

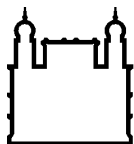
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR EM AMOSTRAS  
ALTERNATIVAS E MÉTODOS SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO  
LABORATORIAL DO ZIKA

ALINE DA SILVA SANTOS

Rio de Janeiro  
Março de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*ALINE DA SILVA SANTOS*

Avaliação de protocolo molecular em amostras alternativas e métodos sorológicos no diagnóstico laboratorial do Zika.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Prof. Dr. Ana Maria Bispo de Filippis  
Prof. Dr. Guilherme Amaral Calvet

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2017

SANTOS, ALINE DA SILVA.

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR EM AMOSTRAS ALTERNATIVAS E MÉTODOS SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO ZIKA / ALINE DA SILVA SANTOS. - Rio de Janeiro, 2017. 94 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

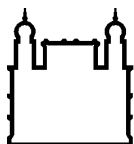
Orientadora: ANA MARIA BISPO DE FILIPPIS.

Co-orientador: GUILHERME AMARAL CALVET.

Bibliografia: f. 82-93

1. ZIKA VÍRUS, AMOSTRAS ALTERNATIVAS, DIAGNÓSTICO MOLECULAR, SOROLOGIA. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***ALINE DA SILVA SANTOS***

**AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR EM AMOSTRAS ALTERNATIVAS E MÉTODOS SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO ZIKA**

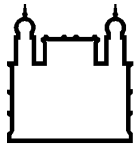
**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Ana Maria Bispo de Filippis  
Prof. Dr. Guilherme Amaral Calvet**

**Aprovada em: 13/03/2017**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão - IOC/FIOCRUZ**  
**Prof. Dr. Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC/FIOCRUZ)**  
**Prof. Dr. Renata de Mendonça Campos (UFRJ/RJ)**  
**Prof. Dr. Ana Maria Viana Pinto (UFF/RJ)**  
**Prof. Dr. Natalia Motta de Araújo (IOC/FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 13 de março de 2017.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

Dedico este trabalho aos meus filhos, Victor e Gabriela, minha inspiração para vencer os dias de luta sempre. A eles, todo o meu amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me amparar e renovar minhas forças durante todo o trabalho e a todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para sua realização.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup> Ana Bispo pela paciência, pela atenção dispensada durante todo o mestrado, pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho, pela orientação em todos os momentos, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento, pela compreensão, por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio.

A meu orientador Dr. Guilherme Calvet, me faltam palavras para agradecer tudo o que fez em tão pouco tempo de orientação. Sou inteiramente grata por todos os ensinamentos, paciência, compreensão e a parceria. Obrigada pelos conselhos, pelas aulas, pelo apoio e pelas ideias para concretização desse trabalho. Obrigada pelo crescimento profissional e pessoal que você me proporcionou durante esse tempo.

A Dr<sup>a</sup> Rita Nogueira, pelos seus valiosos ensinamentos, sugestões, conselhos e por contribuir no meu crescimento profissional.

A coordenadora, Dr<sup>a</sup> Martha Suárez Mutis, da Pós-graduação em Medicina Tropical pelo apoio e parceria durante todo o mestrado.

A Secretária, Livia Mangeon, da PGMGT pelo apoio e disponibilidade em tirar minhas dúvidas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Ao Sr. Marcel Quintana pela realização dos testes estatísticos, por sua paciência e parceria na realização deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Luzia Pinto por aceitar ser a revisora deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dr<sup>a</sup>. Luzia Maria de Oliveira Pinto Dr. Eduardo de Mello Volotão, Dr<sup>a</sup> Renata de Mendonça Campos, Dr<sup>a</sup> Ana Maria Viana Pinto e a Dr<sup>a</sup> Natalia Motta de Araújo por aceitarem a participar da avaliação deste trabalho.

A mestranda Cintia Damasceno falta palavras para agradecer tudo o que você fez por mim. Pela ajuda na técnica de PCR em tempo real, sempre me acompanhando nos experimentos. Obrigada pelos conselhos, pela confiança, estímulo, amizade e acima de tudo aturar as reclamações, os anseios e medos durante esses dois anos.

A mestranda Celeste Torres e Flavia Levy, pela parceria, amizade e companheirismo no mestrado e no laboratório.

Ao meu amigo de coração, de mais de 10 anos, Ronaldo Lapa, por ter sido o responsável pelo meu primeiro contato com a Fiocruz e o Laboratório de Flavivirus. Pela amizade, carinho e cumplicidade que temos durante todos esses anos. Se não fosse você, nada disso seria possível. Obrigada por tudo que você fez e faz por mim.

A Raquel Medialdea pelo apoio, por todos os conselhos e principalmente pela amizade.

A Dr<sup>a</sup> Patricia Sequeira, pela orientação no início do mestrado.

Aos colegas do LABFLA, Eliane Araújo, Simone Sampaio, Allison Fabri, Carolina Cardoso, Marcos César, Marcelle Santos, Everton Rodrigues, Solange Regina, Ana Miranda, Sheila Cheles, Leda Santos, José Farias, por todo apoio e ensinamentos nas provas realizadas e pela agradável convivência.

As meninas do Laboratório de Imunologia Viral, Nieli Faria, Fernanda Bruycker, Manoela Heringer, Priscila Conrado, Monique Lima, pelos conselhos e ensinamentos sobre como era o mestrado. A Dr<sup>a</sup> Flavia Barreto, pelos ensinamentos na disciplina, disponibilidade em ajudar e sua amizade.

