

Fábio Luís Lima Monteiro

Implementação da técnica de imunofluorescência indireta para
detecção de IgG anti-ZIKV e anti-DENV



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2016**

Trabalho realizado no Departamento de Genética do Instituto de Biologia, UFRJ, sob a orientação do Professor Renato Santana Aguiar e coorientação de Luiza Mendonça Higa.

CIP - Catalogação na Publicação

M772i Monteiro, Fábio Luís Lima Implementação da técnica de imunofluorescência indireta para de detecção de IgG anti-ZIKV e anti DENV / Fábio Luís Lima Monteiro. -- Rio de Janeiro, 2016. 114 f.

Orientador: Renato Santana Aguiar.

Coorientadora: Luiza Mendonça Higa.

Trabalho de conclusão de curso (graduação)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Vírus Zika. 2. Dengue. 3. sorologia. 4. transfusão de plaquetas. 5. Microcefalia. I. Aguiar, Renato Santana, orient. II. Higa, Luiza Mendonça, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Ao avô querido do neto Sabido,
com muito carinho e saudade...
Paurilo Cavalcante Lima.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeira, imensa e igualmente às mulheres da minha vida! Aquelas três pessoas mais especiais do mundo: minha querida e amada mãe, Luciane; minha mestra e companheira, irmã Luisa e minha companheira caçula superdotada, irmã Lívia! Cada uma, da sua maneira e no seu tempo, ensinou-me a amar e a dividir esse amor que não tem motivo para parar de crescer! Não deve ser fácil aturar meus altos e baixos tão de perto e por tanto tempo... Obrigado por me darem sempre segundas chances e por me estimularem a sempre fazer o bem e o meu bem, o meu melhor! Vejo em vocês toda esperança do mundo e de uma vida sempre melhor!

Agradeço ao meu pai, Eduardo, por todo apoio durante toda minha caminhada. Não só apoio financeiro que, embora essencial, de nada serviria se você não acreditasse em mim! Obrigado por nunca ter me forçado a seguir nenhuma carreira diferente daquela que escolhi. Vejo muitos pais fazerem isso com seus filhos e observo a tristeza de profissionais recém-formados e já absolutamente frustrados. Sou muito grato por ter a chance de seguir meu sonho com todo conforto e confiança!

Agradecer a toda minha família, dos dois lados, por todo apoio sempre! Agradeço especialmente aos meus avós, Myrthes e Paurilo, Iza e Almir, por sempre escutarem minhas histórias, ainda que inventadas. Agradeço por me permitirem iniciar minha vida científica na cozinha, na biblioteca, no sótão, no jardim e aonde mais a minha curiosidade quisesse ir!

Agradeço aos irmãos que a vida me deu: os irmãos do Bronx, Rafael, João Carlos, Pedro, Ronaldo, Filipe e Caio; os irmãos e irmãs do Santa Mônica, Isabella, Camila, Raissa, Leo Chagas, Allyce, Matheus, Ana Clara, CamDam e Dora (você não é do CSM, mas é quase!); os irmãos e irmãs da Turma do Bomba, Sidcley, Bia, Bruno, Crackinho, Bomba, Ana Gabi e Manu! Vocês todos, além de mostrarem novas perspectivas de vida, deram-me o espaço para dividir minhas concepções e criar novas ideias! Fizeram do meu tempo “livre” os momentos mais divertidos e intensos que não poderia viver ao lado de outras pessoas!

Agradeço à Giovana Angelice por despertar meu melhor em tão pouco tempo! Por me fazer querer ser responsável por algo que realmente valha a pena, por dividir ideias e por saber discordar de mim sem me julgar ou brigar, mas sim me ouvindo e querendo me entender!

Agradeço imensamente ao meu orientador Renato por todas as oportunidades ao longo desses três anos de estágio no Laboratório de Virologia Molecular. Obrigado por me aceitar como aluno quando eu ainda não sabia absolutamente nada sobre ciência e sobre a vida de laboratório! Também agradeço pela oportunidade de mudar de projeto, entrando na área de pesquisa sobre o ZIKV, o que, não só gerou grandes publicações para o grupo, mas também me possibilitou trabalhar com amostras clínicas, permitindo-me ter uma visão mais clara de que nosso trabalho pode ajudar muitas pessoas. Posso dizer que realizo um sonho graças a esta chance que me deu.

Agradecer aos amigos e mestres do Laboratório de Virologia Molecular. Um agradecimento especial à minha querida co-orientadora, Luiza Higa. Não posso dizer muito sobre paciência, mas você me acolheu num momento muito conturbado para todos do laboratório e não desistiu de mim, mesmo com minhas falhas e teimosias. Com você, não só aprendi a fazer experimentos, a ler artigos ou a escrever, mas aprendi a lidar com pessoas e com níveis hierárquicos sem perder a noção do meu lugar. Agradeço também aos meus companheiros do Team Zika: Rodriguinho, Paula, Ana Lu e Loraine. Vocês fizeram horas infindáveis de trabalho as horas mais alegres que jamais imaginei ter! Agradeço também ao Victor, ao Taoli, à Pessoainha, , ao Gabriel, ao Átila, à Tailah, à Paola, ao Itamar, à Velozoca, à Cla, à Alice, à Diana, à Lídia e ao Lucas por aturarem minhas besteiras nos intervalos de experimentos!

Agradeço imensamente pela confiança e pelas oportunidades que o professor Amilcar e o professor Orlando depositaram em mim durante esses anos no laboratório.

Agradeço às demais pessoas que de alguma forma contribuíram na elaboração deste trabalho e no meu crescimento como cidadão e profissional.

Agradeço às agências de fomento CNPq e FAPERJ, sobretudo com relação à Rede Zika, pela qual conseguimos realizar este trabalho e as demais publicações do nosso grupo.

“The best revenge is to live on and prove yourself” – Eddie Vedder.

RESUMO

Fábio Luís Lima Monteiro

Implementação da técnica de imunofluorescência indireta para detecção de IgG anti-ZIKV e anti-DENV

Orientador: Renato Santana Aguiar
Coorientadora: Luiza Mendonça Higa

Resumo da Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Embora a infecção pelo vírus Zika (ZIKV) tenha sido, por muitos anos, associada a pequenos surtos de quadros febris brandos e inespecíficos, atualmente o vírus ZIKV emerge como um grave problema de saúde pública, visto sua associação a neuropatias e a casos de malformações congênitas em infantes cujas mães foram infectadas durante a gestação, além de sua expansão mundial. Durante o pico da epidemia de ZIKV no Brasil, o Ministério da Saúde não dispunha de testes sorológicos específicos para ZIKV, dificultando o diagnóstico laboratorial. Além disso, a janela de detecção do RNA viral no sangue e na urina é curta, limitando-se às primeiras semanas de infecção. Este fato ressaltou a importância do desenvolvimento de melhores técnicas de diagnóstico sorológico específico para ZIKV, sobretudo após a fase aguda da infecção. Um limitante no diagnóstico sorológico para ZIKV é a reatividade cruzada com anticorpos anti-vírus da dengue (DENV), visto que estes vírus são semelhantes antigenicamente e co-circulantes em diversas regiões do país. Portanto, neste trabalho implementamos uma técnica de imunofluorescência indireta (IFI) que compara a reatividade da amostra testada (soro ou sangue) ao ZIKV e ao DENV. A plataforma de análise desta técnica consiste em células VERO infectadas ou não com ZIKV ou DENV. A detecção dos anticorpos IgG específicos para os vírus é feita pela incubação com anticorpo secundário anti-IgG humana conjugado a um fluoróforo, permitindo a visualização das células infectadas no microscópio de fluorescência. Para validar a técnica, foram testadas amostras com diagnóstico exclusivo para ZIKV ou dengue. A análise das mesmas demonstrou que, durante a fase aguda das duas infecções, os indivíduos não apresentaram reatividade para nenhum dos vírus testados. Já na fase convalescente, foi detectada reatividade positiva para cada caso. A partir deste resultado, foi possível determinar a soroconversão para ZIKV de três indivíduos envolvidos em casos de transmissão do vírus por transfusão de plaquetas em banco de sangue. Além disso, a IFI foi utilizada para diagnóstico sorológico de amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação. A análise das mesmas demonstrou uma heterogeneidade com relação à reatividade ao DENV, o que inviabilizou a associação dos títulos destes anticorpos ao desfecho das malformações nos neonatos neste trabalho. A análise do sangue de cordão umbilical de um destes neonatos com quadro de microcefalia demonstrou a presença de IgG anti-ZIKV, evidenciando a imunidade passiva contra o ZIKV. Em conjunto, a análise de todas

essas amostras mostrou que a IFI proposta foi eficiente como ferramenta auxiliar no diagnóstico destes pacientes.

Palavras-chave: Vírus Zika; Dengue; sorologia; transfusão de plaquetas; gestação; microcefalia.

ABSTRACT

Fábio Luís Lima Monteiro

Implementation of the indirect immunofluorescence assay to detect IgG anti-ZIKV and anti-DENV

Orientador: Renato Santana Aguiar
Coorientadora: Luiza Mendonça Higa

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Although Zika virus (ZIKV) infection has been for many years associated with small outbreaks of unspecific mild fever cases, now ZIKV emerges as a great public health problem, because of its association with neuropathies and with congenital malformations in infants whose mothers has been infected during pregnancy, and also by its expansion worldwide. During the peak of ZIKV epidemics in Brazil, in the beginning of 2016, the Health Ministry did not have access to serological tests specific for ZIKV, diffculting the laboratorial diagnosis. Besides that, the period of detection of the viral RNA in blood and in urine samples is short, being limited to the first weeks of infection. This fact emphasized the importance in the development of better assays for specific serological diagnosis of ZIKV, especially after the acute phase of infection. A limitation in the serologic diagnosis is the cross-reactivity between anti-dengue virus (DENV) antibodies, as theses virus are antigenically similar and co-circulates in the country. Therefore, in this work we implemented an indirect immunofluorescence (IFI) assay that compares the reactivity of a given sample (serum or blood) to ZIKV and to dengue virus (DENV). The platform for analysis in this assay consists of VERO cells infected or not with ZIKV or DENV. The detection of specific IgG antibodies against these viruses is made by the incubation of an anti-human IgG secondary antibody conjugated with a fluorophore, enabling the visualization of the infected cells through a fluorescence microscope. In order to validate the assay, samples with exclusive diagnose for ZIKV or DENV have been tested. Analysis of these samples showed that, during the acute phase of both infections, the patients did not show any reactivity for any of the virus used. Nevertheless, in convalescent phase positive reactivity has been detected for each case. From this result, it was possible to determine the seroconversion of three patients involved in the case of ZIKV transmission by platelet transfusion in blood banks. Besides that, IFI was used for serologic diagnosis of samples from mothers exposed to ZIKV during pregnancy. Analysis of these samples showed a heterogeneity related to reactivity for DENV, unfeasibling the association between the antibody titers and the outcome of the malformations in neonates in this work. The analysis of blood from umbilical cord from one of these neonates with microcephaly revealed the presence of anti-ZIKV IgG, evidencing the passive immunity against ZIKV. Altogether, the analysis of all these samples showed that the IFI proposed was efficient as an auxiliary tool for the diagnosis of these patients.

Key-words: Zika Virus; Dengue; serology; platelets transfusion; pregnancy; microcephaly

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição espaço-temporal do ZIKV no mundo	2
Figura 2.	Distribuição dos casos notificados e confirmados de febre pelo ZIKV por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 37, Brasil, 2016	3
Figura 3.	Organização genômica do RNA de flavivírus	8
Figura 4.	Estrutura e morfologia da partícula viral de ZIKV	8
Figura 5.	Árvore filogenética de vírus pertencentes ao gênero <i>Flavivirus</i>	9
Figura 6.	Progressão dos marcadores da infecção em diferentes espécimes clínicos	10
Figura 7.	Esquema da metodologia de IFI	20
Figura 8.	Linha do tempo sumarizando o caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas	22
Figura 9.	Análise de níveis de infecção de ZIKV e DENV2 por imunofluorescência	28
Figura 10.	Diferenças na reatividade para ZIKV e DENV2 entre as amostras do paciente 001	29
Figura 11.	IFI das amostras coletadas no surto de dengue ocorrido entre 2007 e 2008	30
Figura 12.	IFI de sangue de cordão umbilical de caso de síndrome congênita pelo ZIKV	32
Figura 13.	IFI do indivíduo doador de plaquetas	33
Figura 14.	IFI do receptor 1	34
Figura 15.	IFI do receptor 2	35
Figura 16.	Titulação das amostras de três mães expostas ao ZIKV durante a gestação (302, 524 e 623)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Etiologias mais comuns para ocorrência de microcefalia (congenita e pós-parto)	6
Tabela 2.	Amostras para o painel de validação da IFI com casos exclusivos de ZIKV ou DENV	21
Tabela 3.	Resultado do diagnóstico laboratorial dos três indivíduos envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas	24
Tabela 4.	Amostras das mães expostas ao ZIKV no estado da Paraíba	26
Tabela 5.	Interpretação das análises de IFI das amostras do caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas	35
Tabela 6.	Título de IgG anti-ZIKV e anti-DENV das amostras de mães da Paraíba obtido na IFI	39
Tabela 7.	Distribuição das amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação pelo respectivo título de IgG anti-DENV analisado por IFI	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl	microlitro
µm	micrômetro
°C	graus Celsius
x g	Força da gravidade
Å	Angstrom
AB	Isolado clínico de ZIKV do estado do Espírito Santo
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BR	Brasil
BSA	Albumina sérica bovina - <i>Bovine Seric Albumin</i>
CDC	<i>Central of Disease Control</i>
cDNA	DNA complementar – produto de transcrição reversa
CE	Cérebro de necropsia do natimorto
cm ²	Centímetro quadrado
CMC	Carboximetilcelulose
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DENV	Vírus da dengue
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Deoxiribonucleico - <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Imunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
g/l	grama por litro
IFI	Imunofluorescência indireta
Ig	Imunoglobulina
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa - <i>Japanese Encephalitis Virus</i>
LA	Líquido amniótico
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção - <i>Multiplicity of Infection</i>
MR766	Vírus Zika protótipo africano
Neg	Negativo
NS	Não estrutural - <i>Nonstructural</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino - <i>Phosphate-buffered saline</i>
PC	Perímetro cefálico
PFA	Paraformaldeído
PFU	Unidades formadoras de placa - <i>Plaque Forming Units</i>
PNRT	<i>Plaque Neutralization Reduction Test</i>
Pos	Positivo
RNA	Ácido Ribonucleico - <i>Ribonucleic Acid</i>
RT - PCR	<i>Retrotranscriptase – Polymerase Chain Reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SGM	Sangue materno
SNC	Sistema nervoso central
Sus	Suspeito
TA	Temperatura ambiente

TR	Teste rápido
UR	Urina
UTR	Regiões não Traduzidas - <i>Untranslated Region</i>
WNV	Vírus do Oeste do Nilo - <i>West Nile Virus</i>
YFV	Vírus da Febre Amarela - <i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	Vírus Zika – <i>Zika Virus</i>

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico do vírus Zika (ZIKV) e Epidemiologia	1
1.1.1 Primeiros casos de ZIKV da África e na Ásia	1
1.1.2 Emergência da Zika no Pacífico	1
1.1.3 ZIKV no Brasil	2
1.2 Manifestações Clínicas da infecção pelo ZIKV	4
1.2.1 Febre do ZIKV.....	4
1.2.2 Manifestações Neurológicas	5
1.2.3 Microcefalia e outras Malformações Congênitas	5
1.3 Transmissão	7
1.4 Classificação, Organização Genômica e Estrutura do ZIKV	7
1.5 Diagnóstico – Aplicações e Limitações	9
1.6 Dengue e ZIKV – Similaridades e Problemas	14
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos gerais	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Titulação viral	16
4.1.1 Propagação e Titulação de DENV	16
4.1.2 Propagação e Titulação de ZIKV.....	17
4.2 Determinação das condições de infecção para ensaio de imunofluorescência indireta	17
4.3 Preparo das placas para IFI	18
4.4 Imunofluorescência indireta com amostras de soro	19
4.5 Aquisição de imagens e análise	20
4.6 Pannel de Amostras a serem analisadas	20
4.6.1 Pannel de validação	20
4.6.2 Amostras do caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas	21
4.6.3 Amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação	25
5 RESULTADOS	27
5.1 Determinação das condições de infecção para ensaio de imunofluorescência indireta	27
5.2 Análise das amostras do pannel de validação por IFI	28
5.2.1 Amostras de paciente com diagnóstico confirmado para ZIKV	28
5.2.2 Amostras com diagnóstico confirmado para DENV	30
5.3 Análise de amostra de sangue de cordão umbilical por IFI	31
5.4 Diagnóstico sorológico dos pacientes envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas	33
5.5 Diagnóstico sorológico das mães expostas ao ZIKV no estado da Paraíba por IFI..	35
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	45

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9 ANEXOS	58
9.1 Anexo 1. Titulação das amostras dos pacientes envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas	58
9.1.1 Anexo 1a. amostra do indivíduo doador de plaquetas 11 dias após a data de transfusão (D+11)	58
9.1.2 Anexo 1b. amostra do receptor 1 coletada 4 dias antes da data de transfusão (R1-4)	59
9.1.3 Anexo 1c. amostra do receptor 1 coletada 6 dias após a data de transfusão (R1+6)	60
9.1.4 Anexo 1d. amostra do receptor 1 coletada 30 dias após a data de transfusão (R1+30)	61
9.1.5 Anexo 1e. amostra do receptor 2 coletada 23 dias após a data de transfusão (R2+23)	62
9.1.6 Anexo 1f. amostra do receptor 2 coletada após 51 dias da data de transfusão (R2+51)	63
9.2 Anexo 2. Artigo - <i>Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion</i>	64
9.3 Anexo 3. Artigo - <i>Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models</i>	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico do vírus Zika (ZIKV) e Epidemiologia

A ZIKV é uma arbovirose (virose transmitida por vetores artrópodes) de amplo espectro clínico. Seu agente etiológico, o ZIKV foi primeiramente isolado de um macaco sentinela, num trabalho de vigilância para Febre Amarela na floresta Zika, em Uganda, 1947. No ano seguinte, o ZIKV foi isolado de mosquitos *Aedes africanus* na mesma floresta, dando a primeira pista da forma de transmissão deste vírus (Dick; Kitchen; Haddow, 1952). A infecção em humanos só foi primeiramente documentada em 1954, sendo descrito um quadro febril brando e autolimitado em uma criança de 10 anos de idade (Macnamara, 1954). A partir daí, a doença em humanos limitou-se a pequenos surtos em regiões da África Subsaariana e do Sudeste da Ásia (Robin; Mouchet, 1975), com a maioria das infecções associadas a manifestações brandas e inespecíficas, quando não assintomáticas.

O ZIKV emergiu como um grave problema de saúde pública quando chegou ao Brasil em 2015 (Ramos da Silva; Gao, 2016). Na região Nordeste do país, foi observado um expressivo aumento no número de fetos e neonatos microcefálicos, filhos de mães infectadas durante a gestação (Nunes et al., 2016). Este fenômeno fez a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretar a ZIKV como uma Emergência Internacional de Saúde Pública (Heymann et al., 2016).

1.1.1 Primeiros casos de ZIKV na África e Ásia

Embora as primeiras descrições de infecção pelo ZIKV em humanos tenham sido em 1954 (Macnamara, 1954), dados de sorovigilância para arboviroses demonstram que o vírus circulava em populações africanas desde 1951 (Musso; Gubler, 2016). A partir desta data, poucos quadros infecciosos associados à ZIKV foram documentados em países da África, como Uganda, Serra Leoa, Egito e em países da Ásia, como Malásia, Índia e Indonésia (Haddow et al., 2012).

1.1.2 Emergência do ZIKV no Pacífico

A primeira vez que o ZIKV saiu do eixo África-Ásia foi em 2007, no surto das Ilhas Yap, nos Estados Federados da Micronésia. Neste evento, estimou-se que 73% da população de acima de três anos de idade estava infectada pelo ZIKV (Duffy et al., 2009).

Durante este surto da Polinésia Francesa em 2013, foi observado um aumento no número de casos da Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma neuropatia autoimune pós-

infecciosa (Winer, 2001). Embora esta síndrome tenha sido associada a diversos patógenos, o estudo de caso-controle realizado por Cao-Lormeau e colaboradores em 2014, na Polinésia Francesa, mostrou que o ZIKV poderia estar associado a esta manifestação neurológica (Cao-Lormeau et al., 2016).

A rápida disseminação do ZIKV pelas ilhas do Pacífico, bem como a associação deste vírus a neuropatias, deixou as autoridades de saúde do mundo todo em alerta sobre a ZIKV. Entretanto, o estado de emergência internacional com relação à ZIKV só foi decretado em 2016, após a chegada do vírus ao Brasil e sua associação a malformações congênitas (Heymann et al., 2016; Nunes et al., 2016; Ramos da Silva; Gao, 2016). O histórico da distribuição geográfica do ZIKV está resumido na Figura 1.

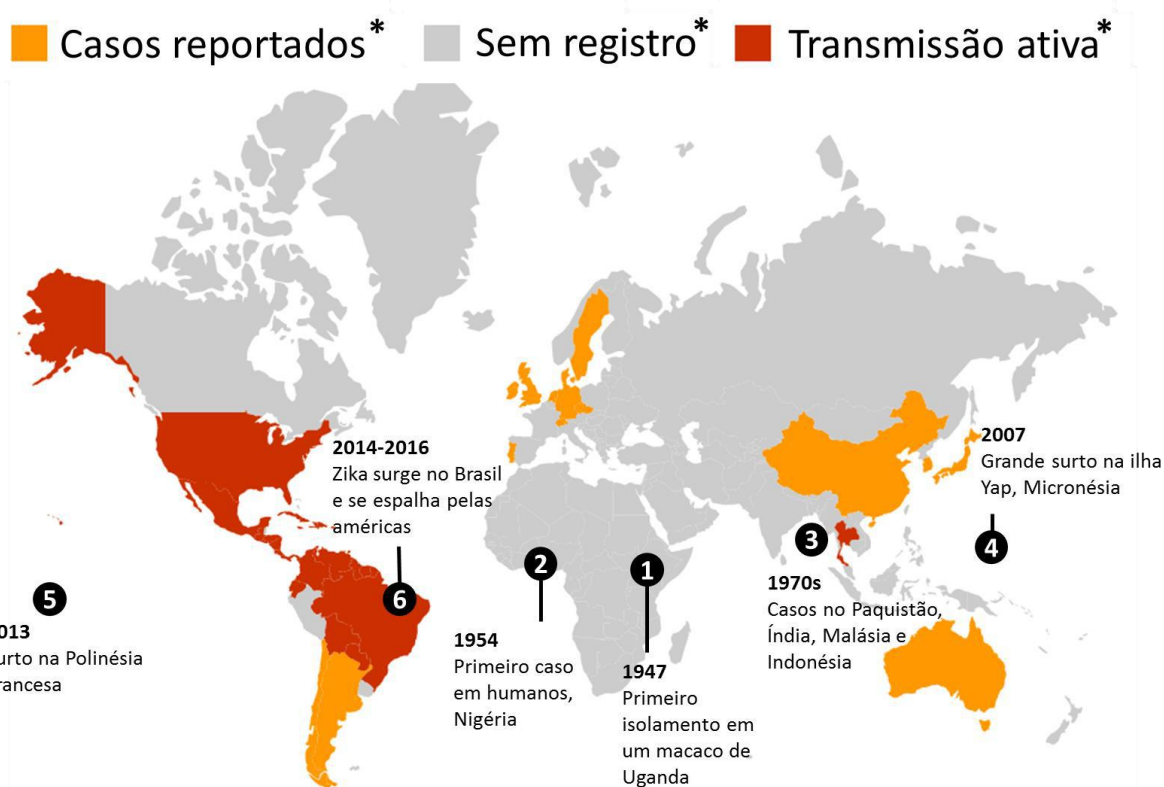


Figura 1. Distribuição espaço-temporal do ZIKV no mundo.

Casos reportados incluem casos importados e casos autóctones de febre pelo ZIKV; transmissão ativa é definida pela transmissão do ZIKV por picada de mosquito ou por contato sexual entre humanos.

Fonte: Adaptado de DirectRelief, março de 2016 (<https://www.directrelief.org/emergency/ZIKV-virus/>).

1.1.3 ZIKV no Brasil

Os primeiros casos de transmissão autóctone no Brasil foram descritos no início de 2015, no estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do país. Neste trabalho, os

pacientes analisados apresentavam um quadro semelhante à Febre do Dengue. Os testes destes indivíduos excluíram outras arboviroses circulantes na mesma região (Dengue e Chikungunya) (Zanluca et al., 2015).

Segundo o Boletim da Semana Epidemiológica 37 de 2016, emitido pela Secretaria de Vigilância em Saúde, todas as unidades federativas do Brasil apresentam casos autóctones de infecção pelo ZIKV. Até essa semana epidemiológica foram notificados 200.465 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país. Todos notificados por sintomatologia clínica sem diagnóstico laboratorial confirmado. A distribuição destes casos pelo território brasileiro está ilustrada no mapa da Figura 2.

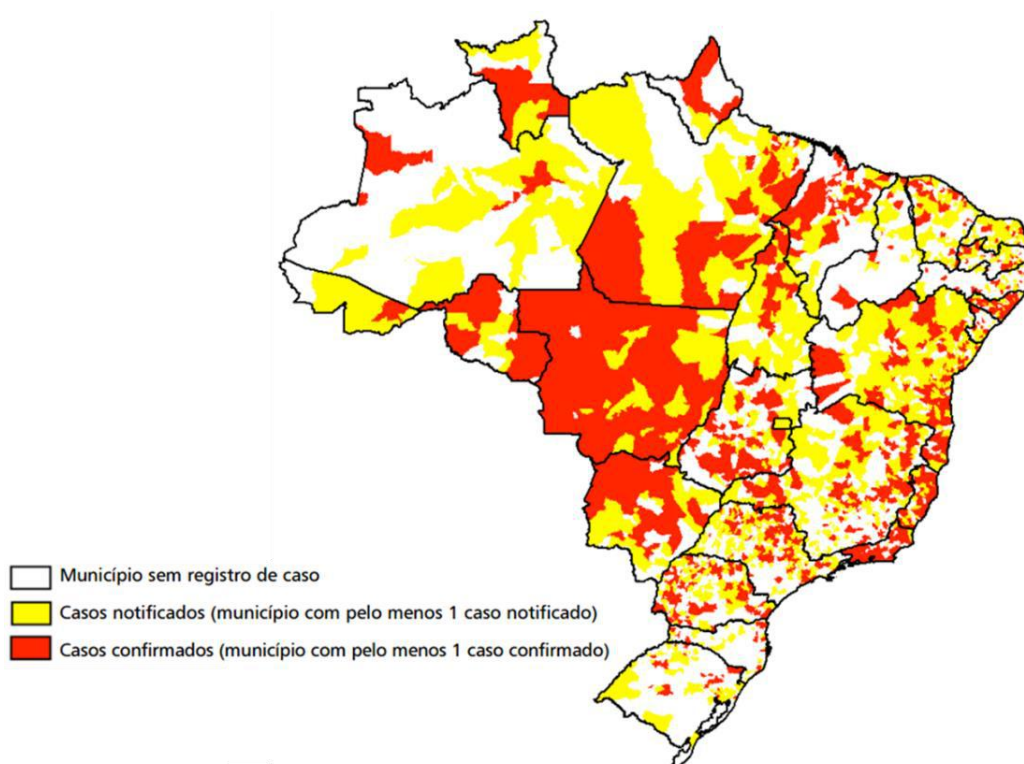


Figura 2. Distribuição dos casos notificados e confirmados de febre pelo ZIKV por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 37, Brasil, 2016.

Fonte: adaptado de Sinan-NET (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016). Atualizado em 19/09/2016.

Com relação à SGB e a outras manifestações neurológicas no Brasil, foi observado um fenômeno semelhante ao ocorrido na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014. No início de 2015, conforme o ZIKV se estabelecia e se expandia no Brasil, o número de casos de SGB aumentou. Em maio de 2015, foram descritos 7 casos de SGB precedidos de infecção pelo ZIKV na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Já em julho deste mesmo ano, em Pernambuco, foram descritos 6 casos de manifestações neurológicas precedidas por quadro

infeccioso, todos confirmados por RT-PCR para o ZIKV. Destes pacientes, 4 foram diagnosticados com SGB e dois com encefalomielite aguda disseminada (Araujo; Ferreira; Nascimento, 2016).

No que se refere à microcefalia, a suspeita da relação entre esta malformação congênita e a infecção pelo ZIKV foi primeiramente estabelecida quando houve relato do aumento no número desses casos no estado de Pernambuco, na região Nordeste do Brasil, em outubro de 2015, segundo o Boletim Epidemiológico emitido naquela data (Ministério da Saúde; Centro de Operações de Emergência e Saúde Pública sobre Microcefalias, 2015). Nesse momento foram descritos dois casos de mães com quadro sugestivo de febre do ZIKV que deram à luz a crianças com microcefalia. Embora em nenhuma destas pacientes tenha sido detectado o genoma viral em amostras de soro, a RT-PCR positiva para ZIKV do líquido amniótico de ambas foi o primeiro indício de transmissão intrauterina do ZIKV (Oliveira Melo et al., 2016). A partir daí, em outros casos semelhantes o ZIKV foi detectado no líquido amniótico de mães infectadas (Calvet et al., 2016) e no cérebro de infantes microcefálicos (Melo et al., 2016; Mlakar et al., 2016a), tornando mais sólida a associação da ZIKV com os casos microcefalia em neonatos. O progressivo aumento no número de casos de microcefalia associada ao ZIKV fez a OMS decretar estado de emergência internacional (Heymann et al., 2016). A detecção do vírus no cérebro de um feto com microcefalia, caso importado do Brasil (Mlakar et al., 2016), e em tecidos de gestantes ressaltou a importância da transmissão vertical do ZIKV no estabelecimento da microcefalia durante a gestação. Até 02 de julho de 2016, 8.301 casos foram notificados. Desses, 3.130 (37,7%) casos permanecem em investigação e 5.171 casos foram investigados e classificados, sendo 1.656 confirmados para microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central (SNC) sugestivos de infecção congênita e 3.515 descartados (Ministério da Saúde, Centro de Operações de Emergência em Saúde Pública sobre Microcefalias, 2016).

1.2 Manifestações Clínicas da Infecção pelo ZIKV

1.2.1 Febre do ZIKV

Na descrição da febre do ZIKV feita no surto da Micronésia, em 2007, a maioria dos pacientes apresentou febre baixa, *rash* cutâneo, artrite, conjuntivite e mialgia (Duffy et al., 2009). Embora o conjunto de sintomas, bem como sua intensidade, possa variar entre os pacientes, a febre do ZIKV é considerada uma manifestação benigna. Estima-se que apenas 20% dos indivíduos infectados irão desenvolver sintomas (Zanluca; Duarte dos Santos, 2016). Já foram descritos sintomas menos frequentes, como vômito, diarreia, dores abdominais,

tontura e anorexia (Olson et al., 1981). Outro fator também variável entre os pacientes é o tempo de incubação, ou seja, o tempo compreendido entre a picada da fêmea de mosquito infectada e o surgimento dos sintomas. Acredita-se que esse período dure entre 3 e 7 dias em média (Rudolph et al., 2014).

1.2.2 Manifestações Neurológicas

Antes do surto na Polinésia Francesa, nenhum caso de complicação relacionada à ZIKV foi relatado (Musso; Cao-Lormeau; Gubler, 2015), até que, durante este surto, a Síndrome de Guillain-Barré foi descrita como a primeira manifestação não branda da infecção pelo ZIKV (Musso; Nilles; Cao-Lormeau, 2014).

A SGB é uma doença de caráter autoimune que acomete a mielina da porção proximal dos nervos periféricos de forma aguda/subaguda. Aproximadamente 60-70% dos pacientes com SGB apresentam alguma doença aguda precedente (5 dias a 3 semanas antes), sendo a infecção o gatilho em 50% dos casos (Yuki; Hartung, 2012).

O aumento do número de casos de SGB conforme o ZIKV se espalhou pelas Américas, em 2015, reforçou a associação da ZIKV com a síndrome (Araujo et al., 2016). Em adição a estes dados, a descrição de epítomos na poliproteína do vírus com estruturas semelhantes a proteínas humanas auto-reconhecidas durante a SGB deixou ainda mais evidente a relação causal entre a ZIKV e a SGB (Lucchese; Kanduc, 2016).

