Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication. **Virology**, v. 374, n. 1, p. 170-185, April 25 2008.