Aos amigos Clébio Eleutério, Myrna Barata e todos da turma de 2015, pela amizade que ultrapassou a PGMGT e que levarei para o resto da vida.

Às minhas amigas Paula Magalhães, Juliana Leandro, Tatiane Martins, Clarissa Basílio e Leticia Dias por todo carinho, compreensão e por sempre torcerem por mim.

Aos meus familiares, tios e primos, e todos os amigos que sempre torceram por mim.

Aos meus filhos, Victor Hugo e Gabriela, a razão da minha busca incessante por crescer e ser uma pessoa melhor. A razão de todo meu viver.

Ao meu companheiro, Wagner Ferreira, por toda paciência e dedicação, por me aturar nos momentos difíceis e principalmente por cuidar das crianças nas minhas ausências.

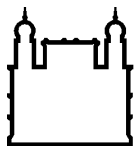
Aos meus pais, Gerson e Maria Aparecida, que sempre me apoiaram em tudo que eu me propusesse a fazer. Tenho certeza que qualquer agradecimento é mínimo diante do que fizeram por mim.

A Deus, pois ele é o meu refúgio nos momentos difíceis, o meu porto seguro nas horas de tempestades, quem me guia e renova as esperanças quando achamos que não há mais solução. Na certeza de que tu Senhor, nunca abandona seus filhos, agradeço sempre. Para sempre seja louvado.



A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA  
IDÉIA JAMAIS VOLTARÁ AO SEU  
TAMANHO NORMAL.

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

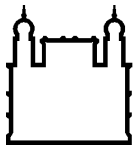
### AVALIAÇÃO DE PROTOCOLO MOLECULAR EM AMOSTRAS ALTERNATIVAS E MÉTODOS SOROLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DO ZIKA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**Aline da Silva Santos**

Em 2015, foi relatada a primeira transmissão autóctone do vírus Zika no Brasil. O vírus foi detectado através do método de RT-PCR e confirmado por sequenciamento do DNA. O diagnóstico laboratorial é um fator desafiante por conta da baixa viremia e reatividade cruzada com outros *flavivirus*. A utilidade de um diagnóstico correto e diferencial entre Zika, dengue, chikungunya e febre amarela contribui para o prognóstico dos pacientes, melhorando a vigilância do ZIKV e de outras arboviroses circulantes no país. O diagnóstico laboratorial na fase aguda é fundamental, pelo fato de que as manifestações são semelhantes clinicamente entre os vírus. O uso de urina e fluido oral como amostras alternativas ao soro são de fácil obtenção e que podem auxiliar os programas de vigilância na confirmação da infecção por Zika. Determinamos sensibilidade e especificidade dessas amostras comparadas ao soro no protocolo de qRT-PCR para detecção de ZIKV, considerando os dias de doença e encontramos maior sensibilidade na detecção do vírus entre o terceiro e quinto dia para urina e saliva. No diagnóstico sorológico avaliamos sensibilidade e especificidade do método in house MAC-ELISA versus o comercial da marca Euroimmun anti-IgM ZIKV e a concordância entre eles. Nossos resultados apontaram o teste MAC-ELISA como mais sensível e o Euroimmun mais específico. Avaliamos as reações cruzadas em testes de dengue (NS1 e IgM) e anti-IgM e IgG de Zika, e suas correlações com os dias de doença. Nas análises para NS1, observamos que o teste da marca Focus apresentou maior reatividade cruzada do que o da marca Platelia. O teste da marca Panbio para IgM de dengue também apresentou reatividade cruzada para Zika, assim como os testes anti-IgG Euroimmun de Zika frente ao dengue (sorotipos 1,2,3 e 4), febre amarela e malária (*P.falciparum*). Concluímos que urina e fluido oral se mostraram eficientes na detecção do ZIKV e que podem ser uma opção complementar ao diagnóstico do ZIKV, porque aumenta a possibilidade de detecção do vírus em períodos diferenciados do curso da doença quando utilizados com o soro.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **EVALUATION OF MOLECULAR PROTOCOL IN ALTERNATIVE SAMPLES AND SEROLOGICAL METHODS IN THE LABORATORY DIAGNOSIS OF ZIKA**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION THESIS IN TROPICAL MEDICINE**