Outras manifestações neurológicas, como a mielite aguda e a meningoencefalite, vêm sendo documentadas (Carteaux et al., 2016; Mecharles et al., 2016). Na maioria dos casos, a neuropatia se desenvolveu entre 5 e 7 dias após o quadro de Febre do ZIKV (Carteaux et al., 2016; Mecharles et al., 2016).

1.2.3 Microcefalia e outras Malformações Congênitas

As microcefalias constituem um achado clínico de etiologias variadas, como infecções ou condições genéticas, que podem ser originadas durante a gestação ou após o parto (World Health Organization, 2014). A OMS caracteriza microcefalia pela medida do perímetro cefálico (PC) de 2 desvios-padrões abaixo da média específica para cada sexo e idade gestacional, caracterizando como microcefalia grave PC abaixo de 3 desvios-padrões da respectiva média. Esta medição deve pode ser realizada durante a gestação por ultrassonografia ou logo após o parto (Petersen et al., 2016). As causas de microcefalia estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Etiologias mais comuns para ocorrência de microcefalia (congenita e pós-parto)

CONGÊNITA	PÓS-PARTO
Genética	Genética
Adquirida	Adquirida
Traumas disruptivos	Traumas disruptivos (como AVC);
Acidente Vascular Cerebral hemorrágico	Lesão traumática no cérebro
Infecções	Infecções
Sífilis	Meningites
Toxoplasmose	Encefalites
Rubéola	Encefalopatia congênita pelo HIV
Citomegalovírus	
Herpes simplex	
HIV	
Outros vírus	
Teratígeno	Toxinas
Álcool	Intoxicação por cobre
Radiação	Falência renal crônica
Diabetes materna mal controlada	

Fonte: adaptado de (Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância da Saúde, 2015).

Além da detecção do ZIKV em líquido amniótico (Calvet et al., 2016; Oliveira Melo et al., 2016), na placenta e em tecidos fetais (Mlakar et al., 2016; Roosecelis Brasil Martines et al., 2016) de casos de microcefalia associada à ZIKV, dados retrospectivos do surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013 demonstraram aumento nos casos de malformações congênitas do SNC (European Centre for Disease Prevention and Control, 2015). A partir da análise destes dados epidemiológicos e clínicos, em abril de 2016 o CDC divulgou a nota de confirmação do ZIKV como um agente causador de microcefalia (*CDC Concludes that ZIKV causes Microcephaly and other Birth defects* - <http://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0413-ZIKV-microcephaly.html>) (Rasmussen et al., 2016).

Dentre as alterações do SNC em fetos e neonatos congenitamente infectados pelo ZIKV, foram descritos casos de ventriculomegalia, calcificações no córtex cerebral e lisencefalia (Araujo et al., 2016; de Fatima Vasco Aragao et al., 2016; Melo et al., 2016). Alterações fora do SNC também estão sendo relatadas, como anormalidades oculares (de Paula Freitas et al., 2016; Melo et al., 2016; Ventura et al., 2016) e a artrogripose, que consiste em deformidades articulares nos membros superiores e inferiores com paralisia de movimentos (Schuler-Faccini et al., 2016).

1.3 Transmissão

Como um arbovírus, acredita-se que o ciclo enzoótico do ZIKV seja estabelecido entre mosquitos do gênero *Aedes* e primatas não humanos (Ioos et al., 2014). Já a transmissão em humanos, estudos epidemiológicos na Nigéria elegeram o *Aedes aegypti* como principal vetor nas áreas urbanas (Fagbami, 1979). Tendo em vista a grande eficiência do *Aedes aegypti* como vetor do ZIKV e a ausência de vacinas para esta infecção, as medidas de prevenção recaem sobre o controle da população deste mosquito (Zanluca; Duarte dos Santos, 2016).

Outra forma de transmissão emergente do ZIKV é por via sexual. O primeiro caso sugestivo de transmissão sexual do vírus foi descrito em 2008, quando um cientista americano que trabalhava com mosquitos no Senegal retornou aos EUA com sintomas de febre do ZIKV. Após ter relações sexuais com sua parceira, a mesma desenvolveu infecção sintomática pelo ZIKV (Foy et al., 2011).

O isolamento do vírus no sêmen foi feito durante o surto da Polinésia Francesa, em 2013. Neste caso, foram detectadas partículas virais infecciosas de ZIKV no sêmen até na fase convalescente da doença, sugerindo replicação viral no trato genital e urinário (Atkinson et al., 2016). No entanto, a transmissão sexual da ZIKV só foi confirmada quando um homem, após contrair a doença em uma região endêmica, retornou para sua casa no Texas, EUA, transmitindo a doença a sua parceira. Ambos foram confirmados para ZIKV, sendo o vírus detectado no sêmen (McCarthy, 2016).

Outra importante via de transmissão do ZIKV é a vertical, sendo dividida em transmissão perinatal e transplacentária (Musso; Gubler, 2016). A via perinatal pode ocorrer no momento do parto ou durante a amamentação, visto que já foram detectadas. A via transplacentária ocorre da mãe para o feto durante a gestação, sendo relacionada ao desenvolvimento das máis-formações congênitas causadas pelo ZIKV (Mlakar et al., 2016).

Além destas formas de transmissão do ZIKV, já foram relatados casos de transmissão via transfusão sanguínea (Musso et al., 2014).

1.4 Classificação, Organização Genômica e Estrutura do ZIKV

O ZIKV pertence à família viral *Flaviviridae*, fazendo parte do gênero *Flavivirus* juntamente com 52 outros vírus, como o vírus da dengue (*Dengue Virus* - DENV), o vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus* – WNV) e o vírus da Febre Amarela (*Yellow Fever virus* – YFV) (ICTV, 2014). As partículas virais do ZIKV, assim como as dos outros flavivírus, são envelopadas, ou seja, ao brotarem da célula hospedeira incorporam parte da membrana plasmática da mesma formando um envoltório sobre o capsídeo viral (Harrison, 2013), e

carreiam um genoma de RNA (Ácido Ribonucleico - *Ribonucleic Acid*) fita simples, polaridade positiva, que possui uma única fase aberta de leitura, a qual codifica uma poliproteína que, durante o ciclo replicativo deste vírus, é clivada gerando três proteínas estruturais, C (capsídeo), preM (precursora de membrana) e E (envelope), e sete proteínas não-estruturais (NS – *Nonstructural*), NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, como mostra a Figura 3 (Lindenbach; Rice, 2003; Zanluca; Duarte dos Santos, 2016).

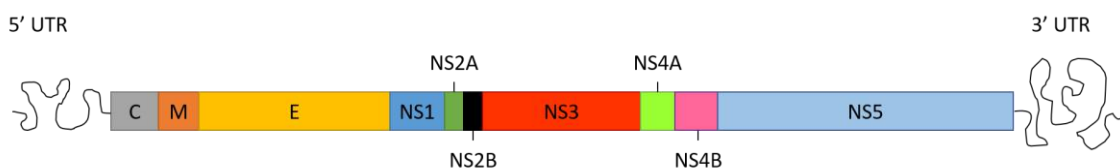


Figura 3. Organização genômica do RNA de flavivírus

Esquema da organização do material genético dos flavivírus, como ZIKV e DENV, mostrando a região codificante para a poliproteína flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTR – *Untranslated Region*), uma na extremidade 5' e outra na 3'.

Fonte: adaptado de (Guzman et al., 2010).

A estrutura e organização da partícula viral são mostradas na Figura 4.

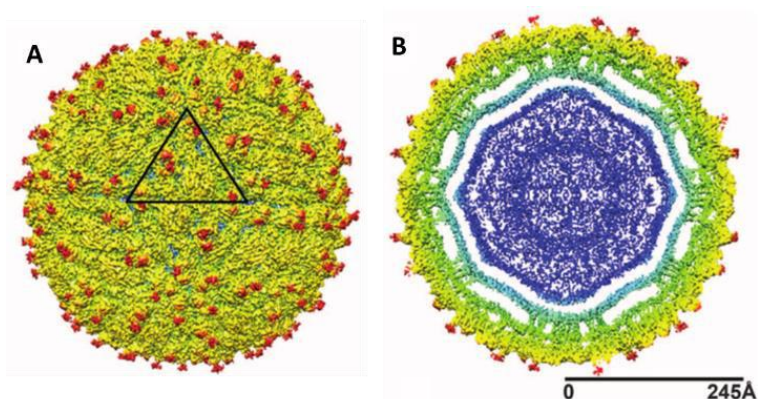


Figura 4. Estrutura e morfologia da partícula viral de ZIKV.

Imagens adquiridas por criomicroscopia; (A) Reconstrução da superfície da partícula viral; (B) secção transversal da partícula de ZIKV. Cores baseadas na distância radial entre a estrutura assinalada e o centro da partícula viral: azul – distância menor ou igual a 130 Å; ciano – entre 131 e 150 Å; verde – entre 151 e 190 Å; amarelo – entre 191 e 230 Å; vermelho – igual ou maior que 231 Å.

Fonte: adaptado de (Sirohi et al., 2016).

O ZIKV pode ser dividido em dois clados, o Africano e o Asiático (Berthet et al., 2014; Zanluca; Duarte dos Santos, 2016). Dentre algumas diferenças na sequência de nucleotídeos destes genótipos, existe a inserção de um sítio adicional de glicosilação na proteína E nas linhagens asiáticas. Esta aquisição já foi descrita para outros flavivírus, como o WNV, e pode estar associada a diferenças na patogênese e no tropismo entre o ZIKV Africano e o Asiático (Faye et al., 2014; Haddow et al., 2012; Qin; Qi; Gao, 2016; Sirohi et al., 2016).

Análises filogenéticas demonstraram que o vírus responsável pela epidemia da Polinésia Francesa pertence ao clado asiático, juntamente com a cepa isolada no surto da Micronésia, em 2007, e no Camboja em 2010 (Cao-Lormeau, 2014; Musso; Nilles; Cao-Lormeau, 2014). O sequenciamento e a análise dos primeiros casos de ZIKV no Brasil também demonstrou que estes vírus tinham alto grau de identidade com o vírus do clado Asiático de ZIKV (Zanluca et al., 2015), como mostrado na Figura 5.

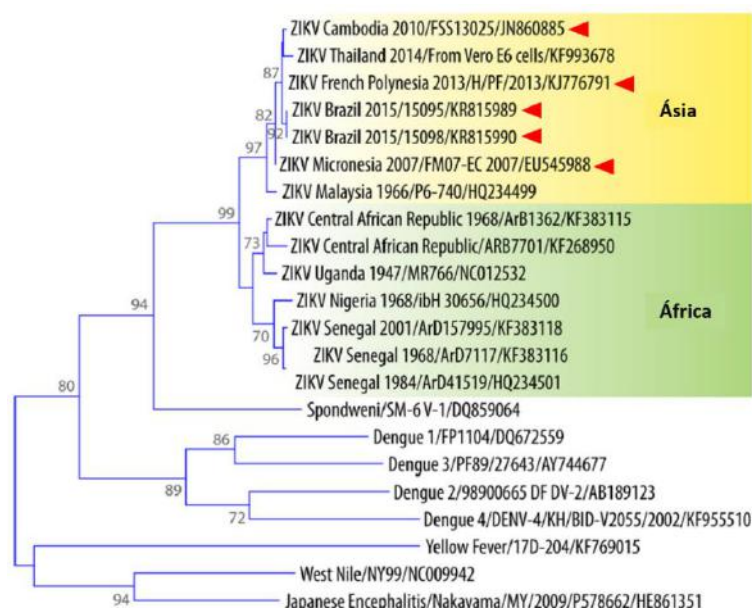


Figura 5. Árvore filogenética de vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*

Análise filogenética entre o DENV, YFV, WNV, vírus da Encefalite Japonesa (JEV – *Japanese Encephalitis Virus*), o vírus *Spondweni* e o ZIKV. Na árvore, estão evidenciados os clados Asiático e Africano do ZIKV em amarelo e verde, respectivamente. Os isolados do Camboja (2010), Polinésia Francesa (2013), Brasil (2015) e Micronésia (2007) estão destacados pelas pontas de seta vermelhas; análises baseadas no sequenciamento parcial do gene codificante para a proteína de envelope E.

Fonte: Adaptado de (Musso; Gubler, 2016).

1.5 Diagnóstico – Aplicações e Limitações

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV pode ser realizado pela detecção direta da partícula viral e seus componentes, como antígenos proteicos e material genético, ou pelo monitoramento da resposta de anticorpos pelo indivíduo infectado. A técnica apropriada para tal diagnóstico irá depender do tempo de infecção e do espécime clínico a ser analisado (Martínez de Salazar et al., 2016a; Musso; Gubler, 2016). A figura 6 esquematiza como os marcadores da infecção evoluem ao longo do tempo.

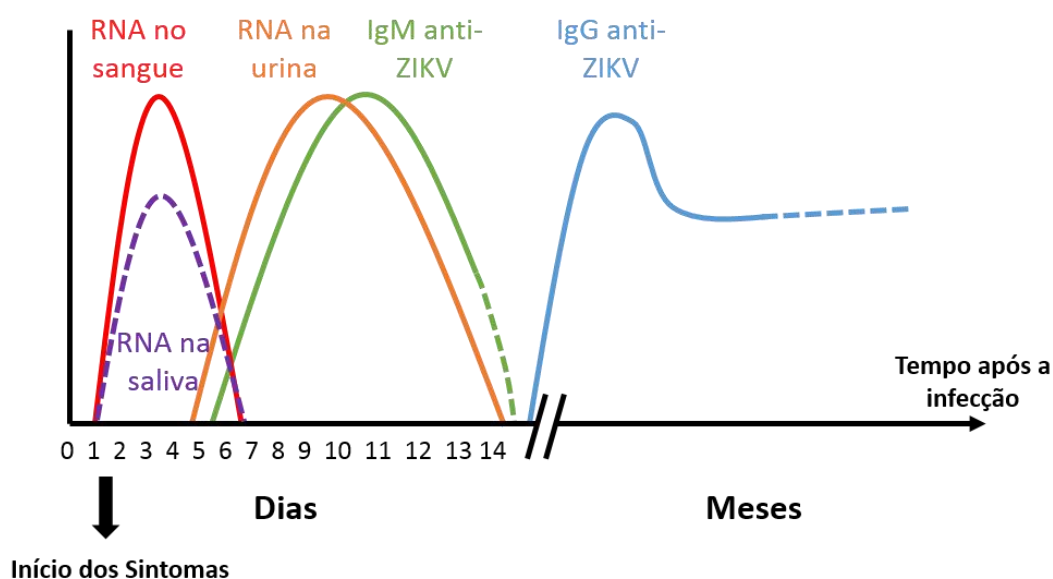


Figura 6. Progressão dos marcadores da infecção em diferentes espécimes clínicos.

Fonte: adaptado de (Charrel et al., 2016; Martínez de Salazar et al., 2016b)

O diagnóstico de ZIKV mais específico e definitivo se dá pela detecção do RNA viral por RT-PCR (Lanciotti et al., 2008). Esta técnica depende de uma etapa prévia de transcrição reversa do RNA viral presente na amostra para gerar um DNA complementar (cDNA). A amplificação e detecção do cDNA é feita com o uso de iniciadores e sondas fluorescentes complementares a regiões específicas do genoma viral (Decallonne; Bouillon, 2003). O conjunto iniciadores-sonda torna esta abordagem bastante específica, tornando mínimas as chances de reatividade cruzada com outros flavivírus.

Entretanto, a curta janela de viremia (cerca de 3 a 5 dias após o início dos sintomas), limita o uso da técnica em amostras de sangue ou soro apenas à fase aguda da infecção (Martínez de Salazar et al., 2016b). Apesar disso, estudos mostram que a presença de RNA viral na urina se dá por mais tempo (até 15 dias após o início dos sintomas), permitindo uma alternativa de amostra para testagem (Gourinat et al., 2015; Korhonen et al., 2016; Shinohara et al., 2016).

A detecção da resposta de anticorpos pelo hospedeiro, ou seja, o exame sorológico, tem importância nos casos em que a detecção direta do vírus e seus componentes não é possível (Fierz, 2004). Na infecção pelo ZIKV, a presença de anticorpos da classe IgM, específicos contra o ZIKV, circulantes no sangue é um indicativo de infecção recente, visto que esta classe começa a ser produzida entre 5 a 6 dias após o início dos sintomas (Lanciotti et al., 2008; Martínez de Salazar et al., 2016b; Zanluca; Duarte dos Santos, 2016). Ainda não

se sabe o tempo para soroconversão, ou seja, tempo necessário para se iniciar a produção de anticorpos da classe IgG, na ZIKV. Apesar disso, é recomendada a sorologia pareada entre soro de fase aguda e soro de fase convalescente (pelo menos duas semanas de diferença entre as coletas), demonstrando um aumento de quatro vezes no título de anticorpos contra ZIKV entre as amostras (Lanciotti et al., 2008; Marcondes et al., 2015).

As técnicas mais recomendadas para sorologia anti-ZIKV são: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT), Imunofluorescência Indireta (IFI) e testes rápidos (TR) (Haddow et al., 2012). O princípio de cada um desses testes é brevemente descrito:

- ELISA: para a detecção de anticorpos, a amostra em análise é incubada sobre uma matriz sólida contendo antígenos do agente infeccioso imobilizados. Os anticorpos específicos contra o patógeno em questão, caso existam na amostra, irão se ligar nos antígenos. Os mesmos serão detectados com anticorpos contra a porção constante (Fc) do anticorpo do hospedeiro fusionados a enzimas. Estas enzimas, então, são capazes de converter substratos específicos alterando sua cor, o que permite uma análise colorimétrica da reação (Engvall; Perlmann, 1971);
- PRNT: esta técnica avalia a capacidade de um soro em neutralizar partículas virais e, consequentemente, em reduzir a formação de placas de lise numa monocamada de células susceptíveis a este vírus. Uma suspensão viral de título conhecido e constante é previamente incubada com diluições seriadas da amostra em estudo. Posteriormente, esta suspensão é incubada sobre uma monocamada de células, sendo então coberta com meio semissólido, impedindo que as partículas virais se difundam pelo meio. Este tipo de sistema permite que a infecção viral, quando não neutralizada, se restrinja a focos de lise celular. Estes focos podem ser contados após a fixação e coloração das células. O título de anticorpos neutralizantes presentes na amostra é recíproco da diluição capaz de reduzir 50% (PRNT₅₀) ou 90% (PRNT₉₀) dos focos de lise (Initiative for Vaccine Research, 2007);
- IFI: nesta técnica, a plataforma de análise são células de linhagem infectadas com o vírus em estudo. Estas células, após a infecção em placas ou lâminas, são fixadas e incubadas com a amostra de soro. Os anticorpos contra este vírus, caso presentes, irão se ligar nos antígenos presentes na monocamada de células infectadas. Para a detecção destes anticorpos, são utilizados anticorpos anti-Fc do hospedeiro fusionados a

fluoróforos, permitindo a visualização das células infectadas ao microscópio de fluorescência (Cha et al., 2014);

- TR: testes rápidos são assim chamados por proverem resultados em até 30 minutos de reação. Os mesmos podem ser muito variados, mas aqueles voltados para sorologia baseiam-se nos mesmos princípios do ELISA, diferindo por utilizar uma plataforma imunocromatográfica para análise e imobilização de antígenos virais (Vaz, Takei e Bueno, 2007).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, todos os casos suspeitos de febre do ZIKV são de notificação compulsória nacional, devido à ocorrência de óbitos, neuropatias e malformações congênitas associadas à ZIKV (Ministério da Saúde, 2015). Segundo a nota, os casos são definidos como:

Caso suspeito: Pacientes que apresentem exantema máculo-papular pruriginoso acompanhado de DOIS ou mais dos seguintes sinais e sintomas:

- Febre OU;
- Hiperemia conjuntival sem secreção e prurido OU;
- Poliartralgia OU;
- Edema periarticular.

Caso confirmado: caso suspeito com um dos seguintes testes positivos/reagentes específicos para diagnóstico de ZIKV:

- Detecção de RNA viral por RT-PCR;
- Sorologia IgM.

O diagnóstico definitivo em casos de neuropatias, como a SGB, é de suma importância, já que outros arbovírus que co-circulam em regiões endêmicas para o ZIKV são também associados a estas patologias, como é o caso do DENV (Solomon et al., 2000) e do vírus da Chikungunya (Amrani et al., 2007).

Para contemplar a situação de gestantes, o Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central, do Ministério da Saúde, estabeleceu as diretrizes para o acompanhamento da gestante e da criança durante e após a gestação, bem como os procedimentos a serem realizados com natimortos ou em casos de aborto espontâneo (Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância da Saúde, 2015). Segundo o protocolo, as principais técnicas utilizadas no diagnóstico das mães e dos nascidos

vivos é a RT-PCR e a sorologia IgM. Já no diagnóstico *post mortem* dos infantes acometidos, são recomendadas as técnicas de imunohistoquímica para detecção de antígenos virais e de RT-PCR em fragmentos de cérebro, fígado, coração, pulmão, rim e baço.

É importante ressaltar que no início da epidemia de ZIKV no Brasil até o início de 2016, o Ministério da Saúde não dispunha de kits comerciais para sorologia contra ZIKV (Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2016). No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), aprovou recentemente dois kits para sorologia IgM e IgG contra ZIKV, os quatro sorotipos de DENV e CHIKV, todos da empresa Euroimmun, baseados na técnica de imunofluorescência indireta (portal.anvisa.gov.br).

No surto de 2007 nas Ilhas Yap, foram observados os primeiros problemas para diagnóstico de ZIKV. No início do surto, em abril de 2007, amostras de pacientes com quadro febril semelhante a dengue clássica foram reativas em um teste rápido para detecção de IgM anti-DENV. A infecção pelo ZIKV foi somente confirmada nestas amostras por RT-PCR e sequenciamento do produto de PCR. Em junho do mesmo ano, soro de outros pacientes foi submetido aos testes de RT-PCR, PRNT e ELISA para diversos flavivírus. Este trabalho concluiu que, quando o paciente já teve uma infecção prévia por algum flavivírus, como DENV, WNV ou JEV, haverá reatividade cruzada nos testes sorológicos utilizados nestas infecções quando o paciente for infectado pelo ZIKV. Em contrapartida, quando a ZIKV for a primeira infecção por flavivírus, esta reatividade cruzada será mínima nestes testes (Lanciotti et al., 2008).

Tendo em vista as limitações do diagnóstico para ZIKV por RT-PCR, além da possibilidade de co-circulação de outros flavivírus em várias regiões do mundo, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos do CDC propôs um guia para interpretação de testes sorológicos para ZIKV, baseando-se na interpretação dos resultados de ELISA IgM anti-ZIKV e anti-DENV juntamente com os resultados do PRNT para estes vírus (Rabe et al., 2016).

No Brasil, bem como em outras regiões do mundo, outro importante complicador do diagnóstico sorológico para ZIKV é o histórico de circulação dos quatro sorotipos do DENV, além da cobertura da vacinação contra Febre Amarela, doença causada por outro flavivírus, em algumas regiões do país (Estofolete et al., 2016).

1.6 Dengue e ZIKV – Similaridades e Problemas

Embora a expansão do ZIKV no continente americano seja recente (Hennessey; Fischer; Staples, 2016), a circulação do vírus da Dengue (DENV) nestas regiões é de longa data (Wilson; Chen, 2002). O DENV, assim como o ZIKV, é um flavivírus, sendo conhecidos 4 sorotipos deste vírus (Wang et al., 2000).

Ainda que a maioria dos indivíduos sintomáticos para a infecção do DENV apresente um quadro febril autolimitado, alguns pacientes desenvolvem dengue grave que é potencialmente fatal (Oishi et al., 2007). O fato desta manifestação clínica ser mais comum em indivíduos previamente expostos a outro sorotipo do DENV demonstra que existe um papel importante na resposta imunológica heterotípica na patogênese da dengue grave (Screaton et al., 2015).

Uma hipótese para este mau prognóstico de uma infecção heterotípica é o fenômeno da ADE (*Antibody dependent enhancement* – aumento dependente de anticorpos) (Screaton et al., 2015). Na ADE, a presença de anticorpos não neutralizantes, mas capazes de opsonizar partículas virais de um determinado sorotipo, aumenta a entrada destes vírions em células de linhagem monocítica e granulocítica, a partir de receptores celulares para a porção Fc dos anticorpos, aumentando a carga e replicação viral nestas células (Tirado; Yoon, 2003).

A ADE já foi descrita em várias famílias virais, bem como entre diferentes espécies de vírus. No entanto, a maioria dos trabalhos demonstrou este fenômeno *in vitro* (Tirado; Yoon, 2003). A primeira associação da ADE à severidade da dengue foi feita por Halstead e colaboradores em 1976 (Halstead et al., 1976).

Tanto a infecção pelo DENV quanto pelo ZIKV gera uma grande variedade de anticorpos. Dentre estes, existem aqueles específicos para o vírus responsável pela infecção, mas também existem aqueles capazes de reconhecer epítomos semelhantes entre o ZIKV e os quatro sorotipos do DENV (Lanciotti et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram a ADE tanto de soro DENV-específico sobre ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016) quanto soro ZIKV-específico sobre DENV (Kawiecki; Christofferson, 2016). A relevância disso *in vivo* ainda não foi elucidada, mas é possível que a pré-exposição ao Dengue em regiões endêmicas poderia gerar anticorpos que reconhecem as partículas virais de ZIKV em um paciente co-infectado de maneira a aumentar os níveis de entrada do ZIKV nas células gerando manifestações clínicas mais severas associadas a infecção por ZIKV. Além disso, a própria resposta imunológica contra Dengue em uma infecção prévia poderia ser suficiente para o recrutamento de células imunológicas e estabelecimento da infecção por ZIKV associada a casos mais severos, como microcefalia em neonatos (Ornelas et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A ZIKV emerge como um grave problema de saúde pública internacional devido à sua rápida expansão em diversas regiões do mundo, juntamente com o crescente número de casos de complicações associadas a esta infecção, como neuropatias e malformações congênitas.

O Laboratório de Virologia Molecular, durante o auge da epidemia de ZIKV e de microcefalia no início de 2016, recebeu amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação, além de amostras de pacientes envolvidos no caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas. Frente à necessidade de caracterizar melhor estas amostras e à ausência de kits comerciais para o diagnóstico sorológico na época, foi implementada a metodologia *in house* de IFI como ferramenta auxiliar no diagnóstico de ZIKV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estabelecer uma técnica de imunofluorescência indireta capaz de identificar anticorpos IgG contra ZIKV e DENV a serem utilizadas no diagnóstico sorológico de ZIKV, além de avaliar se a presença de anticorpos contra DENV em gestantes está associada ao desenvolvimento de microcefalia por ZIKV em neonatos.

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar a metodologia de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra DENV e ZIKV avaliando os melhores níveis de títulos virais (MOI), diluição de amostras clínicas e condições de pré-exposição com lisados celulares que apresentem os melhores resultados de desempenho da técnica;
- Avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos IgG contra ZIKV e DENV pela metodologia aqui estabelecida utilizando painéis de amostras com diagnóstico específico para essas duas patologias;
- Avaliar a metodologia de imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos contra ZIKV em diferentes amostras clínicas, incluindo soro, sangue total e sangue de cordão umbilical;
- Avaliar a soroconversão e presença de anticorpos contra ZIKV em casos suspeitos de transmissão transfusional do vírus;
- Avaliar a presença de anticorpos contra DENV em amostras de gestantes expostas ao ZIKV durante a gravidez e com diferentes desfechos clínicos de microcefalia em neonatos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Titulação viral.

4.1.1 Propagação e Titulação de DENV

A cepa de DENV2 utilizada nesses estudos foi a 16681, cepa protótipo de DHF de origem tailandesa (Diamond et al., 2000), gentilmente cedida pela professora Claire Kulbeka (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil).

A propagação de DENV2 foi feita em células de mosquito *Aedes albopictus*, C6/36. Estas células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (TPP, Suíça) com 25 ml de meio de cultura L-15 (Thermo Fisher Scientific, EUA) suplementado com 0,3% de triptose, 0,75 g/l de bicarbonato de sódio, 2 mM de glutamina e aminoácidos não essenciais, contendo 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen), a 28°C, em estufa do tipo B.O.D. Para a produção dos estoques virais, as células C6/36 foram infectadas pelo DENV2 na MOI (*Multiplicity of Infection* - Multiplicidade de Infecção) de 0,1 em meio de cultura L-15 sem SFB por 90 minutos. Após esta etapa de adsorção, o inóculo viral foi removido e as células foram cultivadas em meio L-15 suplementado com SFB 2% por até 9 dias de infecção. Após esse tempo, o meio de cultura contendo as partículas virais foi coletado e centrifugado a 300 x g por 10 minutos e filtrado em membrana de 0,22 µm para a remoção de células e restos celulares. Finalmente, o sobrenadante foi aliquoteado em tubos criogênicos estéreis e armazenados a -80°C. Os títulos dos estoques virais foram determinados pelo ensaio de placa de lise.

Para o preparo das amostras controle, as células foram incubadas com sobrenadantes de células C6/36 não infectadas no lugar da incubação com o sobrenadante contendo o vírus.

Para a titulação dos estoques de vírus, foram utilizadas células BHK (*Baby Hamster Kidney*), que foram cultivadas em placas de 100 mm contendo 10 ml do meio de cultura α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) suplementado com 5% de SFB, a 37°C, em câmara de incubação umidificada e com 5% de CO₂.

Células BHK confluentes foram infectadas em placas de 12 poços com diluições seriadas do estoque viral na ausência de SFB. Após o período de adsorção de 60 minutos, o inóculo viral foi retirado para a adição, por sobre as células, de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 1% em meio de cultura α -MEM suplementado com 0,5% de SFB. Após 5 dias, as células foram fixadas em formaldeído 4% por 1 hora e coradas em solução de cristal violeta 1% e etanol 20% por 40 minutos. O título foi calculado a partir do

número de placas contadas nos poços correspondentes às diluições e expresso em unidade formadora de placa por ml (PFU/ml).

4.1.2 Propagação e Titulação de ZIKV

Foi utilizada nesse estudo a cepa africana (MR766), cedida pelo professor Dr. Davis Ferreira (UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil) e dois isolados brasileiros, um proveniente de pacientes do estado do Espírito Santo (AB - BRZIKV_AB_ES; KX212103.1), cedido pela Dra. Ana Maria Bispo de Filips (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil) e outro do estado de Pernambuco (PE - Brazil/PE243/2015; KX197192.1), cedido pela Dra. Marli Tenório Cordeiro (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brasil), do ZIKV.

Os vírus MR766 e AB foram inoculados em células VERO (ATCC® CCL-81™, Manassas, VA 20108 USA) (MOI=0.01), já o vírus PE foi inoculado em células C6/36. Após 1 hora de incubação, o inóculo viral foi removido e, para as células VERO, o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 2% de SFB foi adicionado. Já para as células C6/36, foi adicionado o meio L-15 suplementado com 2% de SFB. As células foram incubadas por 4 dias. O meio condicionado contendo as partículas de ZIKV foi coletado e centrifugado a 300 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à filtração em membrana de 0,22 µm, aliquotado e armazenado a -80°C.

Os títulos dos estoques de ZIKV foram determinados pelo ensaio de placa de lise em células VERO. Monocamadas confluentes de VERO foram inoculadas com os estoques virais diluídos serialmente (até 8 vezes na base de 10). Após 1 hora de incubação, o inóculo foi descartado e as células incubadas com 1% de CMC em α -MEM suplementado com 1% de SFB. Após 5 dias, as células foram fixadas com formaldeído 4% e coradas com solução de cristal violeta (cristal violeta 0,5% em etanol 20%) para a contagem das placas de lise.

4.2 Determinação das condições de infecção para ensaio de imunofluorescência indireta

A fim de padronizar as placas de IFI, foi realizado um teste para avaliar em qual MOI seria observada uma taxa de infecção maior que 80% de células, com menor morte celular decorrente da infecção.

Neste teste, células VERO foram cultivadas em placas pretas com fundo transparente de 96 poços adequadas para análise de microscopia de fluorescência (Greiner Bio-One Brasil Produtos Médicos Hospitalares Ltda). As células foram plaqueadas numa densidade de $2,5 \times 10^3$ células por poço, sendo incubadas em DMEM *High-glucose* (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) suplementado com 5% SFB. Após 24 horas de incubação a

37°C e atmosfera de 5% de CO₂, o meio dessas células foi removido para a inoculação dos vírus.