**Aline da Silva Santos**

In 2015, the first autochthonous transmission of the Zika virus in Brazil was reported. The virus was detected by the RT-PCR method and confirmed by DNA sequencing. Laboratory diagnosis is a challenge because of low viremia and cross reactivity with other flaviviruses. The usefulness of a correct and differential diagnosis between Zika, dengue, chikungunya and yellow fever contributes to the prognosis of patients, improving the surveillance of ZIKV and other arboviruses circulating in the country. The laboratory diagnosis in the acute phase is fundamental, because the manifestations are similar clinically between the viruses. The use of urine and oral fluid as alternative serum samples are easy to obtain and may assist surveillance programs in confirming the infection by Zika. We determined sensitivity and specificity of these samples compared to serum in the qRT-PCR protocol for ZIKV detection, considering the days of disease and found greater sensitivity in the detection of the virus between the third and fifth day for urine and saliva. In the serological diagnosis we evaluated the sensitivity and specificity of the in-house MAC-ELISA method versus the commercial brand Euroimmun anti-IgM ZIKV and the agreement between them. Our results pointed to the MAC-ELISA test as more sensitive and the Euroimmun more specific. We evaluated cross-reactions in dengue (NS1 and IgM) and anti-IgM and IgG tests of Zika, and their correlations with disease days. In the analyzes for NS1, we observed that the Focus brand test showed greater cross reactivity than the Platelia brand. The test of the Panbio brand for dengue IgM also showed cross reactivity for Zika, as well as Zika's antiimmunoglobulin IgG tests against dengue (serotypes 1,2,3 and 4), yellow fever and malaria (*P. falciparum*). We concluded that urine and oral fluid were efficient in the detection of ZIKV and may be a complementary option to the diagnosis of ZIKV, because it increases the possibility of detecting the virus at different periods of the course of the disease when used with the serum.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>XIIV</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XIVI</b>
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>XIVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
1.1 Histórico e Epidemiologia do Vírus Zika .....	19
1.1.1 Zika no Brasil .....	20
1.2 Agente Etiológico .....	22
1.2.1 Classificação.....	22
1.2.2 Morfologia .....	23
1.2.3 Estrutura do genoma .....	24
1.2.4 Variabilidade genética.....	25
1.3 Vetor.....	27
1.4 Transmissão.....	28
1.5 Patogênese.....	31
1.6 Manifestações clínicas .....	31
1.6.1 Complicações neurológicas .....	31
1.6.2 Microcefalia e Síndrome Congênita .....	33
1.7 Resposta humoral a Flavivirus .....	35
1.8 Diagnóstico Laboratorial.....	37
1.8.1 Isolamento viral .....	38
1.8.2 Detecção molecular .....	39

1.8.3	Diagnóstico em fluidos corporais .....	40
1.8.4	Diagnóstico sorológico .....	42
1.8.5	Detecção em tecidos pós-mortem .....	43
<b>1.9</b>	<b>Prevenção e Controle.....</b>	<b>43</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1	Objetivo Geral .....	46
3.2	Objetivos Específicos .....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1	Considerações éticas .....	47
4.2	Amostragem.....	47
4.3	Coleta de amostras de urina e saliva .....	47
4.4	Classificação das amostras por grupo.....	48
4.5	Desenho do estudo .....	51
4.6	Metodologias utilizadas .....	51
4.6.1	Extração do RNA viral .....	51
4.6.1 a)	Procedimentos .....	51
4.6.2	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando sonda Taqman (RT-PCR) (Lanciotti <i>et al.</i> , 2008). .....	51
4.6.3	Ensaio Imunoenzimáticos para o diagnóstico de ZIKV.....	53
4.6.3 a)	ELISA de captura de anticorpos (MAC-ELISA) IgM anti-ZIKV (Protocolo CDC/EUA) .....	53
4.6.3 b)	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de captura para detecção de anticorpos da classe IgM anti-ZIKV no kit Zika Virus IgM Euroimmun.....	54
4.6.3 c)	Ensaio Imunoenzimático (ELISA) de captura para detecção de anticorpos da classe IgG anti-ZIKV no kit Zika Virus IgG Euroimmun.....	55
4.6.4	Captura de antígeno NS1 de Dengue.....	56
4.6.4 a)	Ensaio Dengue NS1 Antigen DX Select™ Focus Diagnostics.....	56

4.6.4 b)	Ensaio Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad).....	57
4.6.5	Ensaios Imunoenzimáticos.....	58
4.6.5 a)	Captura de anticorpos da classe IgM anti-DENV.....	55
4.6.5 c)	Captura de anticorpos da classe IgM anti ZIKV.....	56
4.7	Características de desempenho dos testes de diagnóstico.....	59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
5.5.1	Análise molecular Grupo I....	60
5.5.2	Análise molecular Grupo II.....	60
5.5.3	Análise sorológica Grupo III .....	66
5.5.4	Especificidade dos testes de Dengue e Zika.....	68
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> – Incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de residência, até a Semana Epidemiológica 52. Brasil, 2016.....	21
<b>Figura 1.2</b> - Formas das partículas virais dos flavivírus .....	23
<b>Figura 1.3</b> - Estrutura do vírus Zika.....	24
<b>Figura 1.4</b> – Genoma e estrutura do vírus Zika.....	25
<b>Figura 1.5</b> Árvore filogenética do vírus Zika mostrando as linhagens africana e asiática, incluindo as cepas que emergiram recentemente no Pacífico e no Brasil .....	27
<b>Figura 1.6</b> – Esquema da cinética da resposta imune a flavivírus: A) Resposta primária com aparecimento precoce de IgM e tardio de IgG e B) Resposta secundária com aparecimento precoce de IgG e tardio de IgM.....	38
<b>Figura 1.7</b> – Distribuição das amostras alternativas utilizadas na análise molecular (Grupos I e II).....	49
<b>Figura 1.8</b> – Grupo III – Distribuição das amostras da análise sorológica confirmadas para ZIKV por PCR em tempo real. Somente as de fase aguda foram utilizadas para estabelecer sensibilidade e especificidade do teste ELISA anti-IgM de ZIKV .....	50
<b>Figura 1.9</b> – Grupo IV – Distribuição das amostras para análise da especificidade dos testes sorológicos de Dengue. Na pesquisa de antígeno NS1 utilizamos 84 amostras. Na de anticorpos IgM partimos de 91 amostras que foram testadas no qRT-PCR para DENV e ZIKV e selecionamos apenas 18 amostras para o nosso estudo.....	50
<b>Figura 1.10</b> – Grupo V- Distribuição das amostras para análise de especificidade do teste sorológico anti-IgM e anti-IgG de ZIKV frente a outros flavivirus e ao <i>Plasmodium</i> .....	51
<b>Figura 4.1</b> – Tabela de validação de um teste diagnóstico.....	60
<b>Figura 5.1</b> - Percentual de detecção de RNA de ZIKV em cada espécime do grupo I.....	64
<b>Figura 5.2</b> – Resultado da detecção de ZIKV nas amostras de soro, urina e fluido oral coletadas no mesmo momento.....	64
<b>Figura 5.3</b> – Resultado da detecção de ZIKV nas amostras de soro, urina e fluido oral coletados em momentos diferentes.....	65
<b>Figura 5.4</b> - Combinação entre os fluidos e a positividade de ZIKV.....	65
<b>Figura 5.5</b> – Relação entre o tempo de coleta de cada espécime clínica e a detecção de ZIKV. ....	66
<b>Figura 5.6</b> – Percentual de detecção de ZIKV no soro por intervalos de dias de doença.....	68

<b>Figura 5.7</b> – Percentual de detecção de ZIKV na urina por intervalos de dias de doença.....	68
<b>Figura 5.8</b> – Percentual de amostras positivas no MAC-ELISA estratificado por dias de doença.....	69
<b>Figura 5.9</b> – Percentual de amostras positivas no Euroimmun estratificado por dias de doença.....	70
<b>Figura 5.10</b> – Amostras agudas positivas para ZIKV testadas nos kits Platelia e Focus.....	71



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1:</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cdna para amplificação dos fragmentos do gene do envelope do ZIKV.....	52
<b>Tabela 4.2:</b> Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.....	52
<b>Tabela 4.3:</b> Parâmetros de ciclagem RT-PCR em tempo real.....	53
<b>Tabela 5.1:</b> Comparação da urina com o soro nos intervalos de dias de doença.....	66
<b>Tabela 5.2:</b> Comparação do fluido oral com o soro nos intervalos de dias de doença.....	66
<b>Tabela 5.3:</b> Resultados das amostras de soro e urina no qRT-PCR de ZIKV.....	67
<b>Tabela 5.4:</b> Sensibilidade e especificidade da urina comparada ao soro nos intervalos de dias de doença.....	69
<b>Tabela 5.5:</b> Análise da sensibilidade e especificidade do MAC-ELISA.....	70
<b>Tabela 5.6:</b> Análise da sensibilidade e especificidade do Euroimmun.....	70
<b>Tabela 5.7:</b> Percentual de reação cruzada nos testes de NS1 para dengue com amostras positivas para ZIKV.....	72
<b>Tabela 5.8:</b> Percentual de reação cruzada nos testes Anti-IgM e Anti-IgG de Zika da Euroimmun com amostras positivas para dengue, febre amarela e malária.....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcM	Anticorpos monoclonais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVE	Tampão a base de água isenta de RNase que contém 0,04% de azida de sódio
AVL	Tampão de lise
AP61	Linhagem celular de mosquito <i>Aedes pseudoscutellaris</i>
AW1	Tampão de lavagem na extração de RNA
AW2	Tampão de lavagem na extração de RNA
°C	Graus Celsius
C	Proteína estrutural do capsídeo ou core viral
CDC	Centro de Controle e Prevenção de doenças
C6/36	Linhagem celular de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
CE/IVD	Conformité Européene/in Vitro Diagnostic
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus dengue
DENV1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV4	Vírus dengue sorotipo 4
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
E	Proteína Estrutural do Envelope
ELISA	Ensaio Imunoenzimático ligado à enzima
EEEV	Vírus da encefalite equina do Leste
ECP	Efeito Citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration Emergency Use Authorization
FAM	Sonda da qRT-PCR
g	Gramas
HRP	Anticorpo monoclonal conjugado à enzima
HI	Inibição da Hemaglutinação

IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOC/FIOCRUZ	Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz
INI/FIOCRUZ	Instituto Nacional de Infectologia/Fundação Oswaldo Cruz
IC95	Intervalo de confiança 95%
M	Molar
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos
MAYV	Vírus Mayaro
NC	Não codificante
NS	Proteínas não estruturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PAHO	Organização Pan-americana de Saúde
pb	Pares de bases
Ph	Potencial de hidrogênio
PBS	Tampão de lavagem no ELISA
PHEIC	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
PrM/M	Proteínas estruturais Pré-membrana/Membrana
PRNT	Teste de neutralização por redução de placas
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase quantitativo em tempo real)
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
ROCV	Vírus Rocio
SNC	Sistema nervoso central
SINASC	Sistema de informações sobre nascidos vivos no Brasil
SINAN-NET	Sistema de informação de agravos de notificação
6B6C-1	Conjugado para flavivirus
SPOV	Vírus Spondweni
SLEV	Sistema Único de Saúde
SGB	Síndrome de Guillain-Barré

SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TMB	Tetrametilbenzidina
VORO	Vírus Oropouche
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
WEEV	Vírus da encefalite equina Ocidental
UFs	Unidades Federativas
ZIKV	Vírus Zika
ZIKV MR 766	Cepa do vírus Zika isolado de macaco <i>Rhesus</i> nº 766