Os quatro vírus utilizados no trabalho, MR766, AB, PE e DENV2, foram diluídos serialmente (2x) em meio DMEM *High-glucose* suplementado com 1% SFB, a partir da MOI=8 até 0,0625. Em cada poço da placa de 96, foram inoculados 30 µl desta suspensão viral, seguindo a etapa de adsorção na estufa (37°C, 5% de CO₂) por 1 hora. Após esta etapa, o inóculo foi removido e as células foram incubadas em DMEM *High-glucose* contendo 5% SFB durante 48 horas. Para finalizar a infecção, o meio condicionado de cada poço foi removido para a fixação das células em solução de PFA (paraformaldeído) 4% em PBS (*Phosphate-buffered saline* – Tampão fosfato salino) durante 15 minutos. Após a fixação, a monocamada de células foi lavada uma vez com PBS, sendo mantidas em PBS e estocadas a 4°C.

Após a fixação com PFA 4%, as células VERO foram bloqueadas e permeabilizadas com solução de BSA 3% em PBS contendo 0,1% de Triton X-100 durante 20 minutos à temperatura ambiente (TA). A monocamada de células é lavada uma vez com PBS. Foram então acrescidos 50 µl do anticorpo monoclonal 4G2 diluído em PBS nas proporções entre 1:2 e 1:8 (1 hora a TA). O 4G2 é um anticorpo gerado em linhagem de hibridoma murinho, com especificidade para um epítipo conservado na proteína E de flavivírus, permitindo detectar tanto células infectadas por ZIKV quanto por DENV. Para detecção do 4G2 é utilizado o anticorpo secundário *AlexaFluor 488 Donkey anti-Mouse IgG* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), diluído na proporção de 1:1000 em PBS (incubação por 40 minutos à TA).

Finalizada a imunomarcação com 4G2, as células foram então incubadas com solução de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), um intercalante de fita dupla de DNA (*Deoxyribonucleic acid* – Ácido Deoxiribonucleico), em PBS na proporção 1: 10.000 durante 10 minutos para marcação de núcleos. Após isso, as células foram lavadas com PBS e mantidas a 4°C até o momento de análise ao microscópio.

4.3 Preparo das placas para IFI

Células VERO foram cultivadas nas mesmas condições utilizadas no teste de MOI (item 4.2). A infecção foi realizada na MOI=1 para os quatro vírus utilizados, mantendo-se a infecção por 48 horas.

Foram preparadas placas com células infectadas por 48 horas com os vírus MR766, AB e DENV2 (MOI=1), além de outro conjunto de placas com os vírus PE e DENV2, ambos na MOI=1. Para todas as placas, foram feitos poços controle (condição Mock) com

sobrenadante de cultura de células não infectadas. Após a infecção, as monocamadas de VERO foram fixadas com PFA 4% em PBS, lavadas com PBS e estocadas a 4°C até o momento da IFI com as amostras de soro dos pacientes.

4.4 Imunofluorescência indireta com amostras de soro

Antes da incubação com as células VERO fixadas em placas adequadas para análise de microscopia de fluorescência, as amostras são incubadas com lisado de células VERO não infectadas durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante. Neste procedimento, a amostra é diluída na proporção de 1:80 em solução de BSA 3% em PBS, sendo o lisado celular equivalente a 10^6 células (lisadas por calor a 100°C) ressuspendido nessa solução. Ao final desta incubação, os tubos foram centrifugados a 20.000 x g por 5 minutos à TA para que o sobrenadante fosse coletado e serialmente diluído para marcar as células em placa. Esta etapa da IFI visa reduzir o ruído de marcação sobre células não infectadas. Para avaliar sua eficácia, foi feita a IFI de uma amostra sem este preparo.

As placas pretas contendo células VERO fixadas foram permeabilizadas e bloqueadas em solução de BSA 3% em PBS contendo 0,1% de Triton X-100 durante 20 minutos à TA. Ao final do bloqueio, a monocamada de células foi incubada com as amostras de paciente já diluídas serialmente. O sistema de detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV ou anti-DENV é feito com o *AlexaFluor 488 Goat anti-Human IgG* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), anticorpo específico para IgG (Imunoglobulina classe G) humana conjugado a um fluoróforo capaz de emitir fluorescência na faixa da cor verde. Este anticorpo é diluído na proporção de 1:1000 em PBS para a incubação de 40 minutos à TA na placa. Após esta incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS. A marcação de núcleos foi feita da mesma maneira que no teste de MOI com solução de DAPI (item 4.3).

A técnica de IFI está esquematizada na figura 7:

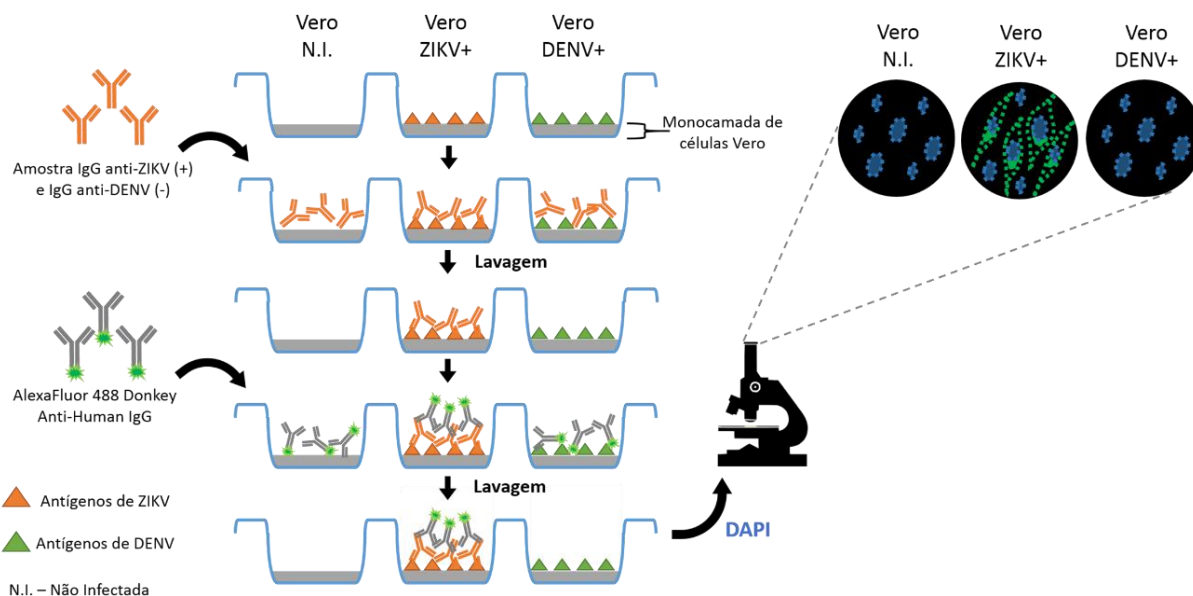


Figura 7. Esquema da metodologia de IFI

Esquema ilustrativo da IFI, utilizando como exemplo uma amostra reativa para ZIKV. Os anticorpos específicos para o ZIKV, quando presentes na amostra, irão se ligar nos antígenos virais presentes nas células Vero infectadas. O sistema de detecção deste sistema é um anticorpo anti-IgG humana conjugado a um fluoróforo, o qual permite a visualização das células infectadas ao microscópio de fluorescência. O DAPI é utilizado para corar os núcleos celulares.

4.5 Aquisição de imagens e análise

Todas as placas de células VERO preparadas neste trabalho, seja para IFI ou para imunomarcação com o anticorpo monoclonal 4G2, foram analisadas utilizando o microscópio de fluorescência Nikon TE300 (Tokyo, Japão) acoplado à câmera Leica DFC310FX (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Todo equipamento utilizado para tais análises foi gentilmente cedido pela professora Dr. Loraine Campanati, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ.

As imagens foram adquiridas sob aumento da lente objetiva de 20x, sendo processadas pelo *software* da câmera Leica DFC310FX (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Aquisição de campos contendo, em média, 290 células (contagem direta de núcleos pela marcação por DAPI).

4.6 Painel de Amostras a serem analisadas

4.6.1 Painel de validação

Para avaliar a eficácia da técnica de IFI proposta neste trabalho, foram utilizadas amostras de painel de validação, ou seja, de pacientes cuja sorologia tanto para ZIKV quanto

para DENV era conhecida, com dados prévios obtidos por outras técnicas, como PRNT para ZIKV e ELISA para DENV.

Cada doador de soro foi identificado por um número. De cada indivíduo, foram realizadas de duas a três coletas de amostra, sendo cada coleta identificada por uma letra. Deste modo, a primeira coleta do paciente 001 foi identificada como coleta A, a segunda como B e assim por diante. As amostras foram então identificadas com a combinação destes códigos, por exemplo: amostra 001A.

O painel conta com amostras coletadas durante o início da epidemia de ZIKV no Brasil (paciente 001), em 2015 e 2016, e com amostras coletadas durante um surto de dengue na cidade do Rio de Janeiro, entre os anos 2007 e 2008 (pacientes 002 e 003). Estas amostras do surto de dengue foram de muita importância para a validação da IFI, visto que, nesta época, o ZIKV ainda não circulava no Brasil.

As amostras do painel de validação estão organizadas na tabela 2, na qual constam os resultados das outras técnicas de diagnóstico previamente realizadas.

Tabela 2. Amostras para o painel de validação da IFI com casos exclusivos de ZIKV ou DENV.

Amostra	Data de coleta	ELISA anti-DENV ^a		PRNT para DENV ^b	PCR para ZIKV	PRNT para ZIKV ^b
		IgM	IgG			
001A	11/12/2015	--- ^c	---	---	Pos ^d	10
001B	15/01/2016	---	---	---	Neg ^e	---
001C	23/02/2016	---	---	---	Neg	640
002A	16/07/2007	Neg	Pos	<10	---	---
002B	02/01/2008	Pos	Pos	2560	---	---
003A	07/01/2008	Neg	Pos	20	---	---
003B	10/03/2008	Pos	Pos	>5120	---	---

^aResultado interpretado de acordo com os kits Panbio Dengue IgM/IgG Indirect ELISA (Alere Inc., USA);

^b Resultado do PRNT para DENV e ZIKV recíproco da última diluição de soro capaz de reduzir 90% dos focos de placa de lise;

^c--- teste não realizado;

^dPos – Positivo;

^eNeg – Negativo.

4.6.2 Amostras do caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas

Em colaboração com a Dr. Iara J. F. Motta (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro), participei da investigação de um caso de suspeita de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas.

No dia 16 de janeiro de 2016, um indivíduo supostamente saudável (doador – D) doou plaquetas por aférese. A bolsa foi dividida em duas unidades para depleção de leucócitos e

para ser gama-irradiada como controle microbiológico do material. No dia 19 de janeiro, as duas unidades foram transfundidas em dois respectivos pacientes (receptores 1 e 2 – R1 e R2, respectivamente). No dia 21 do mesmo mês, o doador entrou em contato com o banco de sangue do hospital, reportando sintomas sugestivos de febre do ZIKV desde o dia 18 de janeiro. Os dois receptores foram contatados para que fosse seguido o protocolo de efeitos adversos associados à transfusão, visando o acompanhamento destes pacientes. O acesso às amostras destes três indivíduos foi regido pelo Protocolo de Hemovigilância do Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. O doador e os dois receptores assinaram o termo de consentimento sobre o requerimento de novas coletas de amostras.

O paciente R1 era uma mulher de 54 anos de idade com mielofibrose primária. Já o paciente R2 era uma jovem de 14 anos com leucemia mieloide aguda. A mesma foi submetida a um transplante de medula haploidêntico, recebendo, portanto, uma terapia imunossupressora.

Foi esquematizada uma linha do tempo (figura 8) para melhor compreensão da ordem dos fatos e para pontuar os momentos de coleta de material dos três indivíduos envolvidos no caso:

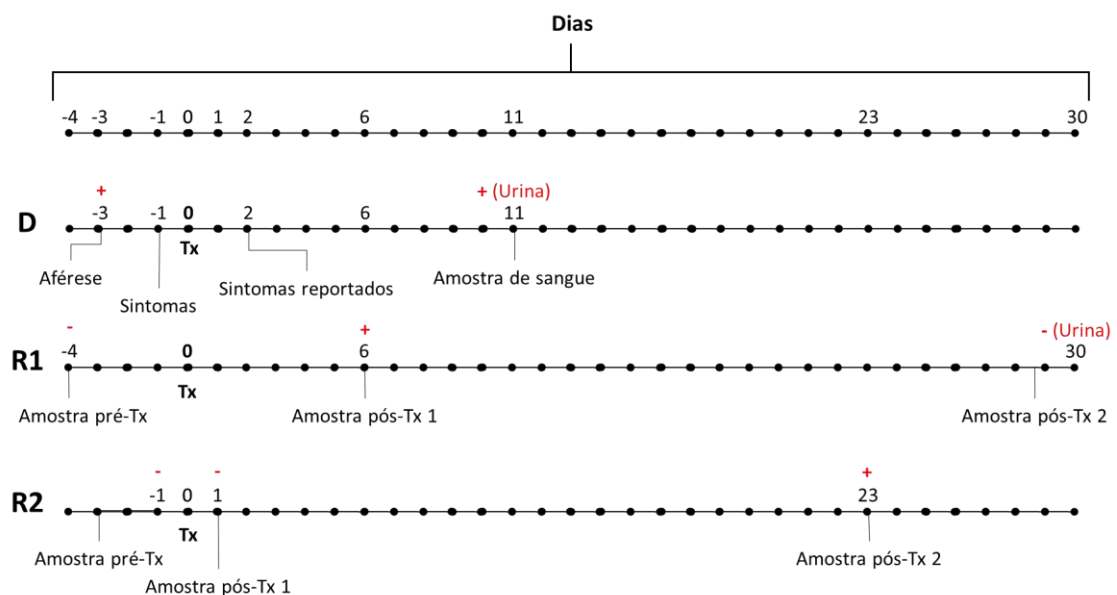


Figura 8. Linha do tempo resumindo o caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas

Em todas as linhas, os pontos representam dias enumerados com relação ao dia da transfusão das duas bolsas de plaqueta nos receptores 1 e 2 (Tx – dia 0). A segunda linha D é referente ao ocorrido com o doador; as duas linhas seguintes são respectivas ao receptor 1 (R1) e 2 (R2). Os sinais (+) e (-) em vermelho indicam o resultado de PCR para ZIKV de amostra de plasma. Estes sinais acompanhados de (urina) indicam o resultado de PCR para ZIKV de amostra de urina.

As amostras foram identificadas de acordo com o paciente (doador - D; receptor 1 - R1; receptor 2 - R2) combinado ao dia de coleta com relação ao dia da transfusão (dia 0). Exemplo: amostra R2+23 foi coletada do receptor 2, 23 dias após o dia da transfusão.

Durante a investigação do caso, foram realizadas outras técnicas de diagnóstico laboratorial, além da IFI, com os espécimes coletados dos três indivíduos. Estes resultados estão sumarizados na tabela 3.

Tabela 3. Resultado do diagnóstico laboratorial dos três indivíduos envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas.

Amostra	PCR (ZIKV)		PCR ^a	PCR ^b	PRNT ^c	TR para ZIKV ^d		ELISA de Captura (DENV) ^e	
	Plasma	Urina	(CHIKV)	(DENV)	(ZIKV)	IgM	IgG	IgM	IgG
D-3	Pos ^f	--- ^g	Neg ^h	Neg	---	---	---	---	---
D+11	Neg	Pos	Neg	Neg	1280	Pos	Pos	Pos	Neg
R1-4	Neg	---	Neg	Neg	---	Neg	Pos	Neg	Pos
R1+6	Pos	---	Neg	Neg	---	Neg	Sus ⁱ	Neg	Pos
R1+30	Neg	---	---	---	2560	Sus	Pos	Pos	Pos
R2-1	Neg	---	Neg	Neg	---	---	---	---	---
R2+1	Neg	---	Neg	Neg	---	---	---	---	---
R2+23	Pos	Neg	Neg	Neg	40	Neg	Sus	Neg	Neg
R2+51	Pos	---	---	---	20	Neg	Neg	Neg	Neg
R2+71	Neg	---	---	---	---	Neg	Neg	---	---

^a PCR para vírus da chikungunya (CHIKV) realizado em amostra de plasma;

^b PCR para DENV em amostra de plasma;

^c Resultado do PRNT para ZIKV recíproco da última diluição de soro capaz de reduzir 90% dos focos de placa de lise;

^d Resultado interpretado de acordo com o protótipo de teste rápido Dual Path Platform ZIKV IgM/IgG rapid test (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, USA);

^e Resultado interpretado de acordo com o kit de ELISA de captura para IgM e IgG anti-DENV (Standard Diagnostic, Inc, Gyeonggi-do, Korea);

^f Pos – positivo;

^g --- teste não realizado;

^h Neg – negativo;

ⁱ Sus – suspeito.

Somente as amostras D+11, R1-4, R1+6, R1+30, R2+23 e R2+51 foram submetidas à IFI anti-ZIKV e anti-DENV descrita no item 4.4.

4.6.3 Amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação

Em colaboração com a Dr. Adriana Suely de Oliveira Melo (Instituto de Pesquisa Professor Amorim Neto – IPESQ, Campina Grande, Paraíba), foram cedidas 21 amostras de soro ou sangue total de mães que viviam em áreas de risco de infecção pelo ZIKV durante a gestação, no estado da Paraíba.

Amostras de soro, sangue ou líquido amniótico destas 21 mulheres foram submetidas à PCR para detectar o genoma de ZIKV. A partir destes resultados e do desfecho clínico do neonato, saudável ou com alteração no SNC, os casos foram organizados na tabela 4. A realização desse trabalho foi previamente aprovada pelo comitê de ética sob o registro CAAE 52888616.4.0000.5693, parecer positivo 1452278. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento para a utilização dos resultados em pesquisa. O diagnóstico molecular para ZIKV foi realizado por RT-PCR segundo o protocolo publicado por Lanciotti e colaboradores (Lanciotti et al., 2008).

As alterações neurológicas nas crianças foram avaliadas por ultrassonografia durante a gestação e confirmadas por ressonância magnética após o nascimento. Todas conduzidas por médicos especializados no Instituto Paraibano de Pesquisa Prof. Amorim Neto (Campina Grande, PB) e Instituto para Pesquisa e Educação (IDOR-Rio).

A partir dos resultados de PCR para ZIKV destas pacientes e do desfecho clínico do neonato, estas amostras foram sumarizadas na tabela 4, sendo divididas em três grupos:

- Grupo I: amostras referentes a casos de malformações congênitas decorrentes da infecção pelo ZIKV;
- Grupo II: amostras referentes a casos de bebês sem malformações congênitas;
- Grupo III: amostras nas quais o desfecho do conceito ainda não é conhecido.

Tabela 4. Amostras das mães expostas ao ZIKV no estado da Paraíba.

Número	PCR ^a	Sorologia IgG	Exantema ^b	Clínica do Infante
Grupo I: casos com alterações congênicas				
42	LA ^c (Pos) ^d	---	(Pos)	Microcefalia (microcalcificações no parênquima)
118	CE ^f (Pos)	---	(Pos)	Alterações no SNC / natimorto
302	LA (Pos)	---	(Pos)	Sem parênquima / quadro de hidrocefalia
505	LA (Pos)	---	(Pos)	Microcefalia associada a microcalcificações no parênquima e hipoplasia cerebelar
513	SGM ^g (Neg)	(Pos)	(Neg) ^h	Redução volumétrica encefálica; paquigiria; hipotenuação da substância branca periventricular
517	LA (Pos)	---	---	Microcefalia
520	SGM, UR ⁱ (Neg)	---	---	Hidrocefalia de ânus imperfurado
633	Soro materno (Neg) / Soro neonato (Pos)	---	(Pos)	Microcefalia
809	---	---	---	Alterações no SNC
1002	LA (Pos)	---	(Pos)	Alterações no SNC
1013	LA (Pos)	---	(Pos)	Alterações no SNC
1027	---	---	(Pos)	Alterações no SNC
Grupo II: casos de bebês sem malformações congênicas				
524	UR (Neg)	---	---	Bebê prematuro, mas sem anomalias
630	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	Bebê sem anomalias
Grupo III: casos com desfecho clínico do neonato ainda não conhecido				
323	SGM (Neg)	---	(Pos)	---
600	Soro materno (Neg)	---	---	---
621	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	---
623	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	---
627	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	---
631	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	Em gestação
642	Soro materno (Neg)	---	(Pos)	---

^aResultado de PCR para ZIKV (espécime do qual o resultado foi obtido entre parênteses);^bHistórico de exantema na mãe durante a gestação;^cLA – Líquido amniótico;^d(Pos) – Positivo;^e--- Não realizado ou não consta;

^fCE – Cérebro da necropsia do natimorto;

^gSGM – Sangue materno;

^h(Neg) – Negativo;

ⁱUR – Urina da mãe.

Estas amostras foram submetidas ao protocolo de IFI para auxiliar no diagnóstico sorológico das mesmas, além de avaliar se estes pacientes foram previamente expostos ao DENV, a partir da análise da reatividade contra este vírus.

Além das amostras das mães, neste trabalho foi realizada a IFI de sangue total extraído de cordão umbilical de um neonato (amostra S0014) acometido pela síndrome congênita do ZIKV. O mesmo apresentava microcefalia, hipoatenuação da substância branca periventricular e múltiplos focos de calcificação subcorticais e nos núcleos da base.

5 RESULTADOS

Uma vez que o objetivo do trabalho é implementar a técnica de imunofluorescência indireta como ferramenta auxiliar no diagnóstico sorológico, iniciamos os ensaios padronizando as placas que serviram de plataforma para a análise.

5.1 Determinação das condições de infecção para ensaio de imunofluorescência indireta

A fim determinar as condições de infecção para o ensaio de IFI, foi realizado um teste para avaliar em qual concentração de vírus seria observada uma alta taxa de infecção, com menor morte celular decorrente da infecção. Para isso, os estoques dos vírus MR766 (ZIKV prototípico africano), AB, PE (dois isolados brasileiros de ZIKV) e DENV2 foram diluídos serialmente a partir da MOI de 8 até 0,0625 para infectar células VERO, a fim de se estabelecer a condição que apresentou maior taxa de infecção com menores evidências de morte celular.

A imunomarcagem com anticorpo monoclonal 4G2 demonstrou que todos os vírus foram capazes de infectar células VERO em todas MOIs utilizadas. As três cepas de ZIKV utilizadas, MR766, AB e PE foram citotóxicas a partir da MOI de 2, mais expressivamente o vírus MR766, evidenciado pela redução do número de células (núcleos em azul) quando comparado com o controle não infectado mock. A partir da MOI de 0,0625 foi observada redução na marcação em verde nos três vírus.

Em nenhuma MOI testada o DENV2 pareceu gerar morte celular, sendo observadas monocamadas íntegras semelhante à condição Mock. Em MOIs mais baixas, como 0,25 e

0,0625, foi observada maior redução dos níveis de infecção pelo DENV2, com menor sinal da cor verde.

A titulação destes quatro estoques virais está esquematizada na figura 9.

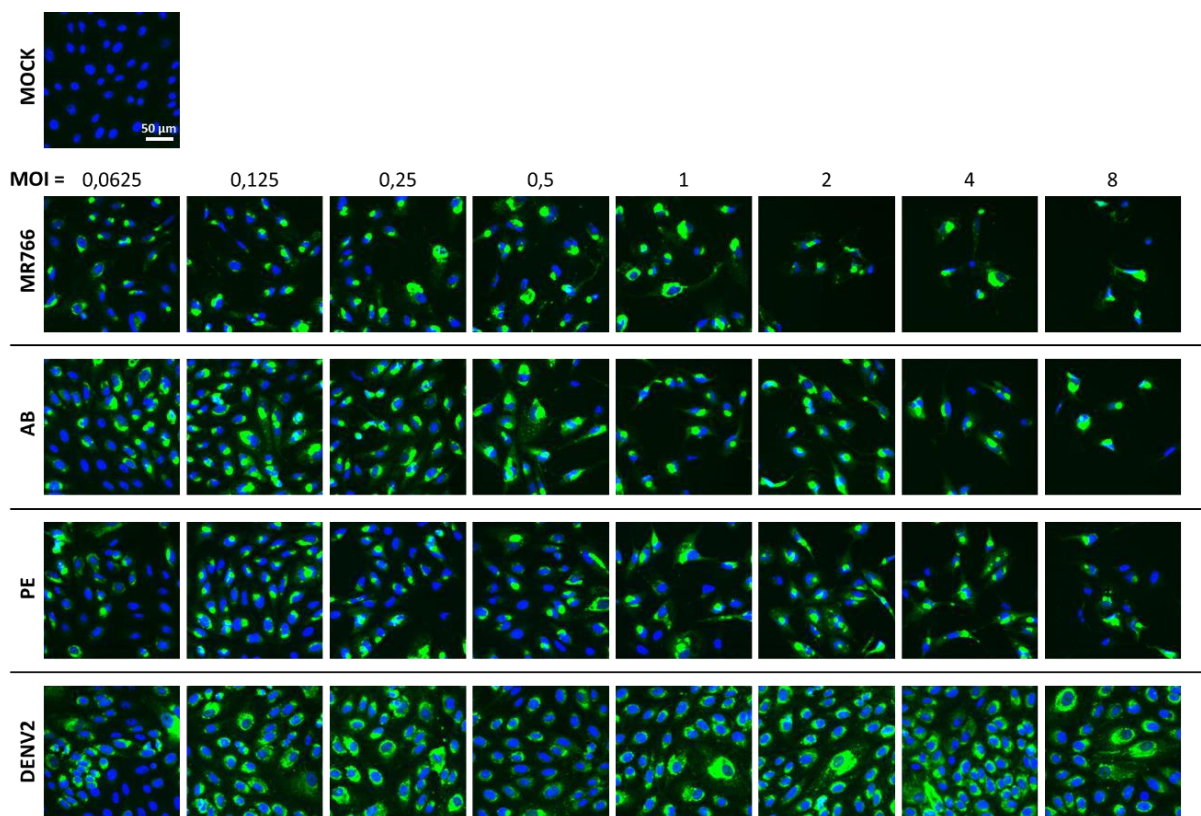


Figura 9. Análise de níveis de infecção de ZIKV e DENV2 por imunofluorescência

Esquema de imagens do teste de MOI das cepas de ZIKV (MR766, AB e PE), e do DENV2. Imagens representativas de três réplicas técnicas para cada condição. Em verde, marcação da proteína E pelo anticorpo 4G2; em azul, marcação de núcleos por DAPI. Imagens da sobreposição AlexaFluor488-DAPI.

A partir destas análises, escolhemos a MOI de 1 para os quatro vírus testados, visto que foi possível obter uma alta taxa de células infectadas, sem efeitos citotóxicos evidentes que prejudicassem as análises futuras. Deste modo, as placas utilizadas para a IFI com amostras de pacientes foram confeccionadas seguindo este parâmetro.

5.2 Análise das amostras do painel de validação por IFI

5.2.1 Amostras de paciente com diagnóstico confirmado para ZIKV

Para avaliar a eficácia da técnica de IFI proposta neste trabalho, foram utilizadas amostras de pacientes cujo diagnóstico tanto para ZIKV quanto para DENV era conhecido (tabela 2, página 20), com dados prévios obtidos por outras técnicas, como PCR e PRNT para ZIKV e ELISA para DENV.

Inicialmente, analisamos amostras de um paciente com diagnóstico de ZIKV (paciente 001) confirmado por PCR e corroborado por PRNT para ZIKV. Foram analisadas amostras

referentes a três coletas diferentes desse paciente (a, b e c). A amostra 001a é referente a coleta feita no dia em que o paciente apresentou os primeiros sintomas, compreendendo a fase aguda da infecção pelo ZIKV. As amostras b e c foram coletadas após a resolução dos sintomas deste paciente, sendo a amostra 001b coletada 34 dias após o aparecimento de sintomas e a amostra 001c coletada 68 dias após a primeira coleta. Diferentemente das demais amostras analisadas neste trabalho, os espécimes do paciente 001 não foram pré-incubados com lisados de células VERO antes da IFI.

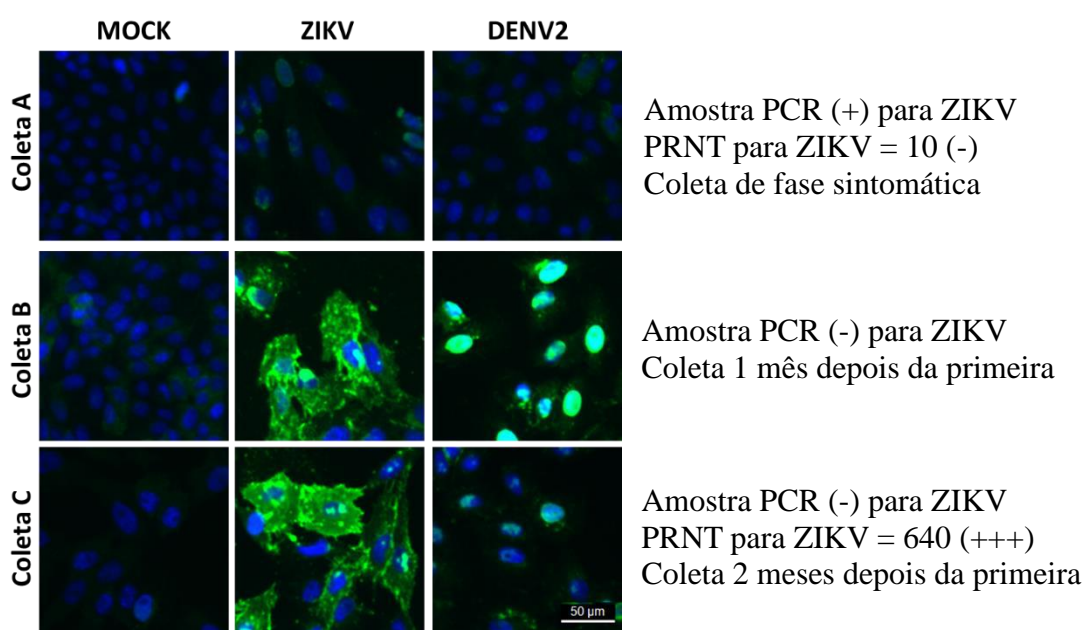


Figura 10. Diferenças na reatividade para ZIKV e DENV2 entre as amostras do paciente 001. As amostras do paciente 001 (001A; 001B; 001C) foram diluídas em solução 3% de BSA em PBS (1:160). Em verde, marcação para IgG humana e em azul, núcleos corados com DAPI. Imagens de sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI.

Foi possível notar que as amostras b e c marcaram mais intensamente células VERO infectadas com ZIKV do que a amostra 001a, indicando a presença de IgG anti-ZIKV nessas amostras.

A não reatividade com DENV2 na primeira coleta (001a; fase aguda da infecção aguda pelo ZIKV) sugere que este indivíduo não teve infecção prévia por DENV. Além disso, o padrão de marcação entre células infectadas por ZIKV e DENV2 foi diferenciado, com uma marcação muito mais intensa para as células infectadas com ZIKV.

Este resultado (figura 10) demonstra que esta técnica de IFI foi capaz de detectar IgG anti-ZIKV em amostra de plasma, provendo um diagnóstico consistente a partir da análise de diferentes coletas de um mesmo paciente.

5.2.2 Amostras com diagnóstico confirmado para DENV

Em seguida, analisamos amostras de pacientes (002 e 003) com diagnóstico confirmado de dengue (ELISA e PRNT) coletadas durante o surto de dengue, entre 2007 e 2008. Foram analisadas amostras de diferentes coletas (a e b) de cada paciente, sendo que a amostra a é referente a fase aguda de dengue e a amostra b coletada 6 meses depois, para o indivíduo 002, e 2 meses depois para o indivíduo 003.

Imagens representativas das análises de IFI dos dois indivíduos (002 e 003) foram organizadas na figura 11.