# INTRODUÇÃO

## 1.1. HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS ZIKA

O primeiro isolamento do vírus Zika (ZIKV) foi num macaco *Rhesus* febril participante de um grupo sentinela que estudava imunidade de febre amarela entre os macacos, na Floresta de Zika. Esse evento ocorreu em 1947, perto do Lago Victoria, na periferia de Entebbe (atual Kampala), em Uganda, (1). O nome da floresta onde ocorreu o primeiro isolamento foi dado ao vírus. Os primeiros casos humanos de infecção pelo vírus Zika foram descritos na África, na década de 1960 e em seguida, no sudeste da Ásia (2). Por meio século, menos de 20 infecções humanas foram documentadas (2) e a maioria dos dados resultaram de inquéritos sorológicos do vírus da febre amarela (YFV). ZIKV foi isolado a partir de várias espécies de mosquitos recolhidos durante estudos de arbovírus na África e de síndrome febril na Ásia (1) (3) (4). Em 2007 foi registrada a primeira epidemia de febre do Zika, nas ilhas Yap, Micronésia (5). Após essa epidemia, infecções por ZIKV permaneceram limitadas a casos esporádicos ou epidemias de pequena escala. Durante a epidemia em Yap, em 2007, estima-se que três quartos da população local tenha sido infectada. A área de distribuição e expansão do vírus Zika faz dele causador de doença emergente confirmada pela epidemia que atingiu posteriormente a Polinésia Francesa em 2013/2014 e a Nova Caledônia em 2014 (6), (7). Essas epidemias foram seguidas por surtos menores nas Ilhas Cook (8), e Ilha de Páscoa (9) e em 2015 em Vanuatu (10), as Ilhas Salomão (11), Samoa (12) e Fiji (11). No Brasil, os primeiros casos suspeitos foram reportados no final de março de 2015 nas cidades de Camaçari, Bahia e na cidade de Natal, Rio Grande do Norte (13) (14). Um surto foi relatado na África Ocidental (Cabo Verde) em novembro (15). A partir do final de Janeiro de 2016, a circulação autóctone de ZIKV foi relatada em mais de 20 países nas Américas do Sul, Central e do Norte, e também no Caribe (11) (16). A disseminação de ZIKV nos continentes foi associada com a descrição de manifestações neurológicas incluindo a síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos na Polinésia Francesa (17) e no Brasil (18) e microcefalia em recém-nascidos no Brasil (19).

A circulação concomitante de ZIKV com o vírus da dengue (DENV) e com o vírus chikungunya (CHIKV) foi relatada na Polinésia Francesa (6) e no Brasil (13), mas provavelmente também ocorre em todas as Américas, Ásia, várias ilhas do Pacífico e África, onde DENV e CHIKV são endêmicas. É evidente que ZIKV está seguindo a mesma trajetória

de DENV e CHIKV, espalhando-se para todos os países infestados com *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, mosquitos vetores do vírus (20).

Países como Filipinas (21) e Tailândia (22), têm relatado casos de Zika. Casos importados (sem transmissão autóctone) foram relatados no Japão (23) (24), Austrália (25) (26), Itália (27), Alemanha (28), Noruega (29), Canadá (30), Estados Unidos (31) (32) (33) e Reino Unido (34).

De acordo com dados da OPAS (36) a transmissão autóctone de Zika ocorre em 40 países das Américas, incluindo a Colômbia (16.419 casos relatados, 798 casos confirmados laboratorialmente); Guatemala (17 casos suspeitos); México (transmissão local confirmada); Panamá (três casos); Paraguai (seis casos confirmados laboratorialmente); Venezuela (quatro casos confirmados laboratorialmente, 15 casos SGB); El Salvador (240 casos, 46 casos de SGB, 54% do sexo masculino e dois óbitos); Honduras e Martinica. Bolívia, Guiana, Equador, Guadalupe, Guatemala, Porto Rico, Barbados, San Martin e Haiti relataram transmissão ocasional após a introdução (35).

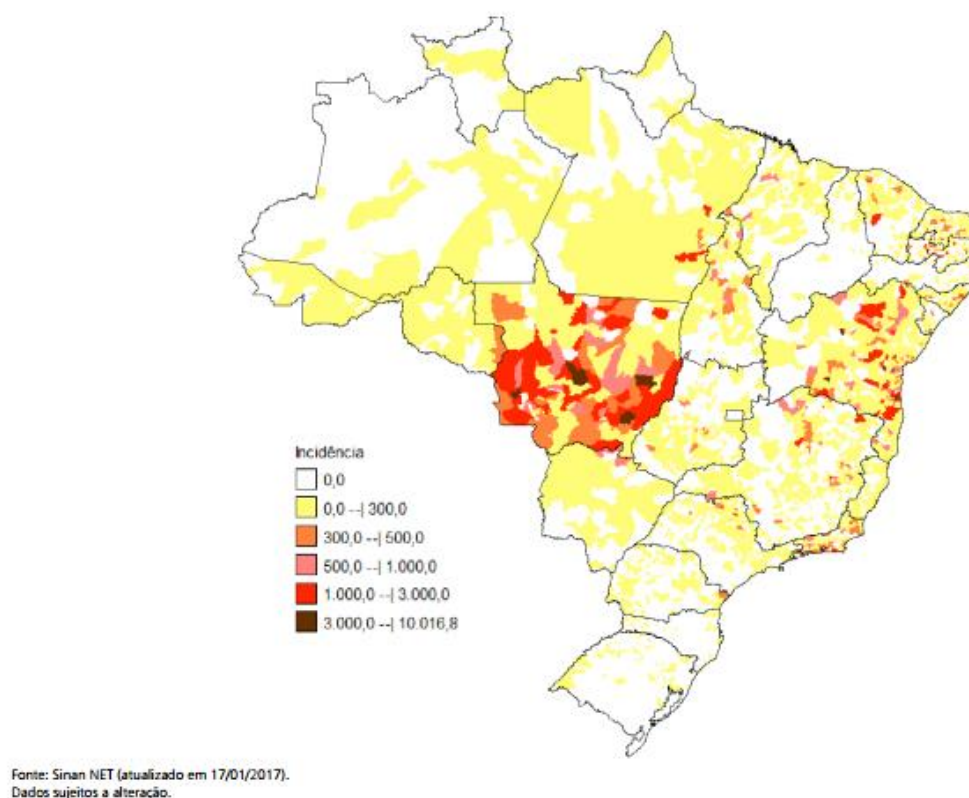
### **1.1.1 Zika no Brasil**

No Brasil, os primeiros casos suspeitos foram reportados no final de março de 2015 nas cidades de Camaçari, Bahia e na cidade de Natal, Rio Grande do Norte. Os pacientes apresentavam sintomas que incluíam erupções pruriginosas maculopapular, cefaleia, artralgia associada ou não a edema de extremidades, febre baixa ou ausente, dor retro-orbitária, mialgia e manifestações digestivas (13) (14). A infecção por ZIKV foi confirmada em amostras de soro de pacientes dos dois estados, através da detecção do RNA do vírus pelo método de RT-PCR em tempo real.

No mesmo ano, foram confirmados laboratorialmente três óbitos por vírus Zika no país: em São Luís/MA (1), Benevides/PA (1) e Serrinha/RN (1) (36). A mediana de idade desses óbitos foi de 20 anos. Em 2016, foram confirmados laboratorialmente oito óbitos por vírus Zika: quatro no Rio de Janeiro e dois no Espírito Santo, um no Maranhão e um na Paraíba, ocorridos entre os meses de janeiro e agosto (36).

Em relação às gestantes, foram registrados 16.923 casos prováveis, sendo 10.820 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial, segundo dados do SINAN-NET (dados não apresentados em tabelas).

Na Figura 1.1 é possível observar, no mapa do Brasil, a distribuição da incidência dos casos prováveis pelo vírus Zika, até a semana epidemiológica 52, que termina em 17 de dezembro de 2016, segundo município de residência, foram registrados 215.319 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país (taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.306 municípios, tendo sido confirmados 130.701 (60,7%) dos casos. A análise da taxa de incidência de casos prováveis (/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, demonstra que a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência: 222,0 casos/100 mil hab. Entre as UFs, destacam-se Mato Grosso (671,0 casos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (414,2 casos/100 mil hab) e Bahia (340,5 casos/100 mil hab.).



**Figura 1.1** - Incidência (/100 mil hab.) de febre pelo vírus Zika por município de residência, até a Semana Epidemiológica 52. Brasil, 2016.

O Brasil foi o primeiro país a relatar óbitos confirmados causados pelo vírus da Zika (36). Uma das hipóteses levantadas para explicar esses óbitos seria a mutação da cepa circulante no Brasil para uma mais virulenta. Associando os óbitos e os casos de microcefalia relatados durante a epidemia no Brasil, alguns estudos relataram que as mutações no gene que codifica o envelope viral de outros membros da família *Flaviviridae* aumentaram a sua virulência e a sua capacidade de danificar o sistema nervoso central (37), sendo essa uma possível explicação para o que aconteceu no Brasil. Em relação às gestantes, foram

registrados 17.000 casos prováveis, sendo 11.052 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial, segundo dados do SINAM-NET (dados não divulgados).

## **1.2 AGENTE ETIOLÓGICO**

### **1.2.1 Classificação de ZIKV**

O vírus Zika é um arbovírus transmitido por um vetor artrópode mantido na natureza através da transmissão biológica do vetor ao hospedeiro vertebrado suscetível. O artrópode hematófago é do gênero *Aedes*. Pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* (38). Os arbovírus são transmitidos e mantidos na natureza por ciclos selvagens, em que várias espécies de artrópodes sugadores de sangue atuam como vetores e vertebrados selvagens como hospedeiros reservatórios (39). As pessoas mais comumente afetadas são aquelas que mantêm contato com esses ambientes, onde existem os nichos ecológicos de arbovírus (39).