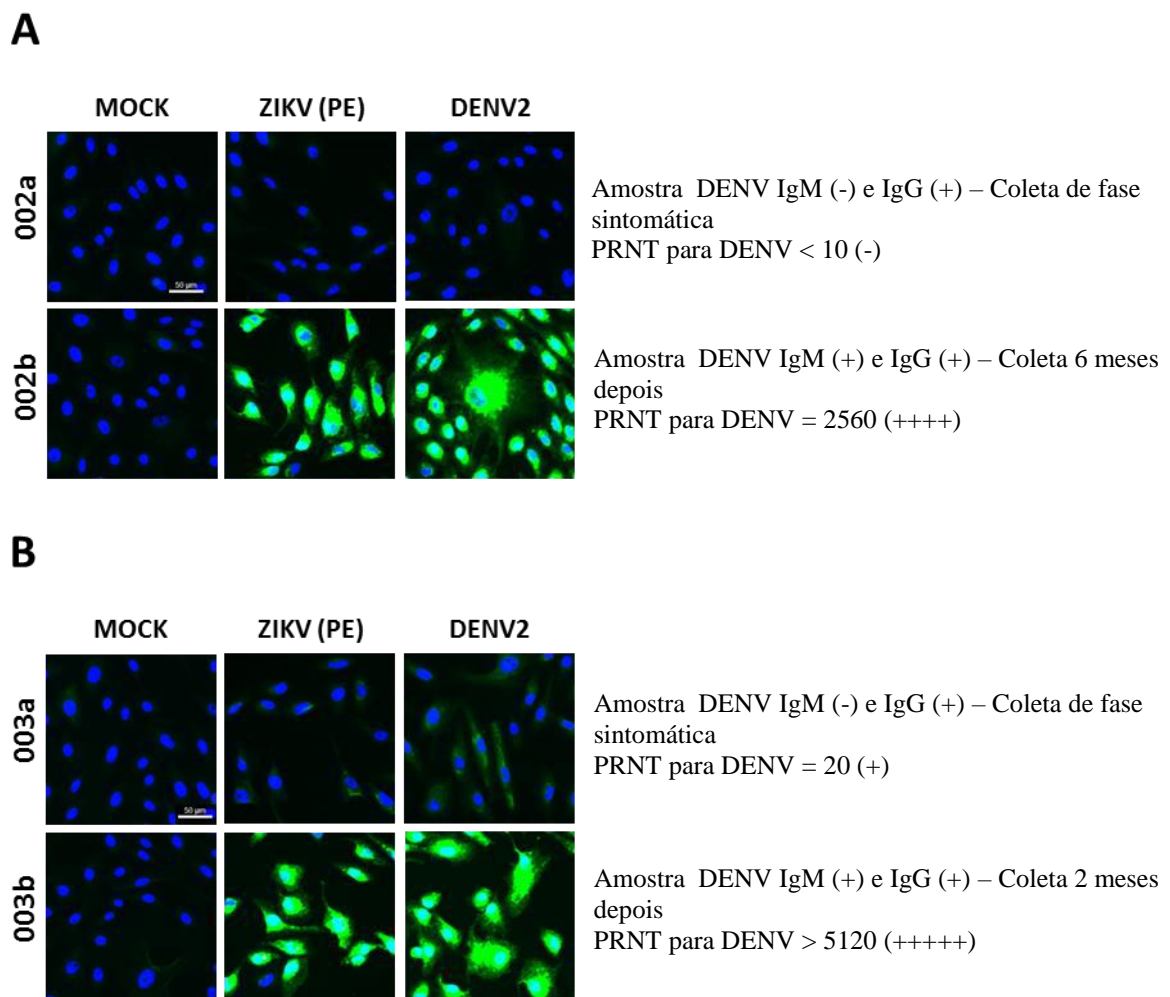


Figura 11. IFI das amostras coletadas no surto de dengue ocorrido entre 2007 e 2008.

IFI das amostras dos pacientes 002 (coletas a e b) e 003 (coletas a e b). Imagens referentes à diluição de 1:1240 de soro). Em verde, marcação para IgG humana e em azul, núcleos corados com DAPI. Imagens de sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI.

Nas amostras de fase aguda, houve nenhuma (002 a) ou pouca (003a) reatividade. Já nas amostras da coleta b, foi observado reatividade tanto para ZIKV quanto para DENV2 nos

dois indivíduos. Nestes casos, não foi possível distinguir uma maior reatividade para os diferentes vírus pela titulação das amostras.

Nesses casos, nosso teste de IFI não foi capaz de obter um diagnóstico claro e coerente com os dados anteriores (PRNT e ELISA), que podem observados na tabela 2 da página 20.

Semelhante ao observado, para o paciente com ZIKV, também foi possível observar que ocorreu a soroconversão, embora não seja claro neste teste para qual vírus a resposta IgG direcionada.

5.3 Análise de amostra de sangue de cordão umbilical por IFI.

Com intuito de avaliar se a IFI seria capaz de detectar IgG anti-ZIKV e anti-DENV em espécimes clínicos diferentes de soro ou plasma, a amostra de sangue de cordão umbilical, obtida de um caso de microcefalia decorrente da infecção congênita pelo ZIKV, foi analisada. As imagens da titulação completa desta amostra foram organizadas a figura 12.

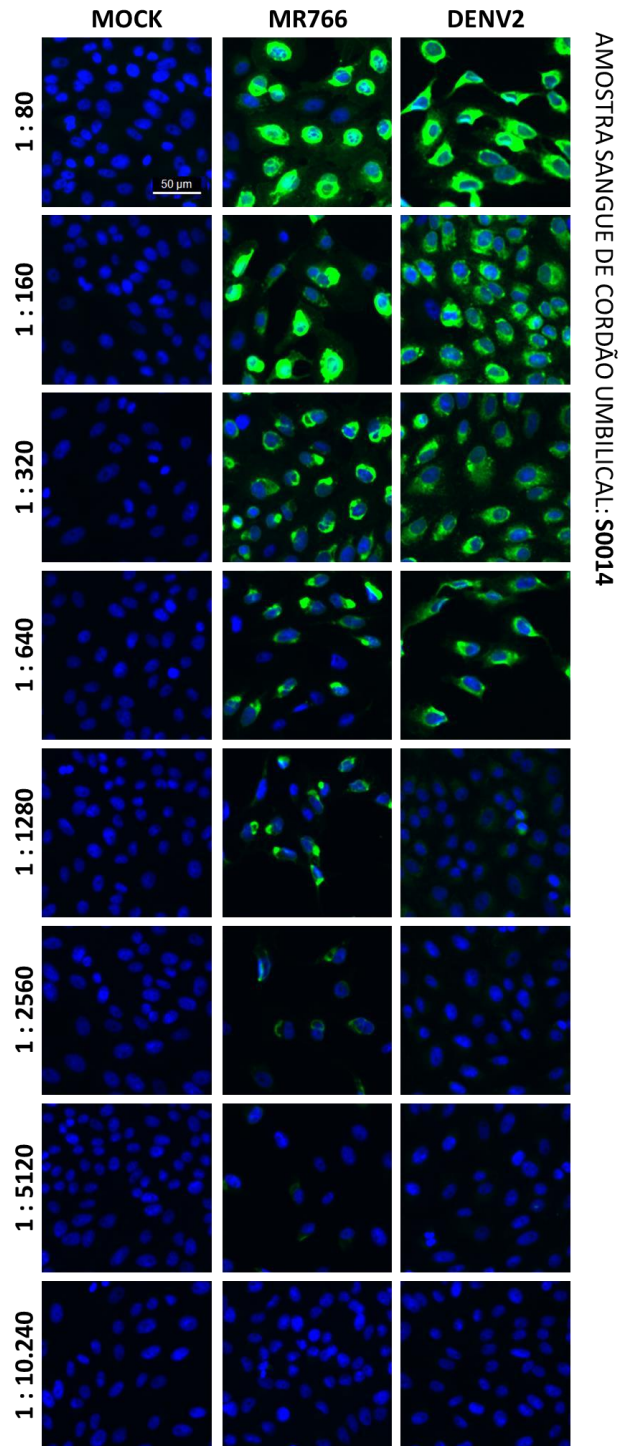


Figura 12. IFI de sangue de cordão umbilical de caso de síndrome congênita pelo ZIKV.

Imagens representativas das diluições de sangue de cordão umbilical submetido à IFI. Em verde, marcação para IgG humana, em azul, marcação de núcleos. Imagens referentes à sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI.

As imagens demonstraram padrão de marcação semelhante ao de amostras em fase convalescente da infecção pelo ZIKV, com reatividade cruzada para DENV, mas ainda com maiores títulos de IgG anti-ZIKV.

Este resultado, além do dado sorológico, demonstrou que o protocolo de IFI descrito neste trabalho foi capaz de detectar IgG em amostras de sangue total, a partir de pequenos volumes do espécime.

5.4 Diagnóstico sorológico dos pacientes envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas

Para auxiliar no diagnóstico dos pacientes envolvidos no caso de suspeita de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas, as amostras do doador e dos dois receptores foram submetidas à IFI. Amostras de soro de todas as coletas de cada paciente foram diluídas serialmente na base 2, começando na proporção de 1:80 até 1:10.240. As imagens referentes à titulação completa destas amostras constam no Anexo 1 na página 48.

A amostra de soro do indivíduo doador de plaquetas, coletada 11 dias após a transfusão da bolsa nos receptores (D+11), apresentou marcação detectável para o ZIKV até a diluição de 1:10.240 e marcação detectável para DENV2 até a diluição de 1:640 (Anexo 1a – página 48), indicando a presença de IgG anti-ZIKV e de reatividade cruzada contra DENV. Na figura 13 estão as imagens representativas da diluição de 1:640 desta amostra, juntamente com a linha do tempo referente ao acompanhamento do doador.

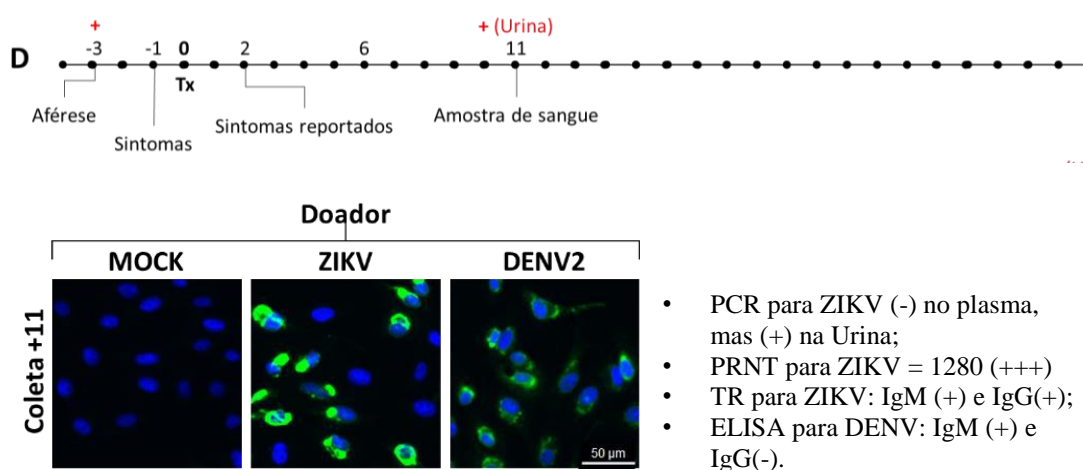


Figura 13. IFI do indivíduo doador de plaquetas.

Imagens representativas da diluição de 1:640 da amostra de soro do indivíduo doador de plaquetas coletada 11 dias após a data de transfusão das bolsas nos receptores (D+11). Imagens da sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI, demonstrando núcleos celulares em azul e células infectadas em verde.

No caso do receptor 1, observamos que na coleta realizada quatro dias antes da transfusão (amostra R1-4), a marcação para ZIKV foi detectável até a diluição de 1:320, mas para DENV2 o título de IgG foi maior, detectável até a diluição de 1:5120 (Anexo 1b – página 49). Neste momento, o receptor 1 ainda não havia entrado em contato com a bolsa de

plaquetas contaminada. Na coleta de 6 dias após a transfusão (amostra R1+6), a reatividade foi semelhante à da coleta anterior. No entanto, na coleta 30 dias após a transfusão, a reatividade para ambos os vírus foi detectável até a última diluição, 1:10.240 (Anexo 1d – página 51). A titulação das três coletas de amostra do receptor 1 demonstrou um padrão de exposição prévia ao vírus da DENV como demonstrado pela reatividade apenas ao DENV nas amostras R1-4 e R1+6. Em relação ao ZIKV, também foi possível observar que houve a soroconversão. Imagens representativas da IFI das três amostras do receptor 1 estão representadas na figura 14, juntamente com a linha do tempo referente a este paciente.

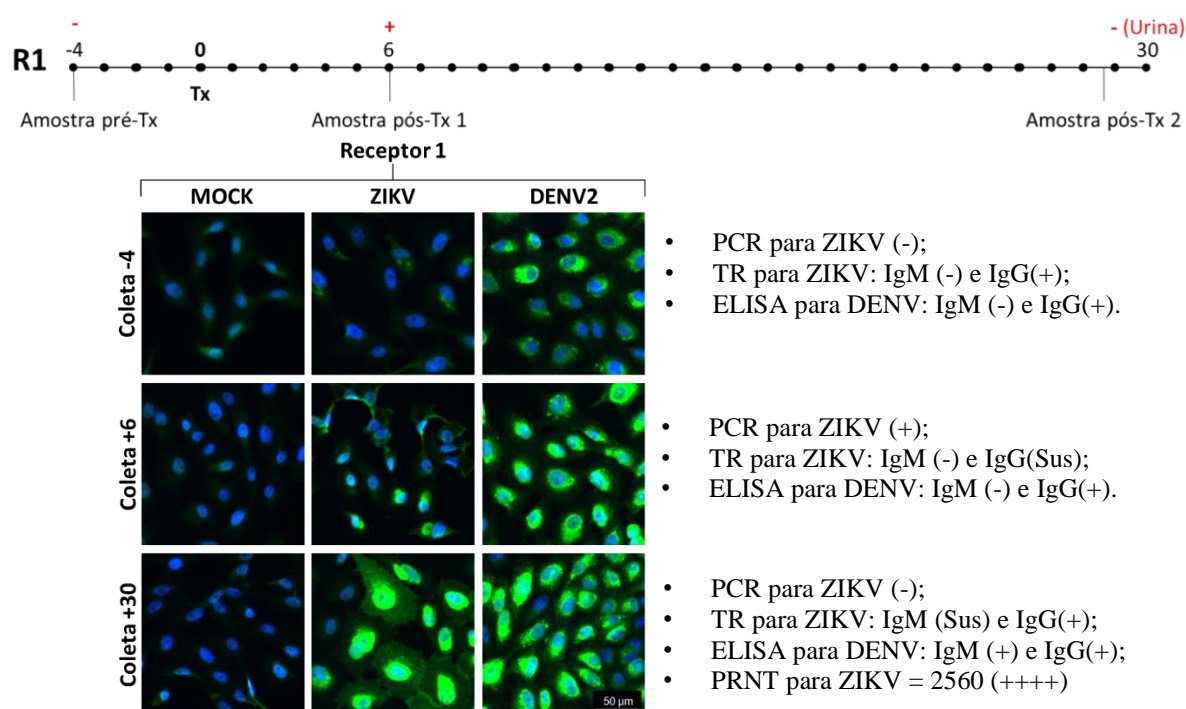


Figura 14. IFI do receptor 1.

Imagens representativas da diluição de 1:640 das três amostras de soro do receptor 1 (R1-4; R1+6 e R1+30). Imagens da sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI, demonstrando núcleos celulares em azul e células infectadas em verde.

A titulação da amostra do receptor 2 de 23 dias após a data de transfusão (R2+23) demonstrou reatividade para ZIKV e DENV apenas na menor diluição realizada nesse ensaio, de 1:80. Entretanto, o fato do padrão de marcação nas células infectadas ser muito semelhante ao padrão de marcação de ruído no Mock sugere que esta amostra é duplo-negativa para ambos os vírus. Já na coleta realizada 51 dias após a transfusão (R2+51), foi possível detectar marcação para ZIKV até a diluição de 1:1280 e para DENV2 até 1:640 (Anexo 1f – página 53). Comparando com as amostras do doador e com a amostra R1+30, do receptor 1, o título da amostra R2+51 ainda foi baixo. Imagens representativas das duas coletas do receptor 2 estão organizadas da figura 15 juntamente com a linha do tempo deste paciente.

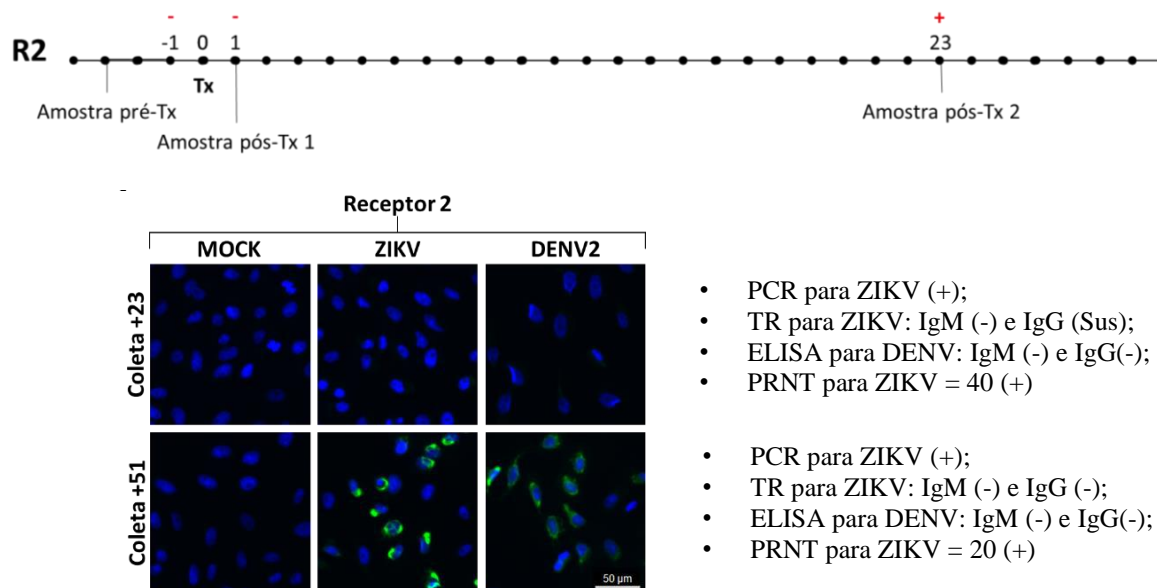


Figura 15. IFI do receptor 2.

Imagens representativas da diluição de 1:640 das duas amostras de soro do receptor 2 (R2+23 e R2+51). Imagens da sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI, demonstrando núcleos celulares em azul e células infectadas em verde.

Esses dados, sumarizados na tabela 5, indicam que os três pacientes envolvidos no caso (doador e os dois receptores) desenvolveram IgG anti-ZIKV, como demonstrado nas coletas mais tardias em relação ao dia de transfusão (D+11, R1+30 e R2+51).

Tabela 5. Interpretação das análises de IFI das amostras do caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas.

Amostra	Título de IgG na IFI ^a	
	anti-ZIKV	anti-DENV
D+11	10.240	640
R1-4	320	5120
R1+6	1280	5120
R1+30	10.240	10.240
R2+23	80	80
R2+51	1280	640

^aValor recíproco da última diluição na qual foi detectada reatividade para ZIKV ou DENV.

5.5 Diagnóstico sorológico das mães expostas ao ZIKV no estado da Paraíba por IFI

A fim de determinar os títulos de IgG anti-DENV em amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação (tabela 3 na página 23, espécimes de sangue total e soro foram submetidas à IFI. Na figura 16 foram organizadas amostras de três pacientes: 302 (pertencente ao Grupo I, dos casos de alterações congênitas), 524 (Grupo II, dos casos de crianças sem malformações congênitas) e 623 (Grupo III, dos casos ainda sem descrição clínica dos

neonatos). Nesta figura também foram destacadas as últimas diluições de amostra com reatividade detectável para cada vírus, ZIKV e DENV2.

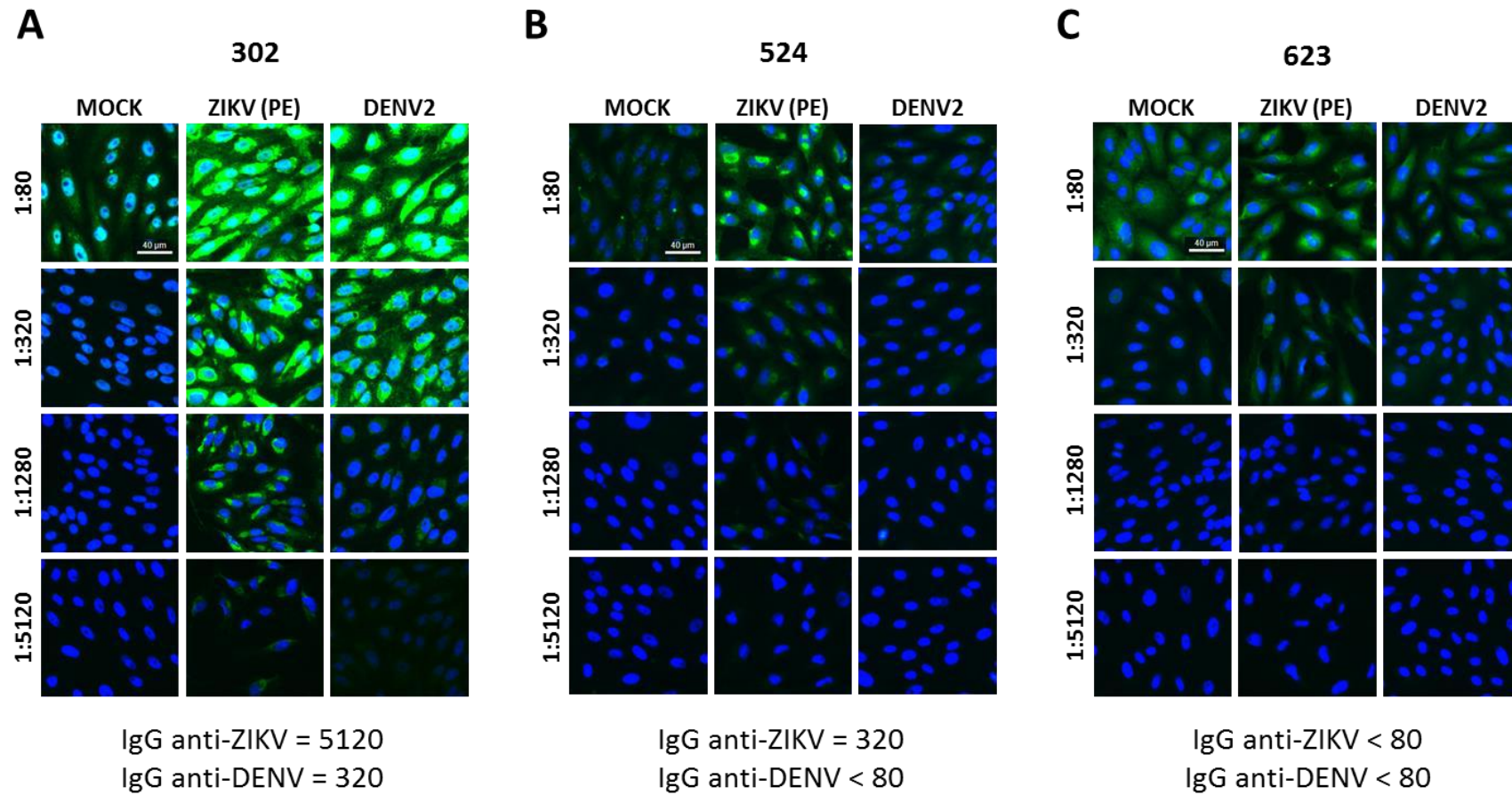


Figura 16. Titulação das amostras de três mães expostas ao ZIKV durante a gestação (302, 524 e 623).

(A) Titulação da amostra 302, do grupo I - casos de alterações congênitas; (B) titulação da amostra 524, do grupo II – casos de crianças sem malformações congênitas; (C) titulação da amostra 623, do grupo III – casos cujo desfecho clínico do neonato ainda era desconhecido. Linhas referentes à diluição de amostras e colunas referentes à condição de infecção utilizada. Imagens da sobreposição *AlexaFluor488*-DAPI.

A amostra 302 demonstrou sinal detectável para ZIKV até a última diluição utilizada (1:5120) e, para DENV, até 1:320 (figura 16a). Já na amostra 524 foi detectada menor reatividade para ZIKV, até a diluição de 1:320, e reatividade para DENV praticamente indetectável já na menor diluição, 1:80 (figura 16b)

Apesar do sinal de marcação em verde ser detectável na diluição de 1:80 da amostra 623 (figura 16c), tanto para ZIKV quanto para DENV, os títulos de IgG contra ambos os vírus foram determinados como menores que 80 (recíproco da diluição de amostra de 1:80). Isto porque o padrão de marcação sobre as células VERO infectadas foi semelhante ao padrão de marcação na condição mock, sendo perdido o sinal logo a partir da segunda diluição de amostra (1:320). Esse resultado sugere que a amostra não tem IgG anti-ZIKV e nem anti-DENV.

As demais amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação foram analisadas conforme o que foi realizado nas amostras da figura 16. Os resultados deste ensaio foram sumarizados na tabela 6. Além disso, foi calculada a razão entre a reatividade destas amostras para ZIKV e para DENV, numa tentativa de reduzir o problema da reatividade cruzada entre estes vírus.

Tabela 6. Título de IgG anti-ZIKV e anti-DENV das amostras de mães da Paraíba obtido na IFI.

Número	Título de IgG ^a		Razão ZIKV/DENV ^b
	anti- ZIKV	anti- DENV	
Grupo I: casos com alterações congênicas			
42	5120	1280	4
118	320	<80	>4
302	5120	320	16
505	5120	1280	4
513	1280	80	16
517	5120	320	16
520	1280	1280	1
633	320	80	4
809	1280	1280	1
1002	320	80	4
1013	1280	320	4
1027	320	80	4
Grupo II: casos de bebês saudáveis			
524	320	<80	>4
630	5120	1280	4
Grupo III: casos sem desfecho clínico do neonato conhecido			
323	5120	1280	4
600	5120	1280	4
621	>5120	>5120	1
623	<80	<80	1
627	>5120	>5120	1
631	1280	1280	1
642	<80	<80	1

^aValor recíproco da última diluição na qual foi detectada reatividade para ZIKV ou DENV;

^bRazão entre o valor da reatividade para ZIKV com o valor da reatividade para DENV.

A partir deste resultado, foi observado que os títulos de IgG anti-DENV foi muito heterogêneo entre as amostras. Esta diferença entre as pacientes, sobretudo no grupo I, composto por amostras de casos de malformações congênicas, inviabilizou a associação da exposição prévia ao DENV ao grau de severidade das malformações congênicas neste conjunto de amostras.

Para melhor observação da soroprevalência para DENV nestes grupos, as amostras foram organizadas na tabela 7 de acordo com os títulos de IgG anti-DENV obtidos pela IFI:

Tabela 7. Distribuição das amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação pelo respectivo título de IgG anti-DENV analisado por IFI.

Título de IgG anti-DENV ^a	Quantidade de amostras (% dentro do respectivo grupo)						Total
	>5120	5120	1240	320	80	<80	
Grupo I ^b	0	0	4 (33%)	3 (25%)	3 (25%)	2 (17%)	12
Grupo II ^c	0	0	1 (50%)	0	0	1 (50%)	2
Grupo III ^d	2 (29%)	0	3 (42%)	0	0	2 (29%)	7

^a Valor recíproco da última diluição na qual foi detectada reatividade para DENV.

^bGrupo I – casos com alterações congênicas;

^cGrupo II – casos de bebês saudáveis;

^dGrupo III - casos com desfecho clínico do neonato não determinado.

6 DISCUSSÃO

Desde 2015, o Brasil passa por uma grande epidemia de ZIKV, com aumento alarmante de casos de microcefalia e de neuropatias decorrentes desta infecção. O fato de muitas manifestações clínicas associadas ao ZIKV também estarem associadas a outros agentes infecciosos co-circulantes no país, como o CHIKV e o DENV, inviabiliza o diagnóstico clínico diferencial dos pacientes, ressaltando a importância do aprimoramento de técnicas de diagnóstico laboratorial mais específicas.

Neste trabalho, implementamos uma técnica de imunofluorescência indireta *in house*, para detectar IgG anti-ZIKV e anti-DENV, como ferramenta auxiliar no diagnóstico sorológico de pacientes expostos ao ZIKV. Foram testadas amostras de soro e sangue total de indivíduos expostos ou não ZIKV ou ao DENV em diferentes circunstâncias.

Nas análises de IFI das amostras de um indivíduo com diagnóstico confirmado para ZIKV (paciente 001 – tabela 2, página 21), foi observado que, na coleta referente à fase aguda da infecção, ou seja, quando foi detectada viremia por PCR, não houve reatividade para ZIKV. Esse resultado era o esperado, já que nesta fase da infecção ainda não há a produção de anticorpos IgG anti-ZIKV (Martínez de Salazar et al., 2016b). É descrito que essa produção se inicia entre 5 a 10 dias após o início dos sintomas, o que é coerente com o resultado observado na figura 10. Nesta análise, as amostras 001b e 001c deste paciente

(referentes às coletas realizadas 1 e 2 meses após o reporte dos sintomas, respectivamente) foram intensamente reativas para ZIKV, demonstrando que a IFI deste paciente foi capaz de detectar a soroconversão para ZIKV.

Em dois casos foi possível detectar a exposição prévia ao DENV: amostra 003a do painel de validação (figura 11, pagina 30) e receptora 1 do caso de transfusão (figura 14, pagina 34), uma vez que, foi detectada a presença de IgG em amostras de fase aguda. A reatividade da amostra do painel de validação de dengue 003a (figura 11b) para DENV pode ser justificada pelo fato deste indivíduo ter tido uma infecção secundária pelo DENV durante o surto de 2008, demonstrando que a presença de IgG anti-DENV no soro pode perdurar por muitos meses.

Entretanto, nas duas amostras de fase convalescente para dengue (002b e 003b, figura 11, pagina 30), pertencentes ao painel de validação, não foi possível corroborar os dados sorológicos prévios com a análise das IFIs por conta da intensa reatividade cruzada entre ZIKV e DENV. Esta reatividade cruzada pode ser justificada pelo momento de alta produção de anticorpos pós-infecção, aumentando a probabilidade de detecção de IgG capaz de reconhecer epítomos comuns entre ZIKV e DENV.

Estes resultados dos pacientes do surto de dengue (002 e 003) sugere que diferentes sorotipos de DENV podem ter variados graus de similaridade antigênica com o ZIKV. A informação de qual sorotipo de DENV acometeu estes indivíduos durante o surto do Rio de Janeiro, ocorrido entre 2007 e 2008, não é conhecida, embora os sorotipos 2 e 3 tenham sido descritos com causadores desse surto (Centro de Informações em Saúde para Viajantes, UFRJ, 2008). Como, durante o surto, estes dois indivíduos sofreram uma infecção secundária pelo DENV, provavelmente a primeira exposição a este vírus tenha sido por outro sorotipo.

Outro fator que pode ter contribuído para a intensa reatividade, tanto para ZIKV quanto para DENV, pelas amostras de fase convalescente de dengue (002b e 003c), é a impossibilidade de padronizar a quantidade de antígenos virais presentes na monocamada de células VERO para IFI, diferente de um kit comercial de ELISA, por exemplo (Crowther,

1995). A diferença na produtividade da infecção pelo ZIKV e pelo DENV nas células VERO na condição estudada pode ser observada no teste de MOI, no qual foi observado que a marcação para o ZIKV, independente da cepa utilizada, em células VERO é muito mais intensa que na infecção pelo DENV2, quando revelada pelo anticorpo anti-proteína E de flavivírus, o 4G2 (figura 9 – página 28).

Os resultados do painel de validação da IFI ressaltam a importância de coletas pareadas para o estudo de soroconversão para flavivírus, além da necessidade de diferentes técnicas de diagnóstico para melhor definição dos casos. Para sanar o problema da possível diferença de reatividade cruzada entre os quatro sorotipos de DENV e o ZIKV, seria necessário padronizar placas com todos estes vírus, utilizando amostras cuja infecção pelo DENV fosse de sorotipo-específica, utilizando o sorotipo em questão para a confecção das placas.

A IFI da amostra de sangue de cordão umbilical de um caso de microcefalia associada à ZIKV demonstrou que a IFI proposta era capaz de detectar IgG anti-ZIKV em amostra de sangue, não somente em soro ou plasma, o que aumenta o espectro de aplicação da técnica proposta. A partir das análises dessa amostra, foi observada a transferência passiva de IgG anti-ZIKV da gestante infectada para o feto. O padrão de titulação desta amostra (figura 12 – página 32) sugere que a mãe deste neonato não teve exposição prévia a outro flavivírus que não o ZIKV, com maior reatividade para este vírus que para DENV. A capacidade destes anticorpos transferidos de forma passiva de prevenir ou aumentar a infecção pelo ZIKV ainda precisa ser melhor estudada.