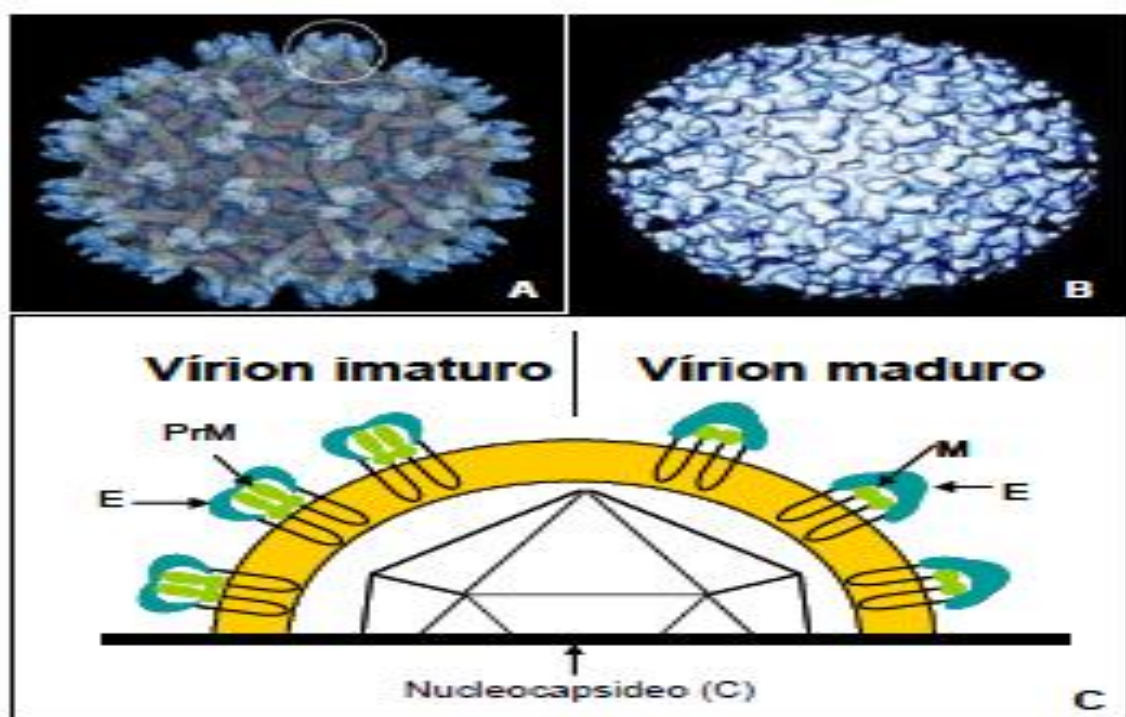
Alguns arbovírus circulam regularmente em áreas urbanas, tais como o vírus da dengue e o vírus Oropouche (VORO), ou em zonas peri-urbanas, como exemplo o vírus Mayaro (MAYV) e o da Febre Amarela, causadores de doenças febris, exantemáticas e às vezes, hemorrágicas. Alguns arbovírus podem causar meningite e doenças do sistema nervoso central, como visto em infecções por vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV), o vírus Rocio (ROCV), vírus da encefalite equina do Leste (EEEV) e o vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) (39).

Arbovírus eram inicialmente classificados de acordo com critérios sorológicos (de classificação antigênica) (40). A nova base usada para taxonomia agora é a molecular. O gênero é classificado em grupos, espécies e clados. (41). As cinco famílias principais de arbovirus, de acordo com as suas propriedades antigênicas e características físico-químicas são: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* e *Rhabdoviridae* (39). A família *Flaviviridae* é composta pelos seguintes gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. Possuem no seu genoma RNA de polaridade positiva, cadeia simples com 9,6 a 12,3 quilobases de comprimento. As partículas virais são envelopadas e esféricas, com cerca de 40 a 60 nanômetros de diâmetro. O envelope contendo lipídios possui uma glicoproteína de superfície que medeia ligação, fusão e penetração, e uma proteína de matriz interna. O nucleocapsídeo contém a proteína do capsídeo e o RNA. (42). Os Flavivírus variam amplamente no seu potencial patogênico e nos mecanismos para a produção de doenças humanas. No entanto, é útil considerá-los em três categorias principais: os associados



principalmente à síndrome da encefalite (protótipo: encefalite de Saint Louis), com febre-artralgia-erupção cutânea (protótipo: dengue) ou com febre hemorrágica (protótipo: febre amarela).

Durante o processo de cultivos celulares com os Flavivírus, duas formas virais podem ser distinguidas: a madura, encontrada fora das células e que possui duas glicoproteínas associadas ao envelope viral, E M; e a imatura, exclusiva do meio intracelular, apresentando o precursor da proteína M (PrM), o qual é clivado durante o processo de maturação (43); (Figura 1.2).