Na descrição do caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas, foi possível detectar a soroconversão para ZIKV nos três indivíduos envolvidos neste ocorrido (figuras 13, 14 e 15). O resultado da titulação da amostra do doador (D+11), em fase convalescente de ZIKV, condiz com o de um paciente cuja a infecção pelo ZIKV foi a primeira exposição a um flavivírus, não havendo exposição prévia a outro vírus desta família, como o DENV (Cleton et al., 2012; Lanciotti et al., 2008). Deste modo, seria detectada reatividade cruzada entre DENV e ZIKV, mas com maiores títulos de IgG anti-ZIKV. Já os resultados do receptor 1 demonstraram que o mesmo já havia sido exposto a

outro flavivírus, como o DENV, apresentando reatividade para DENV em maiores títulos que para ZIKV antes de receber a bolsa de plaquetas (amostra R1-4) e na fase aguda da infecção pelo ZIKV (amostra R1+6 – amostra PCR positivo para ZIKV) (figura 14 – página 34). Na terceira coleta deste indivíduo (R1+30), na qual já existiria produção de IgG anti-ZIKV (Marcondes et al., 2016), foi detectada reatividade cruzada até a última diluição de soro (Anexo 1d). Este padrão de marcação se assemelha ao observado por Lanciotti e colaboradores no surto de ZIKV nas Ilhas Yap, 2007, no qual pacientes expostos previamente a algum flavivírus desenvolviam altos títulos de IgG após a exposição ao ZIKV (Lanciotti et al., 2008).

A titulação da amostra do receptor 2 coletada 23 dias após a transfusão (R2+23) demonstrou um padrão diferente do que é normalmente descrito na literatura (Charrel et al., 2016; Lanciotti et al., 2008; Marcondes et al., 2016). Mesmo depois desse tempo, nesta coleta só foi detectada reatividade muito baixa na diluição de 1:80 para ambos os vírus (Anexo 1e). Normalmente indivíduos infectados por flavivírus, como o ZIKV e DENV, produzem IgG contra o vírus cerca de 10 dias após a infecção (Charrel et al., 2016). Ainda que na coleta 51 dias após a transfusão o título de IgG anti-ZIKV tenham aumentado mais de 4 vezes (de 1:80 para 1:1240 em comparação com a amostra R2+23 – Anexo 1f), o que seria padrão para definir soroconversão (Marcondes et al., 2016), os títulos de IgG foram baixos em comparação com as amostras D+11 e R1+30 (amostras de fase convalescente para ZIKV do doador e do receptor 1, respectivamente). A menor e mais retardada produção de anticorpos, bem como a viremia prolongada (tabela 7) por este paciente, podem ser explicados pelo estado imunológico do mesmo, visto que ele estava passando por uma terapia imunossupressora na época da transfusão.

Em conjunto com os dados obtidos por PCR e pelas outras técnicas sorológicas (TR/PRNT), foi possível diagnosticar que esses indivíduos foram infectados pelo ZIKV. Junto com sequenciamento do genoma viral presente nas amostras destes pacientes, foi possível demonstrar que houve transmissão do ZIKV durante a transfusão de plaquetas. A descrição deste caso foi publicada em na revista científica *New England Journal of Medicine*, no anexo 2. Este caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas, além dos outros casos descritos em transfusão sanguínea (Barjas-Castro et al., 2016), ressaltam a

importância da triagem para ZIKV de bolsas nos bancos de sangue e a necessidade de desenvolver novos protocolos de controle microbiológico destes materiais (Musso et al., 2014).

Com relação às amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação, é necessário enfatizar que o estado da Paraíba foi a segunda região com maior prevalência de microcefalia no Brasil no final do ano de 2015 e início de 2016, sendo também uma das regiões com maior prevalência de febre do ZIKV nesta época (Melo et al., 2016). Atualmente, a região apresenta 159 casos de microcefalia confirmados para infecção pelo ZIKV acumulados desde 2015 (Brasil. Ministério da Saúde. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias., 2016b).

Neste trabalho, identificamos anticorpos IgG anti-ZIKV em 19 das 21 mulheres analisadas pela IFI. Entretanto, não foi possível relacionar os títulos de IgG anti-DENV ao grau de severidade das malformações fetais nos casos de infecção congênita pelo ZIKV (amostras do grupo I). Nas pacientes do grupo II, no qual as duas amostras eram de casos de bebês sem malformações congênitas (amostras das pacientes 524 e 630), foi observada intensa reatividade para ZIKV para ambas. Com relação ao DENV2, a amostra 524 demonstrou uma reatividade bastante fraca, sugerindo que a mesma não possui IgG anti-DENV. Já a amostra 630 demonstrou considerável reatividade para DENV2. Entretanto, o padrão de reatividade desta amostra na IFI sugere que a mesma estaria na fase convalescente da infecção pelo ZIKV, sendo a reatividade para DENV2 advinda de anticorpos cruzados, padrão semelhante ao da amostra D+11 (figura 13, página 33) do caso de transfusão, na qual o indivíduo estava em fase convalescente da infecção pelo ZIKV na ausência de exposição prévia a outro flavivírus, como o DENV.

No grupo III de amostras analisadas, ainda não era conhecido o desfecho clínico do neonato, impossibilitando qualquer tipo de associação nestes casos. Além disso, o fato de não terem sido realizadas coletas pareadas destas mães impossibilitou determinar se as mesmas estavam em fase aguda ou convalescente tanto para a infecção pelo ZIKV quanto pelo DENV. Estes dados deixam clara a importância do acompanhamento médico de

gestantes e seus filhos, enfatizando a importância do diagnóstico laboratorial acompanhado de uma análise clínica criteriosa.

Em um modelo de infecção murino para ZIKV, foi demonstrada a prevenção, por anticorpos, da infecção congênita sob imunização com uma vacina de DNA contra este vírus (Larocca et al., 2016). No entanto, além desta vacina ser direcionada para apenas um antígeno viral, a proteína pre-M, a infecção natural por ZIKV ou por DENV em humanos desencadeia a produção de diversos anticorpos, muitos capazes de reconhecer epítomos comuns entre ambos os vírus, mas com pouca capacidade neutralizante (Flipse et al., 2016; Kawiecki; Christofferson, 2016). Como mencionado, estes anticorpos não-neutralizantes podem levar ao fenômeno de ADE, ou seja, aumento da infecção mediada por anticorpos (Flipse et al., 2016; Kawiecki; Christofferson, 2016). Ainda não é determinada a relevância da ADE gerada por anticorpos anti-DENV sobre o ZIKV *in vivo*, sobretudo na síndrome congênita da ZIKV, mas, além do fato de existir transferência da mãe para o feto destes anticorpos (Watanaveeradej et al., 2003), já foi demonstrado que a presença de resposta heterotípica, ou seja, entre sorotipos diferentes, durante a infecção pelo DENV está associada ao aumento da infecção congênita por este vírus, com agravamento dos sintomas nos neonatos (Castanha et al., 2016).

Estas informações são de enorme importância para o desenvolvimento de vacinas e de terapias contra a infecção pelo ZIKV, bem como para o estabelecimento de medidas de controle com finalidade de proteger e monitorar os diferentes grupos populacionais, com relação aos dados soro-epidemiológicos para ZIKV e dengue. O uso de técnicas de diagnóstico, como a imunofluorescência indireta descrita neste trabalho, seria uma das principais ferramentas para viabilizar estes processos.

7 CONCLUSÕES

- A IFI das amostras do caso exclusivo de ZIKV do painel de validação condiz com o diagnóstico prévio realizado por outras técnicas, ainda que exista reatividade cruzada entre IgG anti-ZIKV e anti-DENV;

- As amostras de dengue demonstraram intensa reatividade para ambos os vírus na fase convalescente da dengue, evidenciando que a IFI proposta não corroborou com todos os dados sorológicos obtidos previamente por outras técnicas (apenas o PRNT);
- A IFI foi capaz de detectar IgG anti-ZIKV em amostra de sangue de cordão umbilical de um neonato com microcefalia decorrente da infecção congênita pelo ZIKV, sugerindo que outros espécimes clínicos podem ser alvo de estudo;
- As análises das IFIs do caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas demonstraram soroconversão para ZIKV nos três pacientes envolvidos;
- A titulação de amostras na IFI permitiu diferenciar os títulos de IgG específica para ZIKV e para DENV;
- Em amostras de fase convalescente para ZIKV, como a amostra R1+30 (figura 13), nas quais o paciente já foi previamente exposto a outro flavivírus, como o DENV, não foi possível diferenciar os títulos de IgG específica para estes vírus dentro da faixa de diluição utilizada;
- Na análise de amostras de mães expostas ao ZIKV durante a gestação foi observada a presença de anticorpos anti-ZIKV em 19 de 21 casos e uma heterogeneidade entre as amostras com relação aos títulos de IgG anti-DENV;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRANI, M. EL et al. Guillain-Barré syndrome complicating a chikungunya virus infection. **Neurology**, v. 69, p. 2105–2106, 2007.

ARAUJO, A. Q. C. et al. Zika virus-associated neurological disorders: a review. **Brain : a journal of neurology**, v. 12:, n. 5, p. 1173–1183, 2016.

ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253–255, 2016.

ATKINSON, B. et al. Detection of zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.

BERTHET, N. et al. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the central African republic. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 12, p. 862–865, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **Informe Epidemiológico n. 2/2015 - Semana Epidemiológica 47 (22 a 28/11/2015)**, 2015. Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/30/coes-microcefalias---informe-epidemiol--gico--se-47.pdf>>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **INFORME EPIDEMIOLÓGICO Nº 53 –SEMANA EPIDEMIOLÓGICA (SE) 46/2016 (13/11/2016 A 19/11/2016) MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://combateades.saude.gov.br/images/boletins-epidemiologicos/informe_microcefalia_epidemiologico53.pdf>.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC)**. [s.l: s.n.].

C ARAUJO, A. Q. et al. Zika virus-associated neurological disorders: a review. v. 1947, p. 1–9, 2016.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 653–660, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. **Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013** **Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2014.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **The New England Journal of Medicine**, p. NEJMc1602964, 2016.

CASALS, J. Procedures for identification of arthropod-borne viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 24, p. 723–734, 1961.

CASTANHA, P. M. S. et al. Placental transfer of dengue virus (DENV)-specific antibodies and kinetics of DENV infection-enhancing activity in Brazilian infants. **Journal of Infectious Diseases**, p. 1–26, 2016.

CHA, G. W. et al. Comparison of four serological tests for detecting antibodies to Japanese encephalitis virus after vaccination in children. **Osong public health and research perspectives**, v. 5, n. 5, p. 286–91, 2014.

CHARREL, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **مراجعة** **زیکا بفيروس العدوى تشخيص اختبارات بتطوير الخاصة الأساسية للمعلومات**, v. 94, n. 8, p. 574–584D, 2016.

CLETON, N. et al. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, 2012.

CROWTHER, J. R. **Elisa**. [s.l: s.n.]. v. 42

DE FATIMA VASCO ARAGAO, M. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v. 353, p. i1901, 2016.

DE PAULA FREITAS, B. et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed

Zika Virus Congenital. **JAMA Ophthalmology**, p. 1–19, 2016.

DECALLONNE, B.; BOUILLON, R. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. **JOURNAL OF BIOMOLECULAR TECHNIQUES**, v. 14, n. 1, p. 33–43, 2003.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, n. June, p. 1–8, 2016.

DIAMOND, M. S. et al. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **Journal of virology**, v. 74, n. 11, p. 4957–66, 2000.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF. v. 46, n. 5, 1952.

DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome, 10 December 2015. n. December, p. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications>, 2015.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of hygiene**, v. 83, p. 213–219, 1979.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FERNANDA ESTOFOLETE, C. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika Virus Infection in Dengue Suspected Patients: A case series. **Journal of Clinical Virology**, v. 81, n. May 2015, p. 25–30, 2016.

FIERZ, W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. **Methods in molecular medicine**, v. 94, p. 393–427, 2004.

FLIPSE, J. et al. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 29201, 2016.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

GOURINAT, A. C. et al. Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains : Geographic Expansion of the Asian Lineage. v. 6, n. 2, 2012.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue virus replication enhancement in peripheral blood leukocytes from immune human beings. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 151, n. 1, p. 136–139, 1976.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031–1034, 2016.

HEYMANN, D. L. et al. Zika virus and microcephaly: Why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719–721, 2016.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em:
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20130250>.

IOOS, S. et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics** *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2014.

KAWIECKI, A. B.; CHRISTOFFERSON, R. C. Zika-induced antibody response enhances dengue serotype 2 replication in vitro. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–31, 2016.

KORHONEN, E. M. et al. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 1, p. tav011, 2016.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 2016.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flavivirus. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LUCCHESI, G.; KANDUC, D. Zika virus and autoimmunity: from mycrocephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. **Autoimmunity reviews**, 2016.

M??CHARLES, S. et al. **Acute myelitis due to Zika virus infection** *The Lancet*, 2016.

MACNAMARA, F. N. ZIKA VIRUS: A REPORT ON THREE CASES OF HUMAN INFECTION DURING AN EPIDEMIC OF JAUNDICE IN NIGERIA. v. 48, n. 2, p. 17, 1954.

MARCONDES, C. B. et al. Epidemiological Alert. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–5, 2015.

MARCONDES, C. B. et al. Zika fever. **The Lancet**, v. 387, n. 4, p. 1–10, 2016.

MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 1–6, 2016a.

MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 1–6, 2016b.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ**, v. 352, n. February, p. i720, 2016.

MELO, A. S. DE O. et al. Congenital Zika Virus Infection. **JAMA Neurology**, p. 1–10, 2016.

Ministério da Saúde. Assunto : Procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do vírus Zika no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE, , 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Protocolo de Vigilância e Resposta À Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. **Versão 1.2 - 09/12/2015**, p. 70, 2015.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016a.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–8, 2016b.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, 2014a.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, 2014b.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.

NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, n. xx, 2016.

OISHI, K. et al. **Dengue illness: Clinical features and pathogenesis** *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2007.

OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

ORGANISATION, W. H. Guiderlines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Geneva: WHO**, p. 26, 2007.

PETERSEN, E. E. et al. Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak - United States, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 2, p. 30–3, 2016.

QIN, C.; QI, J.; GAO, G. F. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Article Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

RABE, I. B. et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 21, p. 543–546, 2016.

RAMOS DA SILVA, S.; GAO, S.-J. Zika Virus: An Update on Epidemiology, Pathology, Molecular Biology and Animal Model. **Journal of Medical Virology**, n. April, p. 1–24, 2016.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, p. 1–7, 2016.

ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological investigation of yellow fever in Sierra Leone. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 68, n. 3, p. 249–258, 1975.

ROOSECELIS BRASIL MARTINES et al. Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, p. 1–2, 2016.

RUDOLPH, K. E. et al. **Review article: Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review** **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2014.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly-Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. [s.l: s.n.].

SHINOHARA, K. et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. **Journal of travel medicine**, v. 23, n. 1, p. tav011, 2016.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 5316, n. March, p. 1–7, 2016.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet (London, England)**, v. 355, n. 9209, p. 1053–9, 2000.

TIRADO, S. M. C.; YOON, K.-J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. **Viral Immunology**, v. 16, n. 1, p. 69–86, 2003.

VENTURA, C. V. et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3227–3234, 2000.

WATANAVEERADEJ, V. et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 2, p. 123–128, 2003.

WILSON, M. E.; CHEN, L. H. **Dengue in the Americas** **Dengue Bulletin**, 2002.

WINER, J. B. Guillain Barré syndrome. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v. 54, p. 381–385, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Birth defects surveillance: a manual for programme managers. p. 126, 2014.

YUKI, N.; HARTUNG, H. Guillain-Barré Syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 24, p. 2294–2304., 2012.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZANLUCA, C.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

AMRANI, M. EL et al. Guillain-Barré syndrome complicating a chikungunya virus infection. **Neurology**, v. 69, p. 2105–2106, 2007.

ARAUJO, A. Q. C. et al. Zika virus-associated neurological disorders: a review. **Brain : a journal of neurology**, v. 12, n. 5, p. 1173–1183, 2016.

ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253–255, 2016.

ATKINSON, B. et al. Detection of zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 940, 2016.

BERTHET, N. et al. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the central African republic. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 14, n. 12, p. 862–865, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **Informe Epidemiológico n. 2/2015 - Semana Epidemiológica 47 (22 a 28/11/2015)**, 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/30/coes-microcefalias---informe-epidemiol--gico--se-47.pdf>>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CENTRO DE OPERAÇÕES DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA SOBRE MICROCEFALIAS. **INFORME EPIDEMIOLÓGICO Nº 53 –SEMANA EPIDEMIOLÓGICA (SE) 46/2016 (13/11/2016 A 19/11/2016) MONITORAMENTO DOS CASOS DE MICROCEFALIA NO BRASIL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/images/boletins-epidemiologicos/informe_microcefalia_epidemiologico53.pdf>.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC)**. [s.l: s.n.].

C ARAUJO, A. Q. et al. Zika virus-associated neurological disorders: a review. v. 1947, p. 1–9, 2016.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 653–660, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. **Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013** **Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2014.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CARTEAUX, G. et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **The New England Journal of Medicine**, p. NEJMc1602964, 2016.

CASALS, J. Procedures for identification of arthropod-borne viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 24, p. 723–734, 1961.

- CASTANHA, P. M. S. et al. Placental transfer of dengue virus (DENV)-specific antibodies and kinetics of DENV infection-enhancing activity in Brazilian infants. **Journal of Infectious Diseases**, p. 1–26, 2016.
- CHA, G. W. et al. Comparison of four serological tests for detecting antibodies to Japanese encephalitis virus after vaccination in children. **Osong public health and research perspectives**, v. 5, n. 5, p. 286–91, 2014.
- CHARREL, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **مراجعة** **زیکا بفيروس العدوى تشخيص اختبارات بتطوير الخاصة الأساسية للمعلومات**, v. 94, n. 8, p. 574–584D, 2016.
- CLETON, N. et al. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191–203, 2012.
- CROWTHER, J. R. **Elisa**. [s.l: s.n.]. v. 42
- DE FATIMA VASCO ARAGAO, M. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v. 353, p. i1901, 2016.
- DE PAULA FREITAS, B. et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital. **JAMA Ophthalmology**, p. 1–19, 2016.
- DECALLONNE, B.; BOUILLON, R. The Use of Real-Time Reverse Transcriptase PCR for the Quantification of Cytokine Gene Expression. **JOURNAL OF BIOMOLECULAR TECHNIQUES**, v. 14, n. 1, p. 33–43, 2003.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, n. June, p. 1–8, 2016.
- DIAMOND, M. S. et al. Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **Journal of virology**, v. 74, n. 11, p. 4957–66, 2000.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF. v. 46, n. 5, 1952.
- DUFFY M. CHEN T. HANCOCK T. POWERS A. KOOL J. LANCIOTTI R. PRETRICK M. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.
- ENGVAL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome, 10 December 2015. n. December, p. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications>, 2015.
- FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of hygiene**, v. 83, p. 213–219, 1979.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.
- FERNANDA ESTOFOLETE, C. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika Virus Infection in Dengue Suspected Patients: A case series. **Journal of Clinical Virology**, v. 81, n. May 2015, p. 25–30, 2016.

FIERZ, W. Basic problems of serological laboratory diagnosis. **Methods in molecular medicine**, v. 94, p. 393–427, 2004.

FLIPSE, J. et al. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 29201, 2016.

FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

GOURINAT, A. C. et al. Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84–86, 2015.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S7–S16, 2010.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains : Geographic Expansion of the Asian Lineage. v. 6, n. 2, 2012.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue virus replication enhancement in peripheral blood leukocytes from immune human beings. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 151, n. 1, p. 136–139, 1976.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031–1034, 2016.

HEYMANN, D. L. et al. Zika virus and microcephaly: Why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719–721, 2016.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em:
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20130250>.

IOOS, S. et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics** *Medecine et Maladies Infectieuses*, 2014.

KAWIECKI, A. B.; CHRISTOFFERSON, R. C. Zika-induced antibody response enhances dengue serotype 2 replication in vitro. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–31, 2016.

KORHONEN, E. M. et al. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. **Eurosurveillance**, v. 23, n. 1, p. tav011, 2016.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474–478, 2016.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flavivirus. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LUCCHESI, G.; KANDUC, D. Zika virus and autoimmunity: from mycrocephaly to Guillain-Barré syndrome, and beyond. **Autoimmunity reviews**, 2016.

M??CHARLES, S. et al. **Acute myelitis due to Zika virus infection** *The Lancet*, 2016.

MACNAMARA, F. N. ZIKA VIRUS: A REPORT ON THREE CASES OF HUMAN INFECTION DURING

- AN EPIDEMIC OF JAUNDICE IN NIGERIA. v. 48, n. 2, p. 17, 1954.
- MARCONDES, C. B. et al. Epidemiological Alert. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1–5, 2015.
- MARCONDES, C. B. et al. Zika fever. **The Lancet**, v. 387, n. 4, p. 1–10, 2016.
- MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 1–6, 2016a.
- MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 1–6, 2016b.
- MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ**, v. 352, n. February, p. i720, 2016.
- MELO, A. S. DE O. et al. Congenital Zika Virus Infection. **JAMA Neurology**, p. 1–10, 2016.
- Ministério da Saúde. Assunto : Procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do vírus Zika no Brasil.** MINISTÉRIO DA SAÚDE, , 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE. Protocolo de Vigilância e Resposta À Microcefalia Relacionada À Infecção Pelo Vírus Zika. **Versão 1.2 - 09/12/2015**, p. 70, 2015.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–8, 2016.
- MUSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, 2014a.
- MUSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, 2014b.
- MUSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.
- MUSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
- MUSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. O595–O596, 2014.
- NUNES, M. L. et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, n. xx, 2016.
- OISHI, K. et al. **Dengue illness: Clinical features and pathogenesis** **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2007.
- OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.
- OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.
- ORGANISATION, W. H. Guiderlines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Geneva: WHO**, p. 26, 2007.

PETERSEN, E. E. et al. Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak - United States, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 2, p. 30–3, 2016.

QIN, C.; QI, J.; GAO, G. F. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Article Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

RABE, I. B. et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 21, p. 543–546, 2016.

RAMOS DA SILVA, S.; GAO, S.-J. Zika Virus: An Update on Epidemiology, Pathology, Molecular Biology and Animal Model. **Journal of Medical Virology**, n. April, p. 1–24, 2016.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, p. 1–7, 2016.

ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological investigation of yellow fever in Sierra Leone. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v. 68, n. 3, p. 249–258, 1975.

ROOSECELIS BRASIL MARTINES et al. Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, p. 1–2, 2016.

RUDOLPH, K. E. et al. **Review article: Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review** **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2014.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly-Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**. [s.l.: s.n.].

SHINOHARA, K. et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. **Journal of travel medicine**, v. 23, n. 1, p. tav011, 2016.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 5316, n. March, p. 1–7, 2016.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet (London, England)**, v. 355, n. 9209, p. 1053–9, 2000.

TIRADO, S. M. C.; YOON, K.-J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. **Viral Immunology**, v. 16, n. 1, p. 69–86, 2003.

VENTURA, C. V. et al. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, n. 1, p. 1–3, 2016.

WANG, E. et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of virology**, v. 74, n. 7, p. 3227–3234, 2000.

WATANAVEERADEJ, V. et al. Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 2, p. 123–128, 2003.

WILSON, M. E.; CHEN, L. H. **Dengue in the Americas** *Dengue Bulletin*, 2002.

WINER, J. B. Guillain Barré syndrome. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v. 54, p. 381–385, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Birth defects surveillance: a manual for programme managers. p. 126, 2014.

YUKI, N.; HARTUNG, H. Guillain-Barré Syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 24, p. 2294–2304., 2012.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

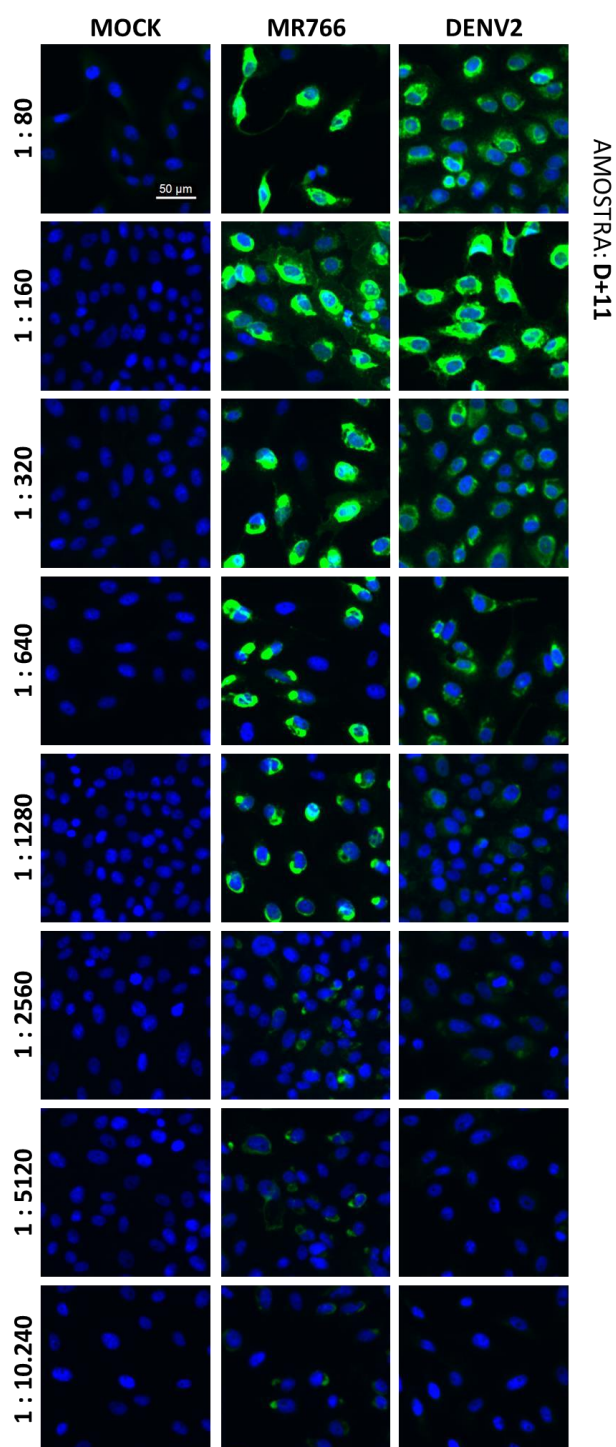
ZANLUCA, C.; DUARTE DOS SANTOS, C. N. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

9 ANEXOS

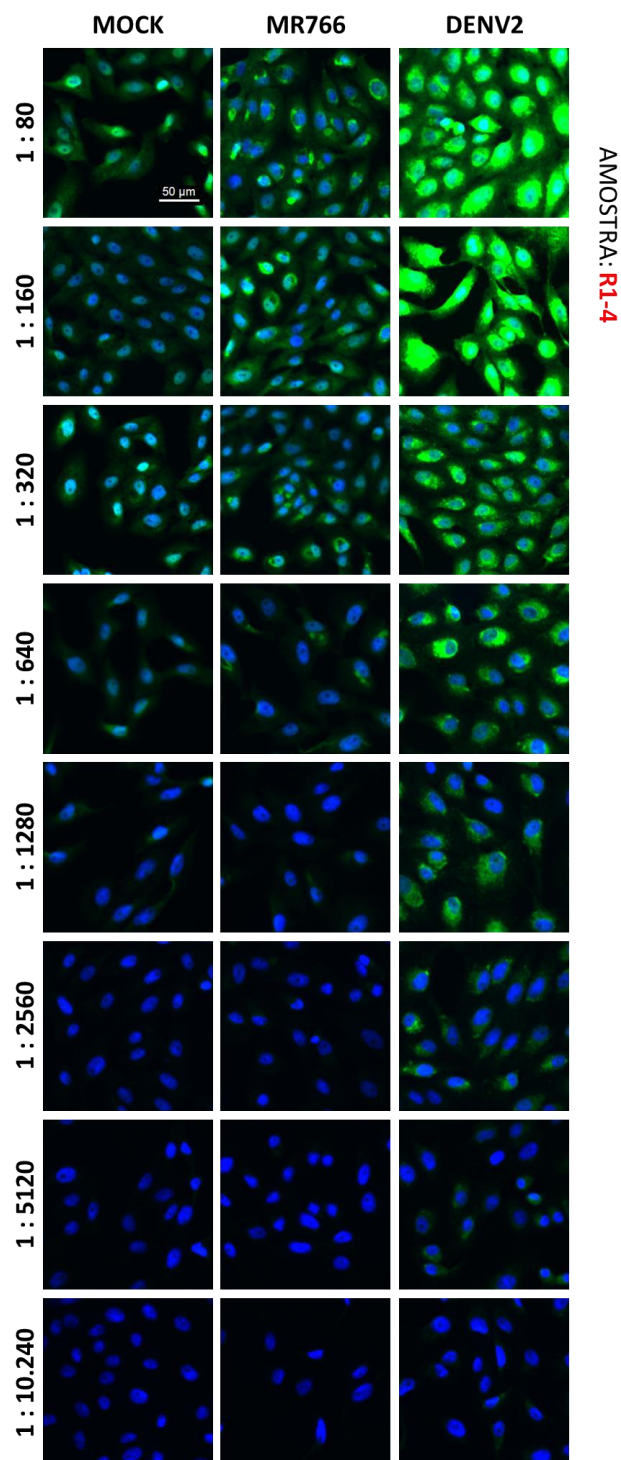
A seguir, estão organizados os documentos anexos ao trabalho.

9.1 Anexo 1. Titulação das amostras dos pacientes envolvidos no caso de transmissão de ZIKV por transfusão de plaquetas.

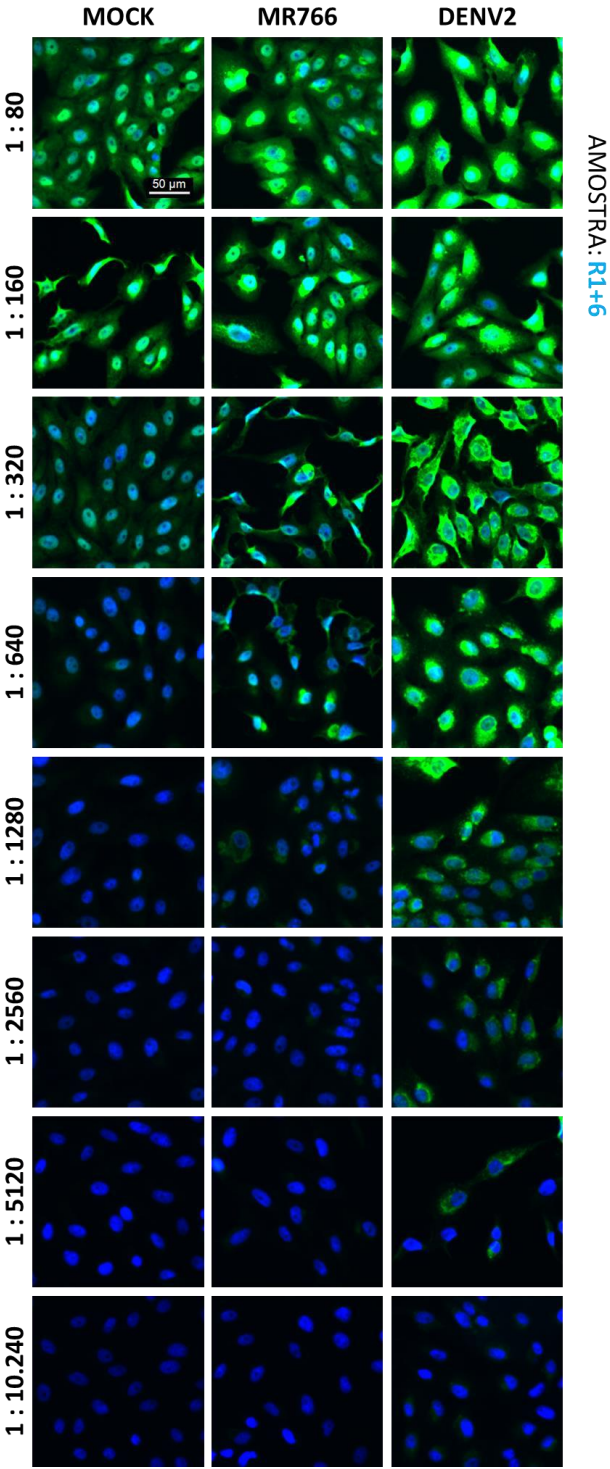
9.1.1 Anexo 1a. amostra do indivíduo doador de plaquetas 11 dias após a data de transfusão (D+11).



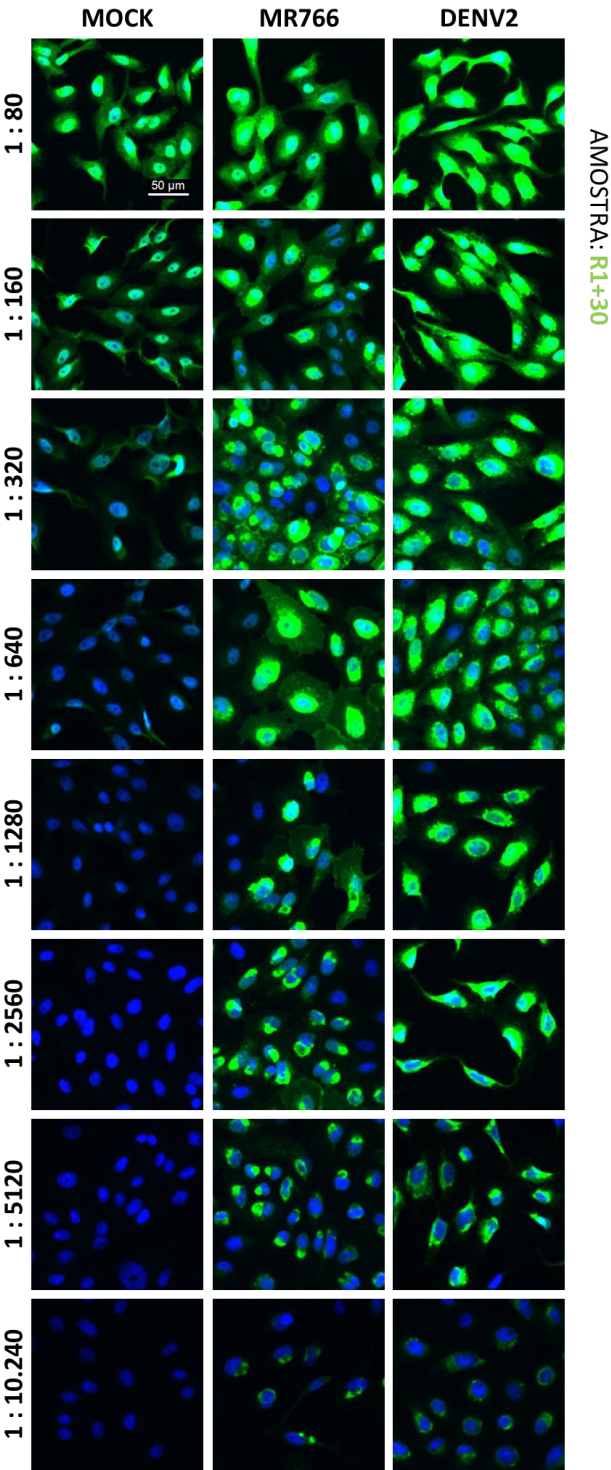
9.1.2 Anexo 1b. amostra do receptor 1 coletada 4 dias antes da data de transfusão (R1-4).



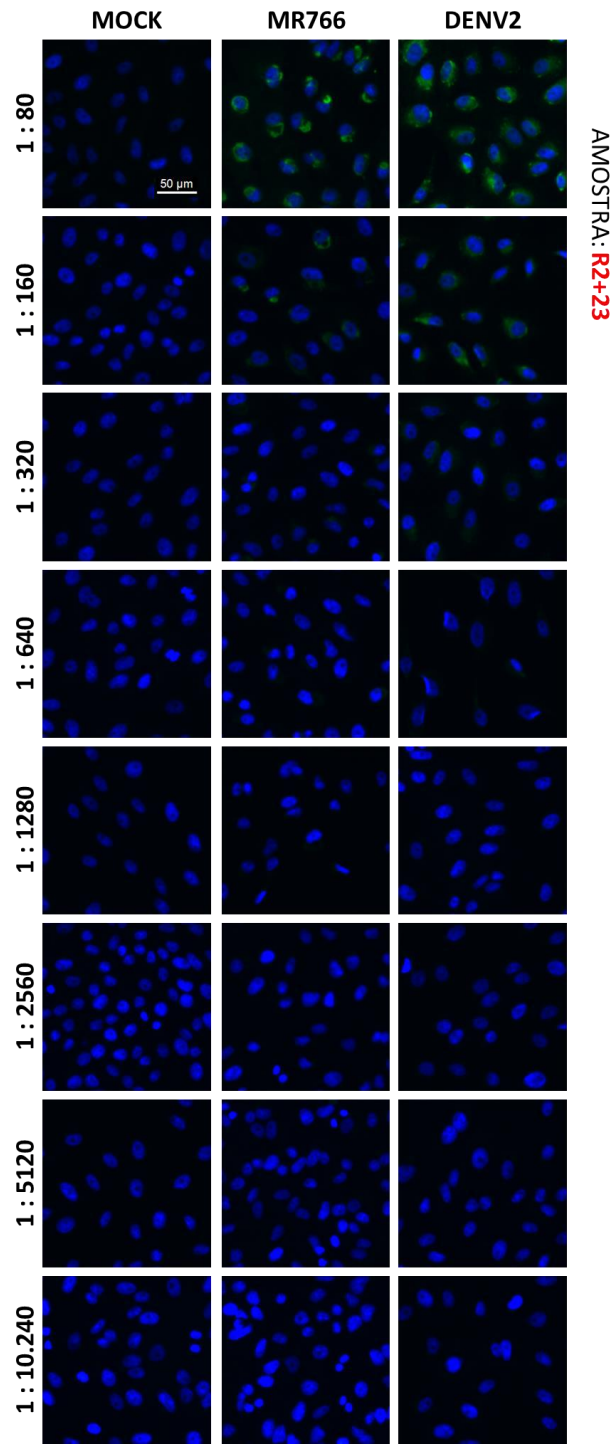
9.1.3 Anexo 1c. amostra do receptor 1 coletada 6 dias após a data de transfusão (R1+6).



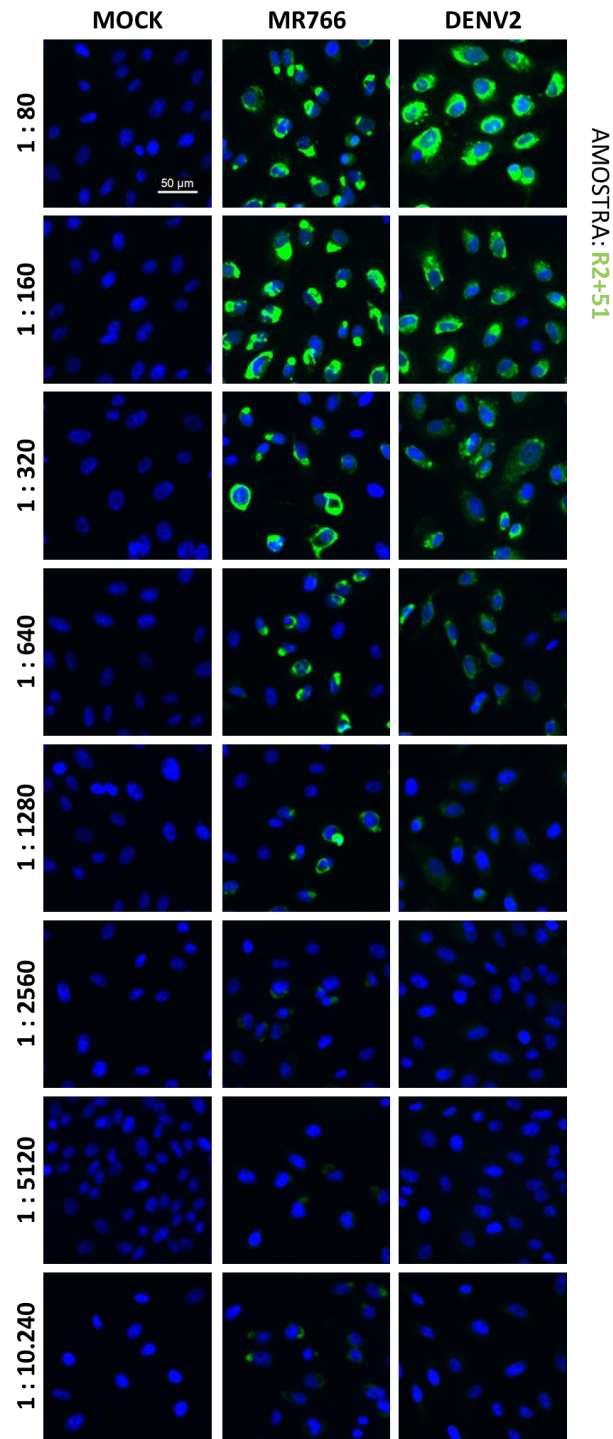
9.1.4 Anexo 1d. amostra do receptor 1 coletada 30 dias após a data de transfusão (R1+30).



9.1.5 Anexo 1e. amostra do receptor 2 coletada 23 dias após a data de transfusão (R2+23).



9.1.6 Anexo 1f. amostra do receptor 2 coletada após 51 dias da data de transfusão (R2+51).



9.2 Anexo 2. Artigo - *Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion.*

Artigo publicado pelo grupo do Laboratório de Virologia Molecular descrevendo o caso de transmissão do ZIKV por transfusão de plaquetas na revista científica *New England Journal of Medicine* – 15 de setembro de 2016.

Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion

TO THE EDITOR: Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne virus that has important secondary means of transmission that include perinatal and sexual modes.^{1,2} The potential for transmission in transfused donated blood components has been a concern owing to the detection of ZIKV viremia in healthy blood donors.⁴

This report from Brazil describes two cases of likely ZIKV transmission by blood transfusion from one presymptomatic infected person who donated platelets by apheresis on January 16, 2016. The two leukodepleted platelet units were irradiated with 25 Gy delivered by an IBL-437C gamma irradiator (Cis Bio International) and were transfused in different patients on January 19 (day 0). On January 21, the donor called the blood bank to report a cutaneous rash, retro-orbital pain, and pain in both knees that had begun on January 18. An investigation was initiated under the hospital's clinical protocol for transfusion-associated adverse events, with the donor and both patients providing written informed consent.

Two samples that were obtained from the donor before and after donation were negative

for chikungunya virus (CHIKV) and dengue virus (DENV) on reverse-transcriptase–polymerase-chain-reaction (RT-PCR) assay, but the index plasma and urine samples 14 days later were positive for ZIKV (Table 1). (Details of the methods that were used and results are provided in the Supplementary Appendix, available with the full text of this letter at NEJM.org.) Serologic analysis by means of point-of-care testing, in-house indirect immunofluorescence assay (IFA), and plaque-reduction neutralization testing (PRNT) confirmed the presence of acute ZIKV infection in the donor.

The first recipient (Patient 1) was a 54-year-old woman with the primary myelofibrosis syndrome. The second recipient (Patient 2) was a 14-year-old girl with acute myeloid leukemia who had undergone haploidentical bone marrow transplantation on January 6, after which she had been receiving continuous immunosuppressive therapy. Routine pretransfusion samples obtained from the two patients were negative on PCR assay for CHIKV, DENV, and ZIKV, but samples collected 6 days after platelet transfusion in Patient 1 and 23 to 51 days after platelet transfu-

Table 1. Results of Molecular and Serologic Testing of Samples Obtained from the Platelet Donor and the Two Recipients.*

Donor or Patient†	Molecular Testing				Serologic Testing						
	ZIKV (Ct)‡		CHIKV	DENV	PRNT§	IFA IgG¶		ZIKV POC		DENV-Capture ELISA**	
	Plasma	Urine	Plasma	Plasma	ZIKV	ZIKV	DENV	IgM	IgG	IgM	IgG
Donor											
Day -3	Pos (23)		Neg	Neg							
Day 11	Neg	Pos (33)	Neg	Neg	1:1280	++	+/-	Pos (143)	Pos (239)	Pos (1.4)	Neg (0.5)
Patient 1											
Day -4	Neg		Neg	Neg		-	+++	Neg (7)	Pos (57)	Neg (0.6)	Pos (5.0)
Day 6	Pos (33)		Neg	Neg		+	++++	Neg (9)	Sus (32)	Neg (0.7)	Pos (4.9)
Day 31	Neg				1:2560	++++	++++	Sus (33)	Pos (335)	Pos (2.3)	Pos (5.4)
Patient 2											
Day -1	Neg		Neg	Neg							
Day 1	Neg		Neg	Neg							
Day 23	Pos (36)		Neg	Neg	1:40	-	-	Neg (7)	Sus (20)	Neg (0.1)	Neg (0.3)
Day 51	Neg/Pos††				1:20	++	+/-	Neg (4)	Neg (17)	Neg (0.2)	Neg (0.3)
Day 71	Neg							Neg (12)	Neg (5)		

* CHIKV denotes chikungunya virus, DENV dengue virus, ELISA enzyme-linked immunosorbent assay, IFA indirect immunofluorescence assay, Neg negative, POC point of care, Pos positive, PRNT plaque-reduction neutralization test, Sus suspected infection, and ZIKV Zika virus.

† Day 0 was January 19, 2016, the date of transfusion for both recipients.

‡ Ct denotes the threshold cycle (indicated by the values in parentheses) at which the result on reverse-transcriptase–polymerase-chain-reaction (RT-PCR) assay was positive.

§ PRNT values represent the serum dilution causing plaque reductions of 90%.

¶ IFA intensity ranges from low (+) to high (++++).

|| The values in parentheses are measures of test-band intensity in arbitrary units, with results classified as negative (<20 units), suspected infection (20 to 39 units), and positive (≥40 units).

** The values in parentheses are the sample optical density divided by the assay cutoff.

†† The positive result on day 51 was obtained in a sample that had four times the starting volume on RT-PCR.

sion in Patient 2 were positive for ZIKV on PCR assay.

Molecular sequencing and phylogenetic analysis of ZIKV RNA isolated from the donor and from the two patients confirmed the identity of their ZIKV isolates, with nucleotide changes in the envelope gene (codons 11 and 186) shared only by the donor and platelet recipients among available isolates from Brazil (GenBank accession numbers, KX173840, KX173841, KX173842, and KX173844) (Table S1 in the Supplementary Appendix). Against a backdrop of a high degree of conservation (>99% nucleotide identity) of ZIKV isolates in the Western Hemisphere,³ the possibility of a single spatiotemporal cluster of mosquito-acquired cases was further undermined by the fact that Patient 2 lived 200 km away from Rio de Janeiro. Although neither patient was hospitalized in the period immediately preceding

viral detection and thus could have been exposed to aedes mosquitoes contemporaneously with the platelet transfusions, the temporal coincidence of the infection (shortly after ZIKV diagnosis in the donor) and the phylogenetic identity of ZIKV samples that were recovered strongly favor transfusion as the source of the infection.

Serologic data supported the findings from the molecular analysis. All the samples obtained from Patient 1 showed antibody reactivity to DENV-2 on both IFA and IgG-capture enzyme-linked immunosorbent assay, findings that were consistent with her report of a history of dengue fever. Seroconversion to ZIKV was evident in both IFA IgG and point-of-care results; her PRNT titer on day 31 was 1:2560. For Patient 2, reactivity on IFA developed between 23 and 51 days after transfusion, as did a modest neutralizing antibody titer. The limited cross-reactivity to DENV-2

CORRESPONDENCE

suggests ZIKV as the primary flavivirus infection. The limited antibody response in Patient 2 was presumably due to her ongoing immunosuppressive therapy. Although neither patient reported symptoms associated with ZIKV infection during the investigation, these data show evidence for ZIKV transmission by means of platelet transfusion.

Iara J.F. Motta, M.D.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Rio de Janeiro, Brazil

Bryan R. Spencer, M.P.H.

American Red Cross, Massachusetts Region
Dedham, MA

Suely G. Cordeiro da Silva, B.Sc.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Rio de Janeiro, Brazil

Monica B. Arruda, Ph.D., M.B.A.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, Brazil

Jane A. Dobbin, M.D.

Yung B.M. Gonzaga, M.D.

Ingrid P. Arcuri, M.D.

Rita C.B.S. Tavares, M.D.

Elias H. Atta, M.D.

Regina F.M. Fernandes, R.N.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Rio de Janeiro, Brazil

Deise A. Costa, B.Sc.

Liane J. Ribeiro, B.Sc.

Fabio Limonte

Luiza M. Higa, Ph.D.

Carolina M. Voloch, Ph.D.

Rodrigo M. Brindeiro, Ph.D.

Amilcar Tanuri, M.D., Ph.D.

Orlando C. Ferreira, Jr., M.D., Ph.D.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, Brazil

orlandocfj@gmail.com

Dr. Motta and Mr. Spencer contributed equally to this letter.

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

This letter was published on August 17, 2016, at NEJM.org.

1. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011;17:880-2.

2. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 2015;21:359-61.

3. 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. *Euro Surveill* 2014;19(13):20751.

4. Musso D, Nhan T, Robin E, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill* 2014;19(14):pii:20761.

5. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor Ldel C. Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:933-5.

DOI: 10.1056/NEJMc1607262

N ENGL J MED 375;11 NEJM.ORG SEPTEMBER 15, 2016

The New England Journal of Medicine

Downloaded from nejm.org on December 5, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2016 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Supplementary Appendix

This appendix has been provided by the authors to give readers additional information about their work.

Supplement to: Motta IJF, Spencer BR, Cordeiro da Silva SG, et al. Evidence for transmission of Zika virus by platelet transfusion. *N Engl J Med* 2016;375:1101-3. DOI: 10.1056/NEJMc1607262

Supplementary Appendix

Title:

Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion

Table of Contents

Methods	68
Detailed methods for genetic analysis	68
Detailed methods for serological analysis	71
Results	72
Background on donor and recipients	72
Phylogenetic analysis	73
Discussion	73
Figure S1: Timeline of donor and recipients.....	75
Figure S2. Bayesian inference of phylogeny for the envelope region sequences of Zika virus.....	76
Figure S3. Serological and virological assays with donor, R1 and R2 patient samples	77
Table S1: Sequence alignment of donor and recipient isolates with other Brazilian and South American samples	79
References	81

Methods

Detailed methods for genetic analysis

Viral RNA extraction and Real-Time RT-PCR

Viral RNA was extracted from 140 µL of serum, plasma or urine samples using the QIAamp

Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany), according to the manufacturer's recommendations. All samples were tested for ZIKV, CHIKV and DENV by real-time PCR using specific primer and probe sets and 5-FAM as reporter for the probe (ZIKV 1086, ZIKV 1162c and ZIKV

1107-FAM; CHIKV 6856, CHIKV 6981 and CHIKV 6919-FAM; DENV-F (10546)-generic, DENV-R (10711)-generic and DENV generic-FAM) [1-3]. RNA was amplified by real-time RT-PCR in an ABI Prism 7500 Real-Time cycler (Applied Biosystems, USA). The reaction was performed with 10µL of RNA by using the TaqMan One-Step Real-Time PCR Master Mixes reagents (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's protocol. For Zika RTPCR a Ct value corresponding to 38.5 was defined as the cut-off for a positive result.

Zika virus Nucleic Acid Sequencing

Samples positive by RT-PCR were amplified using the SuperScript III One-Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA Polymerase (LifeTechnologies, USA) following the manufacturer's protocol. The PCR was performed with the forward primer 5'-

TTGGTCATGATACTGCTGATTGC-3' and the reverse primer 5'-

CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3', generating a fragment of 328bp. Another fragment of

927bp were amplified with the same forward primer and the reverse primer 5'-

TTGTTCCAGTGTGGAGTTCC Both fragments were subjected to nucleic acid sequence analysis with the same sequencing primers by using the ABI BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, USA). Nucleotide sequence was determined by capillary

electrophoresis using the ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. Raw data from sequencing were aligned and edited by the SeqMan module of LaserGene (DNASTAR Inc.).

Phylogenetic analysis

Amplified fragments from the envelope region of the ZIKV genome were used to construct a phylogenetic tree comparing these isolates to ZIKV lineages from Asia, the Pacific and the Americas. Also, sequences were aligned and compared to 13 sequences from Brazil (n=8) and South America (n=5), using the GenBank sequence KU497555 as reference.

Bayesian inference of the phylogeny was performed on alignments of the envelope region of the polyprotein coding sequence. Since all Brazilian Zika isolates reported to date share the same origin as those of Asian, Pacific, and American lineages, we excluded all African lineage sequences from the analysis, and used only the American, Pacific and Asian Zika virus lineages sequences of the envelope region available with geographical information [4]. The generalized time-reversible (GTR) model with gamma-distributed evolutionary rates (G) and invariable sites (I), GTR+G+I, was used. MrBayes 3.2 software was used with two independent runs with four chains, sampling frequency every 500 generation. 25% of the MCMC samples were discarded as a burn-in step.

Detailed methods for serological analysis

The presence of anti-Zika IgM and IgG antibodies was investigated in donor and recipient plasma samples using a prototype Dual Path Platform Zika IgM/IgG rapid test (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, New York, USA). DENV-specific IgM and IgG capture ELISA assays (Standard Diagnostic, Inc, Gyeonggi-do, Korea) were run to assess crossreactivity to DENV. Also, an in-house indirect immunofluorescence assay (IFA) was performed to detect the presence of IgG against ZIKV, and plaque reduction neutralization tests (PRNT) were performed to evaluate specificity of reactivity to ZIKV. Details on the latter two methods follow below.

Indirect immunofluorescence assay (IFA)

The indirect immunofluorescence assay used was developed in our laboratory, adapted from Cha et al [5], and was performed to detect the presence of IgG against ZIKV in the plasma from donor and recipients of platelet transfusion. VERO cells were seeded in a clear bottom 96-well black plate (Greiner Bio-One Bioscience, Kremsmunster, Austria) and either negative controls, ZIKV or DENV2-infected at multiplicity of infection (MOI)=2. At 48 hours post-infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Cells were permeabilized and blocked with 0.1% triton in PBS with 3% bovine serum albumin (BSA) for 20 min at room temperature. To reduce unspecific staining, plasma samples were pre-incubated with the lysate of uninfected VERO cells for 1 hour at room temperature. Permeabilized negative control, ZIKV and DENV2-infected cells were incubated with serial dilutions of plasma from patients for 1 hour, washed in PBS and then labeled with anti-human IgG

antibody conjugated with AlexaFluor 488 for 30 min. Nuclei staining was performed with DAPI. Images were acquired on a Nikon eclipse TE300 inverted microscope couple to a Leica DFC310FX camera.

Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)

To detect the presence of neutralizing antibodies, PRNT was performed. To inactivate arboviruses and limit the effect of complement, plasma samples were incubated at 58°C for 30 min. Two-fold dilutions of heat-inactivated plasma were incubated with 100 plaque forming units (PFU) of ZIKV for 1 hour at 37°C. The virus-sera mixture was inoculated into confluent VERO cells. After 1 hour, inoculum was removed and semisolid medium was added. Cells were further incubated for 5 days and then fixed. Cells were stained with crystal violet dye solution.

Results

Background on donor and recipients

This investigation of possible transmission of arboviruses was initiated by the report of donor's symptoms to the blood bank, and was conducted under the Hemovigilance Protocol of the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. The donor and the two blood recipients were informed of the circumstances and provided written informed consent for additional samples and associated analysis. Pre- and post-transfusion samples from both patients were recovered from the repository, and additional samples were collected as available.

The first recipient (R1) routine pre- and post-transfusion blood samples were collected on an outpatient basis. She was admitted to hospital for monitoring of her underlying condition on February 13 and remained hospitalized until February 19, when an additional blood sample was collected.

Patient R2 was admitted on December 24, 2015 and received a haplo-identical BMT from her mother on January 6, and has been under continuous immunosuppressive therapy with tacrolimus mycophenolate mofetil since then. She was discharged on D13, and additional samples were collected at follow-up outpatient visits on D23, D51 and D71.

Phylogenetic analysis

A phylogenetic tree of a 927bp fragment from the ZIKV envelope gene was constructed from the donor and R1 sequences and other sequences from Brazil and South America available at GenBank. No differences were found between Donor and R1's sequences, confirming identity of isolates (Figure 1). These sequences were unique compared to others from Brazil and elsewhere in South America, including one case from Rio de Janeiro within 2 months time of the transfusion events (see Table S1). The shorter sequence from R2 reflects one of two nucleotide changes (codon 11) unique to these three isolates from those in GenBank.

Discussion

This report highlights the complexity of quantifying transfusion risk from Zika virus. The first challenge is the array of evidence required to conclusively show the ZIKV

infections in both patients are transfusion-transmitted rather than community-acquired. Though neither was hospitalized in the immediate period preceding viral detection and thus could have been exposed to *Aedes* mosquitoes contemporaneous with their platelet transfusion, the temporal coincidence of their infection shortly following ZIKV diagnosis in the blood donor strongly favors transfusion as the source of their infection. The sequence data reinforces this conclusion. In a short partial fragment of the envelope gene, sequences from Donor and both Recipients have identical nucleotide changes that are shared by no other available isolates from Brazil. Further, the possibility of a single spatiotemporal cluster of mosquito-acquired cases is undermined by R2's residence being 200km distant from Rio de Janeiro. In sum, temporal proximity, laboratory-confirmed diagnoses, and identical genetic polymorphisms found thus far only in three otherwise unlinked individuals altogether militates in favor of transfusion transmitted infection.

Figure S1: Timeline of donor and recipients

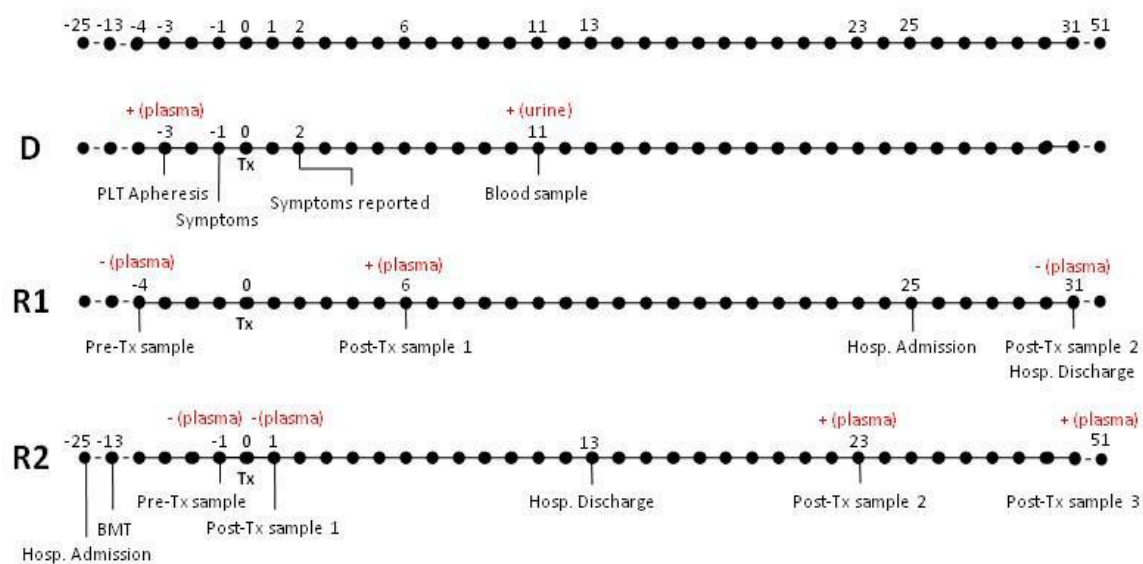
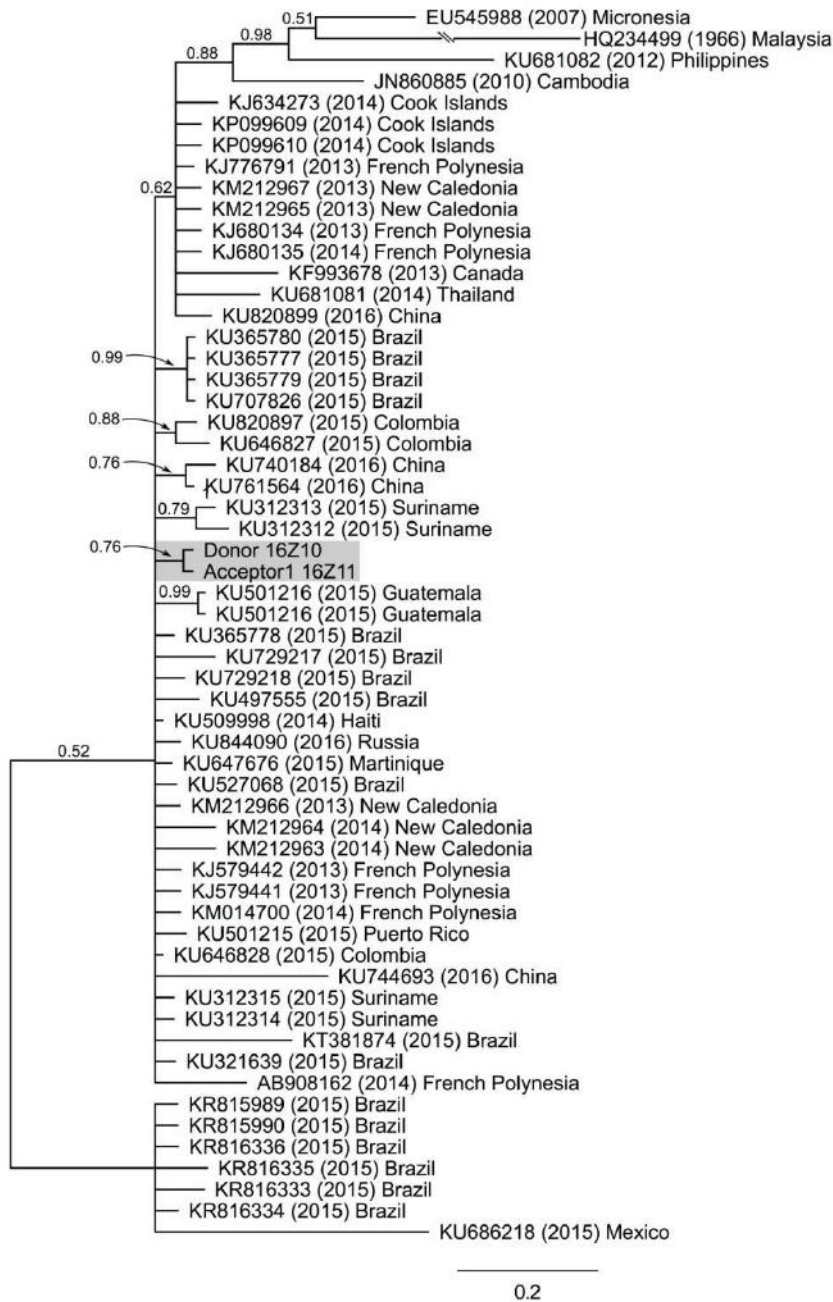


Figure S2. Bayesian inference of phylogeny for the envelope region sequences of Zika virus.



Bayesian posterior probabilities values are shown at nodes. Country and year of isolation are shown. Grey rectangle highlights the cluster composed by the donor and recipient R1 sequences.

Figure S3. Serological and virological assays with donor, R1 and R2 patient samples.

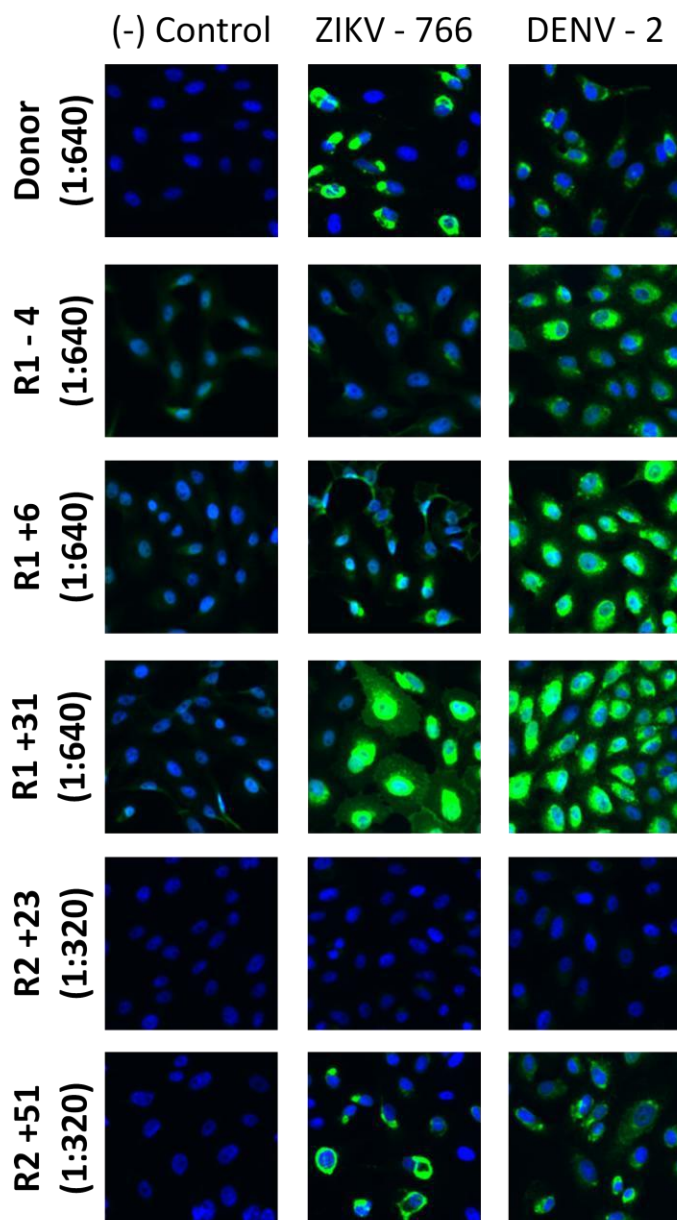


Figure S3a: IFA results using uninfected negative control Vero cells alongside those infected with reference ZIKV strain (766 from Africa) and DENV-2 virus. Results are shown for plasma titer of 1:640 (donor and R1) and 1:320 (R2).

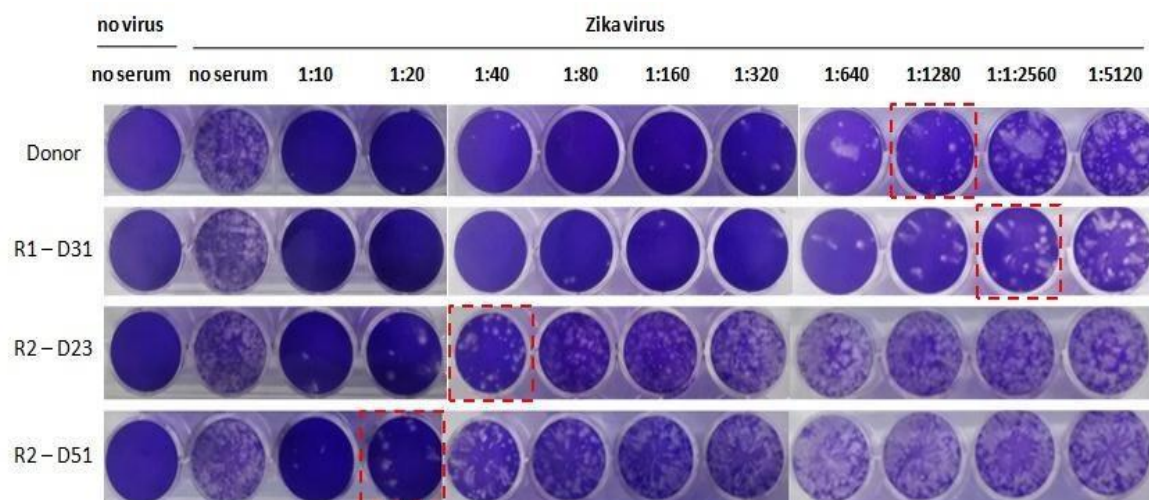


Figure S3b: Wells of the plaque reduction neutralization assay using serial dilution of plasma sample from donor (D11), R1 (D31) and R2 (D23 and D51). The dashed red square indicates PRNT₉₀ for each sample tested.

Table S1: Sequence alignment of donor and recipient isolates with other Brazilian and South American samples

Env Codon

KU497555 - Brz-PE

Donor16Z10-Brz-RJ

Accp116Z11-Brz-RJ

Accp216Z08-Brz-RJ

Plasm16Z62-Brz-RJ

KU321639 - Brz-SP

KU707826 - Brz-BA

KU940228 - Brz-BA

KU527068 - Brz-RN

KU729217 - Brz-PA

KU729218 - Brz-PA

KU312315 - FrG

KU312312 - FrG

KU820897 - Col

KU646827 - Col

KU646828 - Col

Amino acid

Amino acid

11	31	35	40	44	59	76	80	124	153	164	178	186	194	198	214	224	225	250	267	272	273	285	308	
TAC	ACT	GTT	GGG	ACC	ACA	TCA	ATG	AGC	CTG	ATC	AAG	CCA	GGT	TTA	TAT	TTG	GTT	AAC	GTC	ACT	CAA	CTG	GAT	..T
...AG	...	C..G.	
..TAG	...	C..G.	
..TA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
...A	C..G.	
...	...	A..	..AT	C..G.	
...	..CAA	C..G.	
...A	C..G.A	...	
...A	C..CG.	
...A	...	T..	A..	..A	C..C.	.G.	
...A	C..TG.	
...AA	C..	..CG.	
...A	..TAG	C..	...	C..G.	
...C	..A	T..C	C..G.	
---C	..A	T..	C..G.	..GC	
---A	T..	C..G.	
	Thr	Val	Gly	Thr	Thr	Ser	Met	Ser	Leu	Ile	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Asn	Val	Thr	Gln	Leu	Asp	
		Ile			Ser	Thr	Ile												Ala	Ser				

Subjects in this report are in red font, including another patient in Rio de Janeiro with Zika diagnosed less than two months after transfusion episodes (Plasma 16Z62). Donor is Donor 16Z10; R1 is Acceptor1 16Z11; R2 is Acceptor2 16Z08.

References

- [1] Robert S. Lanciotti, Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, Alison J. Johnson, Stephanie M. Stanfield, and Mark R. Duffy. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 14, No. 8, August 2008.
- [2] Robert S. Lanciotti, Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Amanda J. Panella, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, and Grant L. Campbell. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 13, No. 5, May 2007.
- [3] Sandra Menting, Khoa T. D. Thai, Tran T. T. Nga, Hoang L. Phuong, Paul Klatser, Katja C. Wolthers, Tran Q. Binh, Peter J. de Vries, and Marcel Beld. Internally Controlled, Generic Real-Time PCR for Quantification and Multiplex Real-Time PCR with Serotype-Specific Probes for Serotyping of Dengue Virus Infections. *Advances in Virology*, Vol 2011, Article ID 514681.
- [4] Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb 17; [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5).
- [5] Go Woon Cha, Jung Eun Cho, Young Ran Ju, Young-Jin Hong, Myung Guk Han, Won-Ja Lee, Eui Yul Choi, Young Eui Jeong. Comparison of Four Serological Tests for Detecting Antibodies to Japanese Encephalitis Virus after Vaccination in Children. *Osong Public Health Res Perspect*. 2014 Oct;5(5):286-91. doi: 10.1016/j.phrp.2014.08.003. Epub 2014 Sep 6.

9.4 Anexo 3. Artigo - *Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models.*

Além da elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso, o aluno Fábio Luís Lima Monteiro contribuiu com a autoria do trabalho *Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models*, publicado no dia 29 de novembro de 2016, na revista *Viruses* do *Multidisciplinary Digital Publishing Institute* (MDPI).

O aluno realizou a técnica de imunofluorescência, utilizando o anticorpo monoclonal 4G2 para monitorar os níveis de infecção pelo ZIKV em células VERO, hBMEC (linhagem humana de células do endotélio microvascular cerebral) e NSCs (células tronco neurais), tratadas ou não com cloroquina.



Article

Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models

Rodrigo Delvecchio ^{1,†}, Luiza M. Higa ^{1,†}, Paula Pezzuto ^{1,†}, Ana Luiza Valadão ^{1,†}, Patrícia P. Garcez ^{2,3}, Fábio L. Monteiro ¹, Erick C. Loiola ³, André A. Dias ⁴, Fábio J. M. Silva ², Matthew T. Aliota ⁵, Elizabeth A. Caine ⁵, Jorge E. Osorio ⁵, Maria Bellio ⁴, David H. O'Connor ⁶, Stevens Rehen ^{2,3}, Renato Santana de Aguiar ¹, Andrea Savarino ⁷, Loraine Campanati ^{2,*} and Amilcar Tanuri ^{1,*}

¹ Department of Genetics, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; digodelvecchio@gmail.com (R.D.); luizahiga@gmail.com (L.M.H.); paulapezzuto81@gmail.com (P.P.); analuvaladao@gmail.com (A.L.V.); fabiolimonte@gmail.com (F.L.M.); santanarnt@gmail.com (R.S.d.A.)

² Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; ppgarcez@gmail.com (P.P.G.); fabiojms@icb.ufrj.br (F.J.M.S.); srehen@lance-ufrj.org (S.R.)

³ D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rio de Janeiro 22281-100, Brazil; erickloiola@lance-ufrj.org

⁴ Department of Immunology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; aadias2005@yahoo.com.br (A.A.D.); mariabelliofrj@gmail.com (M.B.)

⁵ Department of Pathobiological Sciences, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA; mtaliota@wisc.edu (M.T.A.); eacaine@wisc.edu (E.A.C.); jorge.osorio@wisc.edu (J.E.O.)

⁶ Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706, USA; dhoconno@wisc.edu

⁷ Istituto Superiore di Sanità, Department of Infectious Diseases, 299 Viale Regina Elena, 00161 Rome, Italy; ansavari@yahoo.com

* Correspondence: lcampanati@gmail.com (L.C.); atanuri@biologia.ufrj.br (A.T.); Tel.: +55-213-938-6384 (L.C.) † These authors contributed equally to this work.

Academic Editor: Michael R. Holbrook

Received: 16 October 2016; Accepted: 18 November 2016; Published: 29 November 2016

Abstract: Zika virus (ZIKV) infection in utero might lead to microcephaly and other congenital defects. Since no specific therapy is available thus far, there is an urgent need for the discovery of agents capable of inhibiting its viral replication and deleterious effects. Chloroquine is widely used as an antimalarial drug, anti-inflammatory agent, and it also shows antiviral activity against several viruses. Here we show that chloroquine exhibits antiviral activity against ZIKV in Vero cells, human brain microvascular endothelial cells, human neural stem cells, and mouse neurospheres. We demonstrate that chloroquine reduces the number of ZIKV-infected cells in vitro, and inhibits virus production and cell death promoted by ZIKV infection without cytotoxic effects.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus, transmitted by *Aedes* mosquitoes, that belongs to the *Flavivirus* genus, which also includes other pathogens such as West Nile virus (WNV), yellow fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV), and dengue virus (DENV). Zika virus was first isolated from a sentinel monkey in the Zika forest in Uganda in 1947 [1]. Since then, ZIKV has been isolated from humans and mosquitoes throughout Africa and Southeast Asian countries. Phylogenetic analysis of the nonstructural protein 5 encoding region has disclosed three ZIKV lineages: East African,

In addition, chloroquine treatment partially reverses morphological changes induced by ZIKV infection in mouse neurospheres.

Keywords: Zika virus; chloroquine; antiviral; microcephaly; neural stem cell

West African, and Asian [2]. Sequences from Uganda and Senegal belong to the East African cluster, while sequences from Nigeria and also some sequences from Senegal are clustered on the West African lineage [3]. Most of the viral sequences recovered from recent outbreaks, from 2007 until now, belong to the Asian lineage, such as strains isolated in American, South Asian, and Pacific countries. In utero exposure to Asian lineage ZIKV might lead to microcephaly and other developmental malformations including calcifications, arthrogryposis, ventriculomegaly, lissencephaly, cerebellar atrophy, and ocular abnormalities [4–8]. Although all ZIKV lineages can infect humans, these severe manifestations reported after in utero infection have only been associated with Asian lineages, including Brazilian isolates [6,9].

Asian ZIKV strains were detected in the brain and amniotic fluid of newborns and stillborns with microcephaly [4–6,8,9] and the African MR766 strain was shown to kill human neuroprogenitor cells in vitro as well as decrease the growth rate of brain organoids [10,11].

Symptoms of infections with the Asian ZIKV include low-grade fever, headache, rash, conjunctivitis, arthritis, and myalgia [4,12]. Mild symptoms such as headache and low-grade fever were reported by a human volunteer during infection with the African ZIKV strain [13]. However, in rare instances, infection with the Asian ZIKV is associated with cases of Guillain–Barré syndrome [14] and meningoencephalitis [15]. Currently, there is no vaccine or specific therapeutic approaches to prevent or treat ZIKV infections. With the alarming increase in the number of countries affected and the potential for viral spread through global travel and sexual transmission [16,17], there is an urgent need to find a treatment capable of lessening the effects of the disease and inhibiting further transmission.

Chloroquine, a 4-aminoquinoline, is a weak base that is rapidly imported into acidic vesicles, increasing their pH [18]. It is approved by the Food and Drug Administration (FDA) to treat malaria and has long been prophylactically prescribed to pregnant women at risk of exposure to *Plasmodium* parasites [19]. Chloroquine, through the inhibition of pH-dependent steps of viral replication, restricts human immunodeficiency virus (HIV) [20], influenza virus [21], DENV [22], JEV [23], and WNV infection [24]. Here we investigated the antiviral effects of chloroquine on both Asian (using a Brazilian isolate) and African ZIKV infections in different cell types.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

Vero cells (ATCC, Manassas, VA, USA) are derived from the kidney of African green monkey and were grown in DMEM High Glucose (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO). Human brain microvascular endothelial cells (hBMEC) were a kind gift from Dr. Julio Scharfstein (Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil), and hBMEC isolation was performed as previously described [25]. These cells were cultured in DMEM High Glucose supplemented with 20% FBS. The C6/36 cell line is derived from *Aedes albopictus*. C6/36 cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in Leibovitz L-15 medium (GIBCO) supplemented with 2.95 g/L tryptose phosphate broth (Sigma Aldrich, Boston, MA, USA), 2 mM glutamine (GIBCO), 0.075% sodium bicarbonate (GIBCO), 1X non-essential amino acids (GIBCO) and 5% FBS. Neural stem cells (NSCs) were derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). iPSCs were provided by the Biobank of iPSCs of the Brazilian Ministry of Health (CONEP B-027 # 25000.111598/2014-04). According to the supplier, fibroblasts were reprogrammed using the protocol developed by Paulsen et al. [26], and transduced with the CytoTune-iPS Sendai kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). iPSCs presented a normal karyotype and the expression of pluripotency markers. These cells were cultured with E8 culture media (GIBCO) on a Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) coated surface. iPSC colonies were manually passaged every 5–7 days until they reached 70%–80% confluence and were maintained at 37 °C in humidified air with 5% CO₂. To produce NSCs, human iPSCs were exposed to the

serum-free neural induction medium (GIBCO), containing Neurobasal medium (GIBCO) and the pluripotent stem cell neural induction supplement (GIBCO), according to the manufacturer's protocol [27]. Briefly, the medium was changed every other day until day 7, when initial NSCs are split and grown on neural expansion medium (Advanced DMEM/F12 and neurobasal medium (1:1) with neural induction supplement; GIBCO). NSCs were used after four passages in neural expansion media. Mouse central nervous system (CNS) cells were harvested from Swiss mouse embryos at embryo day 14 (E14) and grown for 72 h as free floating neurospheres in neurobasal culture media (GIBCO) supplemented with 1X B27 (GIBCO).

2.2. Compounds

Chloroquine diphosphate was kindly supplied by FarManguinhos (Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil). The lyophilized powder was diluted in double distilled water to 20 mM. The chloroquine solution was filtered through a 0.22 μ m membrane and stored at -80°C .

2.3. Viruses

ZIKV strain MR 766 (Uganda/Africa, accession no.: NC012532.1, kindly provided by Dr. Davis Ferreira, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) was isolated from a rhesus monkey and injected intracerebrally on Swiss mice for several passages [1] and ZIKV BR (Recife/Brazil, ZIKV PE/243, accession no: KX197192.1, kindly provided by Dr. Marli Tenório Cordeiro, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brazil) was isolated from a patient presenting classical symptoms of ZIKV infection [28]. These viruses were propagated in Vero and C6/36 cells, respectively. Briefly, the cells were infected with ZIKV at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 and incubated at 37°C . After 1 h, the inoculum was removed and replaced with DMEM high-glucose (Vero) and Leibovitz L-15 (C6/36) growth media supplemented with 2% FBS. After 4 to 6 days, the conditioned medium was harvested, centrifuged at $300\times g$, and sterile-filtered to remove cells and cellular debris. Virus stocks were stored at -80°C .

2.4. Plaque Assay

Virus titers were determined by plaque assay performed on Vero cells. Virus stocks or samples were serially diluted and adsorbed to confluent monolayers. After 1 h, the inoculum was removed and cells were overlaid with semisolid medium constituted of alpha-MEM (GIBCO) containing 1% carboxymethyl cellulose (Sigma Aldrich) and 1% FBS (GIBCO). Cells were further incubated for 5 days when cells were fixed in 4% formaldehyde. Cells were stained with 1% crystal violet in 20% ethanol for plaque visualization. Titers were expressed as plaque forming units (PFU) per milliliter.

2.5. Quantification of ZIKV-Infected Cells by Flow Cytometry

Vero cells, hBMEC, and NSC were infected with ZIKV MR 766 or ZIKV BR strain at an MOI of 2. After 1 h, the inoculum was removed and medium containing chloroquine (6.25 to 50 μM) was added to the cells. After 4 to 5 days, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich) in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature and washed with PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich) in PBS, washed with PBS, and blocked with PBS with 5% FBS. Cells were incubated with 4G2, a pan-flavivirus antibody raised against the ZIKV envelope E protein produced in 4G2-4-15 hybridoma (ATCC), diluted 1:5 in PBS with 5% FBS. Cells were labeled with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 antibody (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) diluted 1:1000 in PBS with 5% FBS, and were analyzed by flow cytometry in a BD Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) for ZIKV infection.

2.6. Immunofluorescence Assay

Vero, hBMEC, and NSC were seeded on black 96-well plates with clear bottoms and infected with ZIKV MR 766 or ZIKV BR strain at an MOI of 2 for 1 h. Neurospheres were seeded on coverslips and infected with ZIKV MR766 with 2.5×10^5 PFU. After infection, the viral inoculum was removed and cells were incubated with medium containing chloroquine (1.56 to 50 μM) for 4 to 5 days, depending on cell type. Cells and neurospheres were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. The fixative was

removed and the samples were washed three times with PBS. Blocking of unspecific binding of the antibody and permeabilization were performed with PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich) and 0.1% Triton X-100 for 40 min at room temperature. Incubation with anti-Map2 antibody was performed following the manufacturer's instructions (ABCAM, Cambridge, Cambridgeshire, UK, #32454; 1:1000) and the 4G2 antibody was diluted 1:4 in PBS with 3% BSA and incubated with cells for 1 h. After washing three times with PBS, cells were incubated with secondary antibodies coupled to Alexa fluorochromes (Thermo Fisher Scientific) for 40 min and washed five times. Coverslips with neurospheres were mounted with Prolong Gold mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Samples were imaged using either Leica SP5 or Leica SPE (Leica Biosystems, Wetzlar, Hesse, DE) confocal microscopes and a Nikon TE300 (Tokyo, Japan) inverted microscope coupled to a Leica DFC310FX camera (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany).

2.7. Virus Infection Inhibition Through Cell Viability Assay

Vero, hBMEC, and NSC were exposed to ZIKV MR 766 at an MOI of 2. After 1 h, inoculum was removed and chloroquine-containing medium (6.25 to 50 μ M) was added to the cells. Five days post-infection, 20 μ L of CellTiter Blue reagent (Promega, Madison, WI, USA) was added in each well, incubated for 12–16 h, and fluorescence was measured (560/590 nm), except for NSCp14 cells when CellTiter Blue was added at three days post-infection. Mean fluorescence intensity (MFI) and standard deviation were displayed. In order to calculate the half maximum effective concentration (EC₅₀) that protects cells from death caused by ZIKV infection, MFI values from ZIKV MR766 control were subtracted from every condition and then these values were normalized over the mock control. These data were plotted and Hill 4 parameter sigmoidal regression was performed on Sigma Plot v.12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

2.8. Drug Cytotoxicity Assay

Vero cells, hBMEC, and NSC were incubated with medium containing chloroquine (1.56 to 200 μ M) for 3 days (NSC) or 5 days (Vero and hBMEC). CellTiter Blue reagent (Promega) was added in each well, incubated for 12–16 h, and fluorescence was measured (560/590 nm). In order to calculate the 50% cytotoxicity concentration (CC₅₀), MFI values were normalized over the untreated control. These data were plotted and Hill 4 parameter sigmoidal regression was performed on Sigma Plot v.12.0 (Systat Software Inc.).

2.9. Time-of-Addition Assay

Vero cells were inoculated with ZIKV MR 766 at an MOI of 10 for 1 h at 4 °C. Cells were washed three times with cold PBS to remove unbound virus and treated with 50 μ M chloroquine that was added at different time points: 0, 0.5, 3, 12, and 24 h post-infection. Conditioned media were collected at 30 h post-infection to analyze the production of virus particles through viral RNA content or the amount of infectious virus particles. Viral RNA was extracted and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed. The titer of infectious virus particles was determined by plaque assay.

2.10. ZIKV Inhibition Assessed by Virus Production

Vero cells were infected with ZIKV MR766 or ZIKV BR strain at an MOI of 2 for 1 h at 4 °C. Virus input was washed three times with cold PBS and cells were treated with chloroquine (6.25 to 50 μ M) for 48 h, and then the supernatant was collected and the RNA was extracted and analyzed by relative quantification by RT-qPCR. The supernatant was also evaluated by plaque assay to quantitate the infectious virus particles.

2.11. Viral RNA Extraction and RT-qPCR

Viral RNA was extracted from 200 μ L supernatant of infected cells using QIAmp MiniElute Virus Spin (QIAgen, Hilden, Düsseldorf, DE), following the manufacturer's recommendations.

ZIKV detection was performed using One Step Taqman RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific) on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with primers and the probe described elsewhere [2]. Threshold cycle (CT) was determined and Δ CT (CT chloroquine treated – CT untreated) was calculated. The fold reduction of virus particles' release, including defective viral particles, were calculated by $2^{\Delta\text{CT}}$.

2.12. Statistical Analysis

Mean and standard deviation (SD) were calculated for each assay. One way analysis of variance (ANOVA) was conducted using the non-parametric test (Kruskal–Wallis) followed by Dunn's multiple comparisons test. A p -value of <0.05 was considered significant. All analyses were performed on GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The sample size is provided in the respective figure legends.

3. Results

3.1. Chloroquine Inhibits ZIKV Infection in Vero Cells

We characterized the antiviral properties of chloroquine in Vero cells, a model widely used to study viral infections. Vero cells were infected with ZIKV MR766 at an MOI of 2 (i.e., 2 PFU/cell) and were then treated for 5 days with chloroquine in concentrations ranging from 6.25 to 50 μ M. Viral infectivity was assessed using the 4G2 antibody, which detects flavivirus envelope E protein. We observed that chloroquine treatment decreased the number of ZIKV-infected cells in a dose-dependent manner. Flow cytometry analysis showed a reduction of 35% and 65% in ZIKV-infected cells when cultures were treated with 25 μ M and 50 μ M chloroquine, respectively, compared to untreated infected cells (Figure 1A). Immunofluorescence staining corroborated these results (Figure 1B) and additionally, chloroquine decreased the production of infectious (Figure 1C) and total (Figure 1D) virus particles, including defective viral particles, by ZIKV-infected cells. To confirm that viral inhibition is independent of chloroquine cytotoxicity, the viability of uninfected cells treated with chloroquine (1.56 to 200 μ M) for 5 days was analyzed. Chloroquine did not impact cell viability at concentrations of 50 μ M or lower (Figure 1E). We further analyzed whether chloroquine treatment could protect Vero cells from ZIKV infection as assessed by cell viability. Chloroquine, ranging from 12.5 to 50 μ M, increased cell viability from 55% up to 100% (Figure 1F).

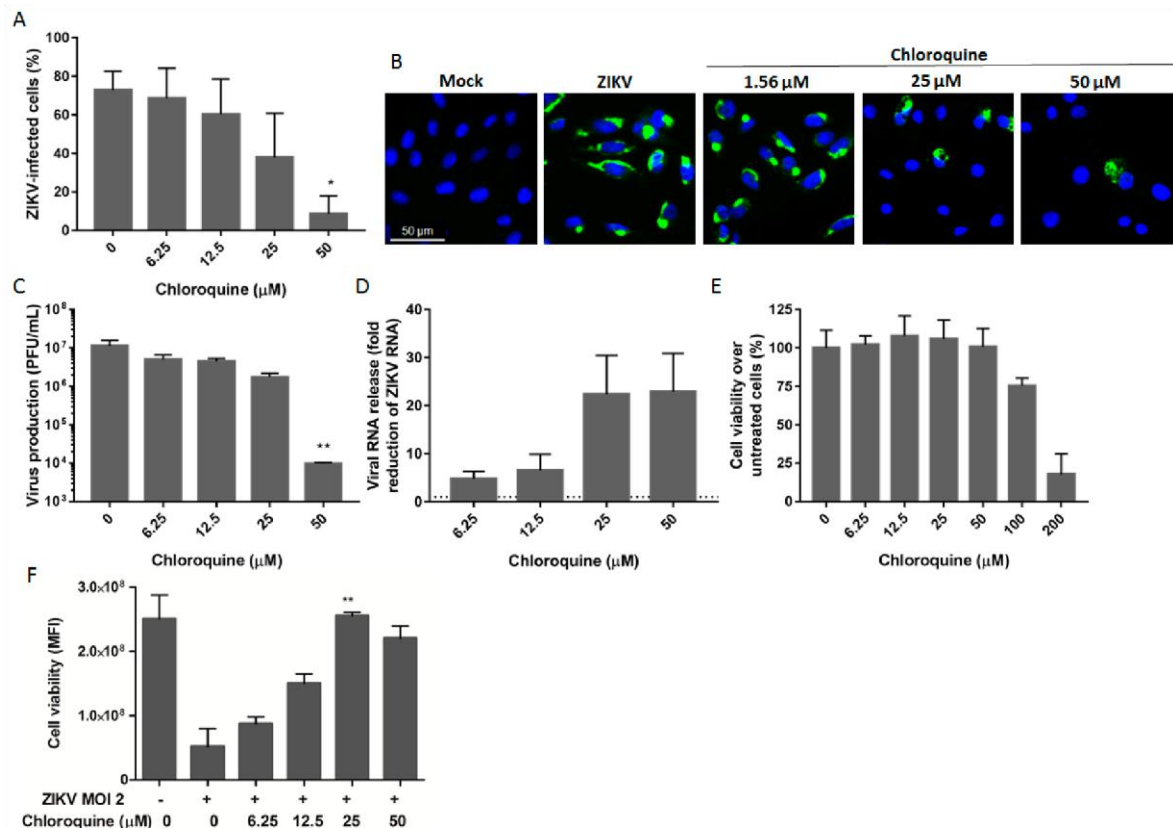


Figure 1. Inhibition of Zika virus (ZIKV) infection by chloroquine in Vero cells. (A) Vero cells were infected with ZIKV MR766 at a multiplicity of infection (MOI) of 2, treated with chloroquine for 5 days, and were then stained for the viral envelope protein and analyzed by flow cytometry; (B) Vero cells were infected, treated for 2 days, and ZIKV

infection was evaluated by immunofluorescence staining with 4G2 antibody (green) and DAPI (blue); Infectious (C) or total (D) virus particles were quantified on the supernatant 48 h post-infection. Titers are expressed as plaque forming units (PFU) per milliliter. The dashed line represents no reduction in RNA levels; (E) Cell viability of uninfected cells treated with increasing concentrations of chloroquine was evaluated by fluorescence measurement at 560/590 nm after viability dye incubation; (F) Protection against ZIKV infection was evaluated through cell viability in ZIKV-infected Vero cells treated with chloroquine for 5 days. Data are represented as mean fluorescent intensity (MFI) \pm standard deviation (SD) from two to four independent experiments. Statistical analysis was performed with the Kruskal–Wallis test and multiple comparisons with infected and untreated control corrected by Dunn's test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

3.2. Chloroquine Inhibits Infection of Asian ZIKV Strains

Microcephaly cases and neurological disorders have only been associated with infection with strains of ZIKV from the Asian lineage, detected in French Polynesia and in the Americas [6,9,29]. To determine the inhibition spectrum of chloroquine against ZIKV infection, Vero cells were infected with the Brazilian isolate of the Asian lineage (ZIKV BR). Chloroquine decreases the percentage of cells infected with the Brazilian isolate from 70% to 30% and 5% at 12.5 and 25 μ M, respectively (Figure 2A,C). Moreover, viral RNA levels in the supernatant of Vero cells were quantified as a direct measurement of ZIKV infection. Treatment with 25 μ M chloroquine led to a 16-fold reduction in the level of viral RNA detected in the supernatant (Figure 2B).

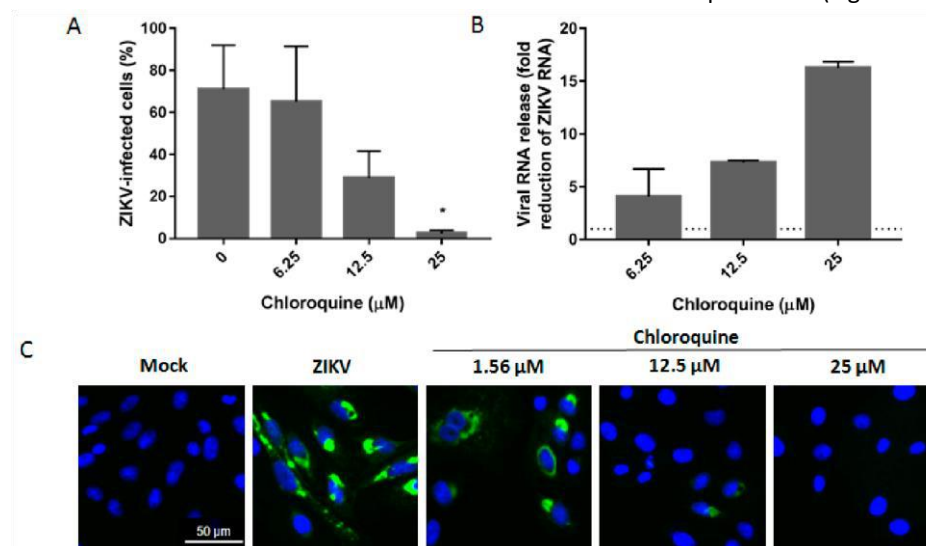


Figure 2. Chloroquine inhibits infection by Asian lineage. (A) Vero cells were infected with Brazilian ZIKV strain at an MOI of 2, treated with chloroquine at the indicated concentrations for 5 days, and the frequency of infected cells was evaluated by flow cytometry; (B) Vero cells were infected with Brazilian strain at an MOI of 2 and exposed to chloroquine for 48 h. The supernatant was collected and viral RNA was relatively quantified over the untreated infected control (B) or infectivity was analyzed by immunofluorescence with 4G2 antibody (C). The dashed line represents fold reduction on virus production of 1. Data are represented as mean \pm SD from two independent experiments. Statistical significance was assessed by Kruskal–Wallis test and multiple comparisons with infected and untreated control corrected by Dunn's test (* $p < 0.05$).

3.3. Chloroquine Inhibits Early Stages of ZIKV Infection

Inhibition of viral infection mediated by chloroquine can occur in both the early and later stages of the viral replication cycle [30,31]. To evaluate which step of the viral cycle was susceptible to inhibition, chloroquine was added to Vero cells at different time points post-infection with ZIKV MR766. The supernatant was collected 30 h post-infection and virus production was evaluated by relative quantification of viral RNA over the untreated control by RT-qPCR. Virus titers were also determined by plaque assay in Vero cells. Incubation of Vero cells with chloroquine at 0 h post-infection had a greater impact on the production of ZIKV particles,

decreasing viral RNA 64-fold over the controls (Figure 3A). The addition of chloroquine from 30 min to 12 h post-infection was able to reduce virus release 9–20 fold over untreated, infected-cells. However, chloroquine added at 24 h post-infection had only a minor effect on viral production (Figure 3A). These results were confirmed by quantification of ZIKV infectious particles released after chloroquine treatment (Figure 3B). These data confirm that chloroquine interferes with the early stages of the ZIKV replication cycle.

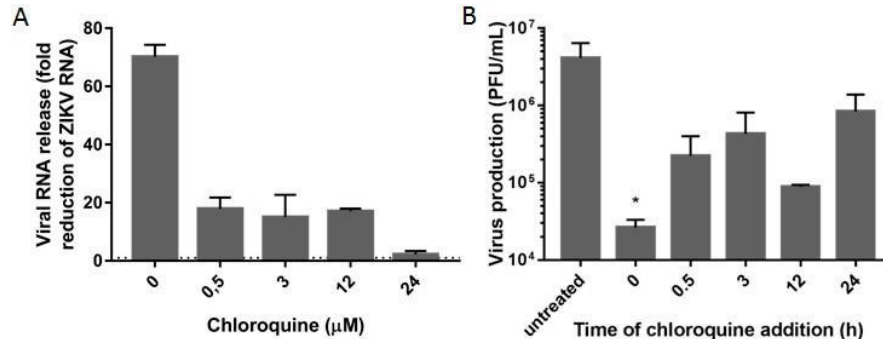


Figure 3. Early stages of infection are inhibited by chloroquine. Vero cells were infected with ZIKV

MR766 at an MOI of 10 and 50 μM chloroquine was added at different times post-infection. At 30 h post-infection, the supernatant was collected and viral RNA (A) or infectious particles (B) were quantified. Viral RNA reduction is represented in fold change ($2^{\Delta\Delta Ct}$). The dashed line represents no reduction in RNA levels. Infectious particles are depicted as PFU/mL. Data are represented as mean \pm SD from two independent experiments. Statistical analysis was performed with Kruskal–Wallis test and multiple comparisons with infected and untreated control corrected by Dunn's test (* $p < 0.05$).

3.4. Chloroquine Reduces ZIKV Infection in hBMEC, an In Vitro Model of the Blood–Brain Barrier

Considering that ZIKV infects hBMECs [32], we investigated whether chloroquine could inhibit viral infection of these cells. Chloroquine reduced 45% and 50% of the number of ZIKV MR766-infected hBMECs at 25 and 50 μM, respectively (Figure 4A,D). These concentrations are non-cytotoxic (Figure 4B), and protected approximately 80% of hBMECs from ZIKV infection as demonstrated by the increase in cell viability (Figure 4C).

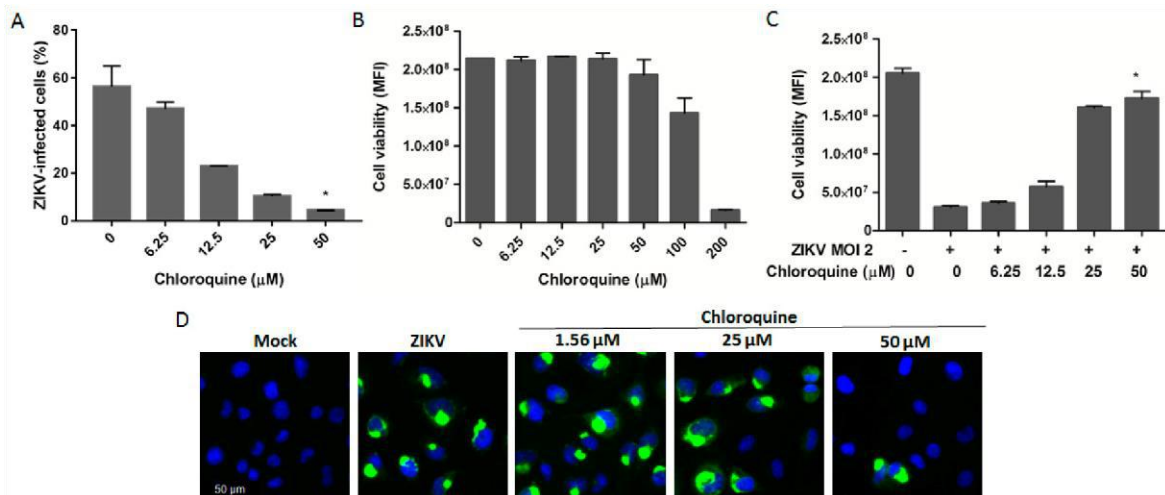


Figure 4. Chloroquine reduces the number of ZIKV-infected human brain microvascular endothelial cells

(hBMECs). (A) hBMECs were infected with ZIKV MR 766 at an MOI of 2 followed by chloroquine treatment for 5 days. Cells were stained with the 4G2 antibody and analyzed by flow cytometry; (B) Uninfected hBMECs were incubated with chloroquine for 5 days and cell viability was analyzed;

(C) Protection against ZIKV infection was measured through cell viability in chloroquine-treated ZIKV-infected cells;

(D) Immunofluorescence with 4G2 antibody (green) and DAPI (blue) of ZIKV-infected cells treated with chloroquine for 5 days. Data are represented as mean \pm SD from two independent experiments. Statistical significance was

assessed by Kruskal–Wallis test and multiple comparisons with infected and untreated control corrected by Dunn's test (* $p < 0.05$).

3.5. Chloroquine Inhibits ZIKV Infection in Human Neural Progenitor Cells

Neural stem cells are key cells in the process of corticogenesis, giving rise to the three main cell types of the central nervous system: neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Depletion of the NSC pool is one of the main mechanisms responsible for primary microcephaly [33]. To evaluate if chloroquine could protect these cells from ZIKV MR766 infection, NSCs were exposed to up to 50 μM chloroquine for 4 days. Chloroquine treatment decreased the number of NSCs infected with ZIKV MR766 by 57%, and, through cell viability assessment protected 70% of NSCs from ZIKV infection, without cytotoxicity effects (Figure 5A–D). Similar results were observed when NSCs were infected with the Brazilian strain (Figure 5E).

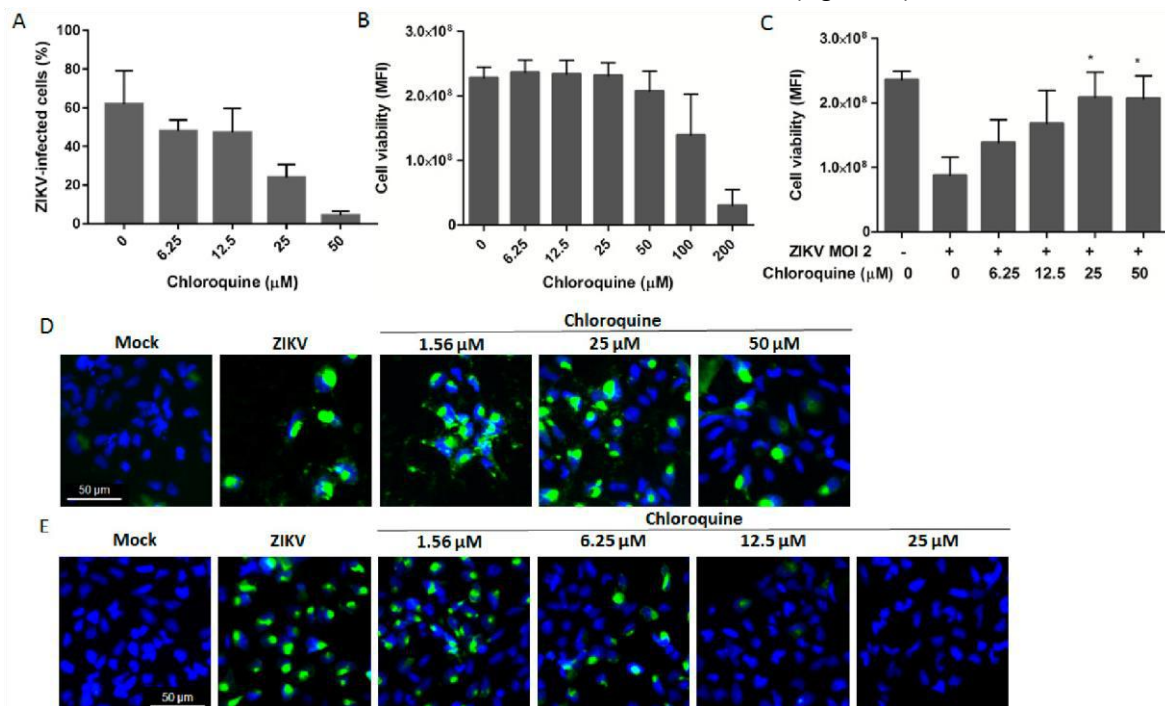


Figure 5. Chloroquine inhibits ZIKV infection in human neural stem cells (hNSCs). hNSCs were infected with ZIKV MR766 at an MOI of 2 and incubated with increasing concentrations of chloroquine for 4 days. (A) The frequency of ZIKV-infected cells was analyzed by 4G2 staining and flow cytometry; (B) Chloroquine cytotoxicity was assessed by the viability of uninfected hNSCs treated with chloroquine; (C) Chloroquine treatment protection from ZIKV infection was evaluated by cell viability measurement at 4 days post-infection. Immunofluorescence NSCs infected with ZIKV MR766 (D) or ZIKV BR (E) at an MOI of 2 and treated with chloroquine for 4 days with 4G2 antibody (green) and DAPI (blue). Data are represented as mean \pm SD from two to three independent experiments. Statistical analysis was performed with Kruskal–Wallis test and multiple comparisons with infected and untreated control corrected by Dunn's test (* $p < 0.05$).

3.6. Chloroquine Inhibits ZIKV Infection in Mouse Neurospheres

Neuroprogenitor-enriched neurospheres, when subjected to differentiation culture conditions, can generate neurons. Our group recently demonstrated that ZIKV infection affected neurosphere size, neurite extension, and neuronal differentiation [34]. As we previously observed, neurospheres infected with ZIKV strain MR766 showed convoluted and misshapen neurites. Neurite extension was evaluated in chloroquine treated cultures by microtubule-associated protein 2 (Map2) staining and phase contrast microscopy and although many neurospheres were severely impacted by the infection, many others displayed the same general characteristics of mock-infected spheres indicating that chloroquine treatment rescued the neurite extension

phenotype (Figure 6A–C). Furthermore, ZIKV infection decreased when neurospheres were treated with 12.5 μ M chloroquine, as evaluated by 4G2 staining (Figure 6D–F).

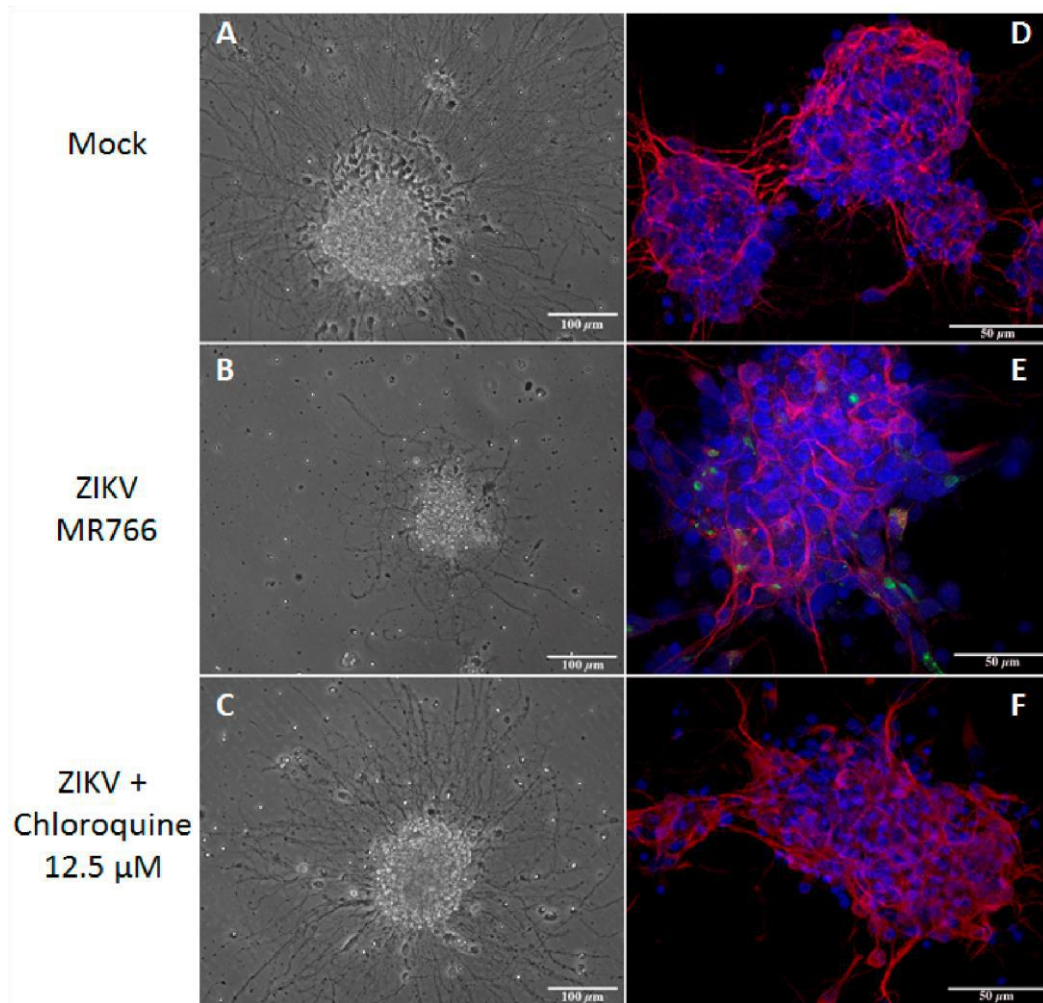


Figure 6. Chloroquine inhibits ZIKV infection in mouse neurospheres. Mouse neurospheres were infected with ZIKV MR766 (2.5×10^5 PFU) and were treated with chloroquine for 3 days. Neurospheres were analyzed by phase contrast microscopy (A–C), and triple stained for envelope viral protein (green), microtubule-associated protein 2 (Map-2, red), a neuron-specific protein, and DAPI (blue) (D–F).

4. Discussion

Chloroquine is known to be a non-specific antiviral agent, but its effect on the Zika virus replication has not been evaluated yet. This is the first report of inhibitory effects of chloroquine on ZIKV replication, which, given the ongoing epidemics, may become interesting both for the scientific knowledge of the virus and for the clinical perspective.

Although Zika virus was first identified in Uganda in 1947, from January 2007 to April 2016, ZIKV transmission has been reported in 64 countries and territories [35]. The Zika virus disease is in general mild, but the recent positive correlation between infection, congenital malformations, and neurological damage in adults has intensified the need for therapeutic approaches. Prophylactic treatments for women intending to get pregnant in epidemic areas and travelers going to affected countries would represent relevant tools to reduce ZIKV transmission and avoid the spread of the disease by travelers. Moreover, a drug that blocks placental transfer of the virus could decrease the chance of vertical transmission in viremic pregnant women as was shown for HIV-infected pregnant women treated with antiretroviral therapy [36].

Here we demonstrated that chloroquine decreases the number of ZIKV-infected cells and protected cells from ZIKV infection as measured by cell viability at non-cytotoxic concentrations (Figures 1, 4 and 5). The EC₅₀ or

concentration of chloroquine that protected 50% of the cells from ZIKV infection assessed by cell viability, was 9.82–14.2 μM depending on the cell model and the CC50 ranged from 94.95 to 134.54 μM (Table 1). The values of EC50 obtained for ZIKV MR766 are lower than those obtained for DENV inhibition ($\sim 25 \mu\text{M}$) and HIV inhibition (100 μM) [20,22]. Furthermore, we observed similar ZIKV inhibitory effects of chloroquine when tested on different ZIKV lineage infections (Figures 2 and 5), supporting the idea that chloroquine could help to manage recent infections caused by Asian ZIKV lineage.

Table 1. Pharmacological parameters of chloroquine in each cell type against ZIKV MR766.

Cell Type	CC50	EC50	TI
Vero	134.54 \pm 16.76 μM	9.82 \pm 2.79 μM	13.70
hBMEC	116.61 \pm 9.70 μM	14.20 \pm 0.18 μM	8.21
hNSC	94.95 \pm 9.38 μM	12.36 \pm 2.76 μM	7.68

CC50: 50% cytotoxicity concentration; EC50: half maximal effective concentration; TI: therapeutic index (CC50/EC50). Data are represented as mean \pm SD.

Although chloroquine has shown antiviral activity against a large spectrum of viruses in vitro, few clinical studies have been performed to evaluate chloroquine effects on patients with viral infections. Two clinical trial studies of chloroquine have been conducted to assess chloroquine treatment in patients infected with DENV [37,38]. One of the trials evaluated the benefits of chloroquine treatment for 3 days in patients infected with DENV and showed no reduction in the duration or intensity of DENV viremia or nonstructural 1 protein (NS1) antigenemia clearance [37]. However, a trend towards a reduction in the number of dengue hemorrhagic fever cases was noticed in the chloroquine-treated group [37]. A more recent clinical trial of chloroquine administration to DENV-infected patients, also for 3 days, showed that 60% of the patients in the chloroquine-treated group reported feeling less pain and showed improvement in the performance of daily chores during treatment [38]. Moreover, the symptoms returned after medication withdrawal. However, chloroquine treatment did not reduce the duration and intensity of the fever or duration of the disease [38]. The antiviral effect of chloroquine may be insufficient to produce a decrease in viral load or improvement of the disease progression when chloroquine/hydroxychloroquine is used in monotherapy. However, chloroquine may produce a significant antitflaviviral effect when used in combination therapies, as recently shown in a clinical trial of hydroxychloroquine plus ribavirin and interferon alpha in individuals infected with hepatitis C virus (HCV) [39]. In regard to the potential antiviral therapeutic combinations for Zika, a freshly published screening of drugs already approved for other clinical indications has resulted in the identification of more than 20 candidate drugs [40]. Of note, one of these is mefloquine, a compound related to chloroquine. In terms of safety for pregnant women, however, mefloquine is included in the B category, i.e., a drug for which the animal reproduction studies have failed to demonstrate a risk to the fetus and there are no adequate and well-controlled studies in pregnant women. Be that as it may, the aforementioned study corroborates our results using chloroquine, and provides new anti-ZIKV drugs that could be tested in combination with chloroquine.

Differing from mefloquine administration, the use of chloroquine during pregnancy was thoroughly evaluated and when prophylactic doses of chloroquine were administered for malaria (400 mg/week), no increment in birth defects was observed [41]. Higher concentrations of chloroquine (250 mg to 500 mg/day) were administered to pregnant women with severe diseases, such as lupus or rheumatoid arthritis. In these studies, few cases of abortion and fetal toxicity were observed. However, fetal toxicity or death could not be discarded as direct consequences of the disease itself. In addition, all term deliveries resulted in healthy newborns [19,42].

Chloroquine has been successfully tested in animal models. Twice daily administration of chloroquine (90 mg/kg) has been shown to increase the Balb/c mice survival rate to 80%–90% after infection with Ebola virus (EBOV) [43]. In a C57BL/6 mice model for coronavirus infection, chloroquine (50 mg/kg) protected 100% of 5-day-old suckling mice infected with human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) when administered to pregnant

mice 1 day prepartum [44]. A survival rate of 70% was observed in Balb/c mice infected with avian influenza H5N1 virus treated with chloroquine at 50 mg/kg/day [45]. These results suggest that chloroquine has the potential to inhibit ZIKV in in vivo mouse studies.

Chloroquine is widely distributed to body tissues as well as its analogue hydroxychloroquine. The concentration of hydroxychloroquine in the brain is 4–30 times higher than in the plasma [46]. The concentration of chloroquine in the plasma reached 10 μ M when a daily intake of 500 mg was prescribed to arthritis patients [47]. Chloroquine is able to cross the placental barrier and is supposed to reach similar concentrations in both maternal and fetal plasma [48]. Concentrations of chloroquine, similar to the EC50 values calculated here (Table 1), are achieved in the plasma in current chloroquine administration protocols and might reach the brain.

Different mechanisms for the chloroquine inhibition of viral infection have been described [49–51]. We observed a strong reduction in the release of ZIKV particles when the drug was added at 0 h post-infection (Figure 3), suggesting a higher impact on early stages of infection, possibly during fusion of the envelope protein to the endosome membrane. Chloroquine inhibits acidification of the endosome, consequently inhibiting the low pH-induced conformational changes required for the fusion of the envelope protein of flaviviruses with the endosomal membrane [52]. Chloroquine was also effective in decreasing virus release, although less pronouncedly and not statistically significant, when added after the early stages of virus infection (from 0.5 to 24 h post-infection), suggesting that later stages of the ZIKV replication cycle might also be affected (Figure 3).

ZIKV was detected in the cerebrospinal fluid of ZIKV-infected adult patients that manifested meningoencephalitis, indicating that ZIKV invades the central nervous system through yet unknown mechanisms. Transcytosis through the endothelial cells of the blood brain barrier is a known mechanism of viral access to the central nervous system [53,54]. Here we demonstrated, by different methodologies, that chloroquine protects hBMEC, an immortalized cell line widely used as in vitro model of the blood–brain barrier [25], from ZIKV infection (Figure 4).

Recent studies showed that neural stem cells are highly permissive for ZIKV infection and one of the mechanisms proposed for the cause of microcephaly would be the depletion of the stem cell pool induced by ZIKV [10,11,55]. Our data showed that chloroquine inhibits the infection of human neural stem cells (Figure 5). Using the mouse neurospheres model to study neural stem cell differentiation into neurons, another process that might be disturbed in microcephaly, we observed that chloroquine inhibited the infection of neuronal progenitors and partially protected the ability of these cells to extend neurites (Figure 6). The protective effect of chloroquine on stem cells and committed progenitors is potentially a groundbreaking feature of this compound, as it would be prescribed to women at childbearing age that are traveling to affected countries and women planning pregnancy in endemic areas. This would decrease the chances of infection and thus fetal damage, especially to the developing brain.

Our results suggest that the chloroquine concentrations inhibiting ZIKV replication in vitro may overlap the highest drug concentrations detected in humans [56]. We therefore suggest that the therapeutic potential of chloroquine for Zika be subjected to further study.

Acknowledgments: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil. The authors acknowledge Manoel Itamar for providing technical support.

Author Contributions: R.D., L.M.H., P.P., A.L.V. designed and performed experiments, prepared figures and/or tables, analyzed the data and wrote the manuscript; P.P.G. designed and performed experiments, analyzed the data and wrote the manuscript; F.L.M. designed and performed experiments, prepared figures and/or tables and analyzed the data; E.C.L., A.A.D., F.J.M.S., M.T.A., E.A.C. performed experiments; M.B., D.H.O., S.R., R.S.d.A., J.E.O., A.S. designed and/or performed experiments, contributed with reagents/materials/analysis tools and wrote the manuscript; L.C. and A.T. designed and performed experiments, prepared figures and/or tables, analyzed the data, contributed with reagents/materials/analysis tools, and wrote the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddow, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [[CrossRef](#)]
- 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.* **2008**, *14*, 1232–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Faye, O.; Freire, C.C.M.; Iamarino, A.; Faye, O.; de Oliveira, J.V.C.; Diallo, M.; Zanutto, P.M.A.; Sall, A.A. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brasil, P.; Pereira, J.P., Jr.; Raja Gabaglia, C.; Damasceno, L.; Wakimoto, M.; Ribeiro Nogueira, R.M.; Carvalho de Sequeira, P.; Machado Siqueira, A.; Abreu de Carvalho, L.M.; Cotrim da Cunha, D.; et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro—Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Martines, R.B.; Bhatnagar, J.; Keating, M.K.; Silva-Flannery, L.; Muehlenbachs, A.; Gary, J.; Goldsmith, C.; Hale, G.; Ritter, J.; Rollin, D.; et al. Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses —Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 1–2. [[CrossRef](#)]
- Mrakar, J.; Korva, M.; Tul, N.; Popović, M.; Poljšak-Prijatelj, M.; Mraz, J.; Kolenc, M.; Resman Rus, K.; Vesnaver Vipotnik, T.; Fabjan Vodusek, V.; et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 951–958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Oliveira Melo, A.S.; Malinge, G.; Ximenes, R.; Szejnfeld, P.O.; Alves Sampaio, S.; Bispo De Filippis, A.M. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2016**, *47*, 6–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Melo, A.S.; Aguiar, R.S.; Amorim, M.M.; Arruda, M.B.; Melo, F.O.; Ribeiro, S.T.; Batista, A.G.; Ferreira, T.; Dos Santos, M.P.; Sampaio, V.V.; et al. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol.* **2016**, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Calvet, G.; Aguiar, R.S.; Melo, A.S.O.; Sampaio, S.A.; de Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E.S.M.; de Sequeira, P.C.; de Mendonça, M.C.L.; de Oliveira, L.; et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 653–660. [[CrossRef](#)]
- Garcez, P.P.; Loiola, E.C.; Madeiro da Costa, R.; Higa, L.M.; Trindade, P.; Delvecchio, R.; Nascimento, J.M.; Brindeiro, R.; Tanuri, A.; Rehen, S.K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* **2016**, *352*, 816–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tang, H.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Jin, P. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell* **2016**, 1–4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bearcroft, W.G. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1956**, *50*, 442–448. [[CrossRef](#)]
- Cao-Lormeau, V.-M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet (Lond. Engl.)* **2016**, *387*, 1531–1539. [[CrossRef](#)]
- Carteaux, G.; Maquart, M.; Bedet, A.; Contou, D.; Brugières, P.; Fourati, S.; Cleret de Langavant, L.; de Broucker, T.; Brun-Buisson, C.; Leparç-Goffart, I.; et al. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1595–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- D’Ortenzio, E.; Matheron, S.; de Lamballerie, X.; Hubert, B.; Piorkowski, G.; Maquart, M.; Descamps, D.; Damond, F.; Yazdanpanah, Y.; Leparç-Goffart, I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2195–2198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deckard, D.T.; Chung, W.M.; Brooks, J.T.; Smith, J.C.; Woldai, S.; Hennessey, M.; Kwit, N.; Mead, P. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - Texas, January 2016. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 372–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Browning, D. Pharmacology of Chloroquine and Hydroxychloroquine. In *Hydroxychloroquine and Chloroquine Retinopathy*; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 35–63.
19. Levy, M.; Buskila, D.; Gladman, D.; Urowitz, M.; Koren, G. Pregnancy Outcome Following First Trimester Exposure to Chloroquine. *Am. J. Perinatol.* **1991**, *8*, 174–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Tsai, W.P.; Nara, P.L.; Kung, H.F.; Oroszlan, S. Inhibition of human immunodeficiency virus infectivity by chloroquine. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1990**, *6*, 481–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Ooi, E.E.; Chew, J.S.W.; Loh, J.P.; Chua, R.C.S. In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. *Virology*. **2006**, *3*, 39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Farias, K.J.S.; Machado, P.R.L.; da Fonseca, B.A.L. Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in Vero cells but not in C6/36 cells. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 282734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhu, Y.; Xu, Q.; Wu, D.; Ren, H.; Zhao, P.; Lao, W.; Wang, Y.; Tao, Q.; Qian, X.; Wei, Y.-H.; et al. Japanese encephalitis virus enters rat neuroblastoma cells via a pH-dependent, dynamin and caveola-mediated endocytosis pathway. *J. Virol.* **2012**, *86*, 13407–13422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Boonyasuppayakorn, S.; Reichert, E.D.; Manzano, M.; Nagarajan, K.; Padmanabhan, R. Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity. *Antivir. Res.* **2014**, *106*, 125–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Stins, M.F.; Badger, J.; Sik Kim, K. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* **2001**, *30*, 19–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Paulsen, B.d.S.; Maciel, R.d.M.; Galina, A.; da Silveira, M.S.; Souza, C.d.S.; Drummond, H.; Pozzatto, E.N.; Junior, H.S.; Chicaybam, L.; Massuda, R.; et al. Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Schizophrenic Patient. *Cell Transplant.* **2012**, *21*, 1547–1559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Yan, Y.; Shin, S.; Jha, B.S.; Liu, Q.; Sheng, J.; Li, F.; Zhan, M.; Davis, J.; Bharti, K.; Zeng, X.; et al. Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 862–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Donald, C.L.; Brennan, B.; Cumberworth, S.L.; Rezeli, V.V.; Clark, J.J.; Cordeiro, M.T.; Freitas de Oliveira França, R.; Pena, L.J.; Wilkie, G.S.; Da Silva Filipe, A.; et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005048. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Cao-Lormeau, V.-M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.-L.; Mallet, H.-P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1085–1086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Diaz-Griffero, F.; Hoschander, S.A.; Brojatsch, J. Endocytosis is a critical step in entry of subgroup B avian leukosis viruses. *J. Virol.* **2002**, *76*, 12866–12876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Harley, C.A.; Dasgupta, A.; Wilson, D.W. Characterization of herpes simplex virus-containing organelles by subcellular fractionation: role for organelle acidification in assembly of infectious particles. *J. Virol.* **2001**, *75*, 1236–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bayer, A.; Lennemann, N.J.; Ouyang, Y.; Bramley, J.C.; Morosky, S.; Marques, E.T.D.A.; Cherry, S.; Sadovsky, Y.; Coyne, C.B. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 705–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gilmore, E.C.; Walsh, C.A. Genetic causes of microcephaly and lessons for neuronal development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2013**, *2*, 461–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Campanati, L.; Higa, L.M.; Delvecchio, R.; Pezzuto, P.; De Filippis, A.M.B.; Aguiar, R.S.; Tanuri, A. The Impact of African and Brazilian ZIKV isolates on neuroprogenitors. *BioRxiv* **2016**, 1–25.
35. WHO. *Zika Virus Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome*; WHO: Geneva, Switzerland, 2016.
36. Connor, E.M.; Sperling, R.S.; Gelber, R.; Kiselev, P.; Scott, G.; O’Sullivan, M.J.; VanDyke, R.; Bey, M.; Shearer, W.; Jacobson, R.L.; et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1173–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tricou, V.; Minh, N.N.; Van, T.P.; Lee, S.J.; Farrar, J.; Wills, B.; Tran, H.T.; Simmons, C.P. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in vietnamese adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Borges, M.C.; Castro, L.A.; da Fonseca, B.A.L. Chloroquine use improves dengue-related symptoms. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2013**, *108*, 596–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Helal, G.K.; Gad, M.A.; Abd-Ellah, M.F.; Eid, M.S. Hydroxychloroquine augments early virological response to pegylated interferon plus ribavirin in genotype-4 chronic hepatitis C patients. *J. Med. Virol.* **2016**, *88*, 2170–2178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Barrows, N.J.; Campos, R.K.; Powell, S.T.; Prasanth, K.R.; Schott-Lerner, G.; Soto-Acosta, R.; Galarza-Muñoz, G.; McGrath, E.L.; Urrabaz-Garza, R.; Gao, J.; et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 259–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wolfe, M.S.; Cordero, J.F. Safety of chloroquine in chemosuppression of malaria during pregnancy. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* **1985**, *290*, 1466–1467. [[CrossRef](#)]
42. Parke, A.L. Antimalarial drugs, systemic lupus erythematosus and pregnancy. *J. Rheumatol.* **1988**, *15*, 607–610. [[PubMed](#)]
43. Madrid, P.B.; Chopra, S.; Manger, I.D.; Gilfillan, L.; Keepers, T.R.; Shurtleff, A.C.; Green, C.E.; Iyer, L.V.; Dilks, H.H.; Davey, R.A.; et al. A Systematic Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Biological Threat Agents. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Keyaerts, E.; Li, S.; Vijgen, L.; Rysman, E.; Verbeeck, J.; Van Ranst, M.; Maes, P. Antiviral activity of chloroquine against human coronavirus OC43 infection in newborn mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3416–3421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yan, Y.; Zou, Z.; Sun, Y.; Li, X.; Xu, K.-F.; Wei, Y.; Jin, N.; Jiang, C. Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an animal model. *Cell Res.* **2013**, *23*, 300–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Titus, E. Recent developments in the understanding of the pharmacokinetics and mechanism of action of chloroquine. *Ther. Drug Monit.* **1989**, *11*, 369–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Mackenzie, A.H. Dose refinements in long-term therapy of rheumatoid arthritis with antimalarials. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 40–45. [[CrossRef](#)]
48. Law, I.; Ilett, K.F.; Hackett, L.P.; Page-Sharp, M.; Baiwog, F.; Gomorra, S.; Mueller, I.; Karunajeewa, H.A.; Davis, T.M.E. Transfer of chloroquine and desethylchloroquine across the placenta and into milk in Melanesian mothers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2008**, *65*, 674–679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Gonzalez-Dunia, D.; Cubitt, B.; de la Torre, J.C. Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J. Virol.* **1998**, *72*, 783–788. [[PubMed](#)]
50. Ferreira, D.F.; Santo, M.P.; Rebello, M.A.; Rebello, M.C. Weak bases affect late stages of Mayaro virus replication cycle in vertebrate cells. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 313–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Savarino, A.; Boelaert, J.R.; Cassone, A.; Majori, G.; Cauda, R. Effects of chloroquine on viral infections: An old drug against today's diseases? *Lancet* **2003**, *3*, 722–727. [[CrossRef](#)]
52. Smit, J.M.; Moesker, B.; Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* **2011**, *3*, 160–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dohgu, S.; Ryerse, J.S.; Robinson, S.M.; Banks, W.A. Human immunodeficiency virus-1 uses the mannose-6-phosphate receptor to cross the blood-brain barrier. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Suen, W.W.; Prow, N.A.; Hall, R.A.; Bielefeldt-Ohmann, H. Mechanism of west nile virus neuroinvasion: A critical appraisal. *Viruses* **2014**, *6*, 2796–2825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Qian, X.; Nguyen, H.N.; Song, M.M.; Hadiono, C.; Ogden, S.C.; Hammack, C.; Yao, B.; Hamersky, G.R.; Jacob, F.; Zhong, C.; et al. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **2016**, *165*, 1238–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Savarino, A.; Shytaj, I.L. Chloroquine and beyond: exploring anti-rheumatic drugs to reduce immune hyperactivation in HIV/AIDS. *Retrovirology* **2015**, *12*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