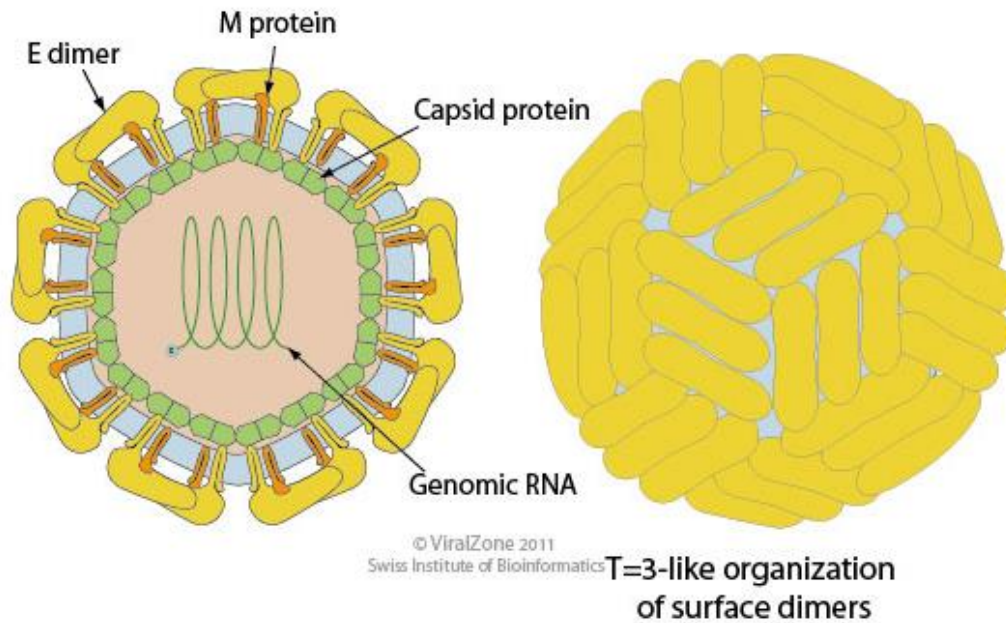


**Figura 1.2** - Formas das partículas virais dos flavivírus: (A) partícula viral imatura; (B) partícula viral madura; (C) esquema das formas madura e imatura. Fonte: (A) <http://www.purdue.edu/uns/x/2007b/071019CelHockmeyer.html>; (B) Lindenbach et al., 2007; (C) adaptado de Heinz & Allison, 2003.

### 1.2.2 Morfologia

A partícula do vírus Zika possui a mesma estrutura geral que outras espécies de Flavivirus (44). É esférica, com 40 a 50 nm de diâmetro (45). Seu invólucro é formado por uma bicamada lipídica incorporada em 180 unidades de glicoproteínas E e M para ligação a uma variedade de receptores celulares (46). A glicoproteína E tem uma estrutura típica de três

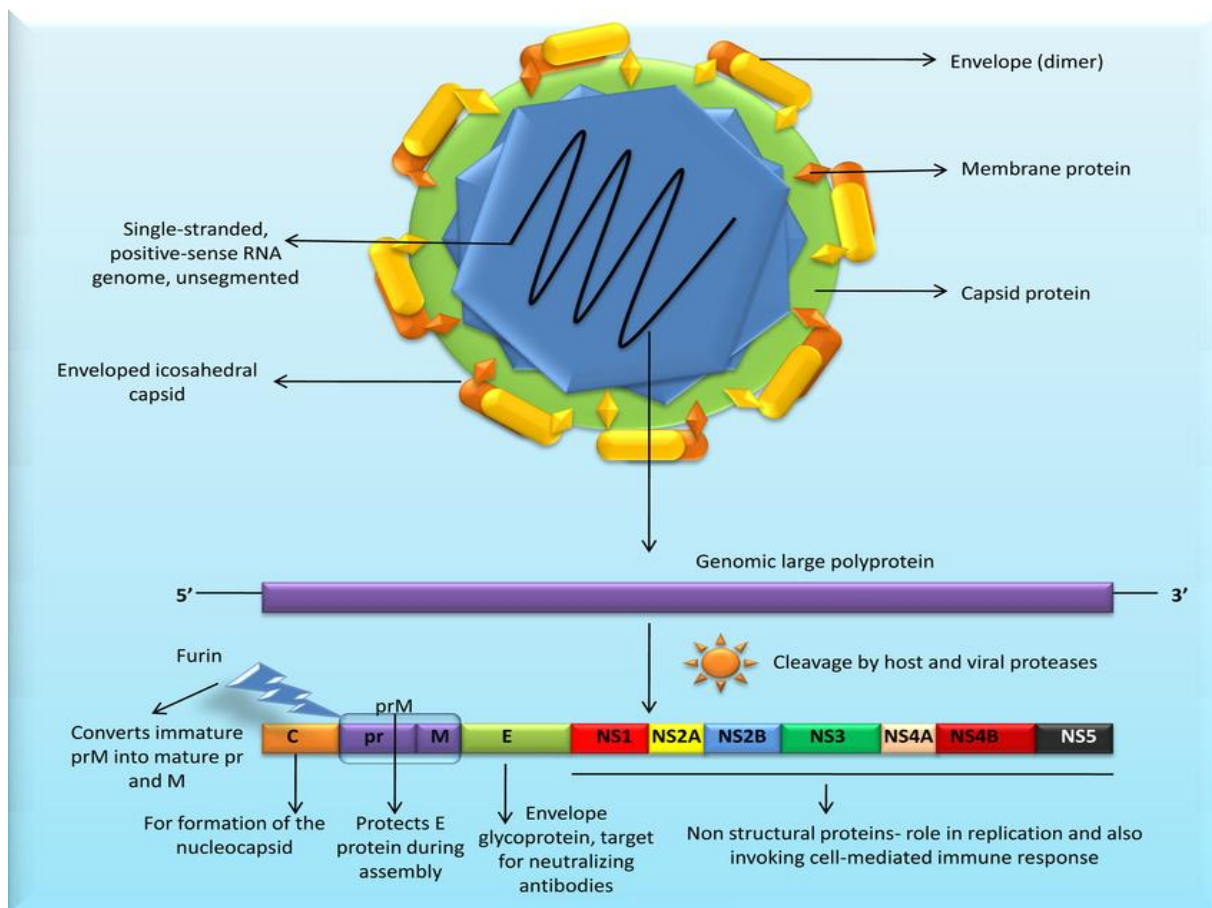
domínios, como no vírus dengue-2, a diferença principal é que tem apenas um local de glicosilação (Asn154) que aparece como uma pequena protrusão na superfície viral. (47) (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Estrutura do Zika Vírus: 3 proteínas estruturais (capsídeo, proteína de membrana e do envelope) e o genoma (RNA) (Adaptado de Sagar Aryal, 2015).

### 1.2.3 Estrutura do genoma

O vírus Zika é envelopado e possui um capsídeo icosaédrico, característica comum a todos os flavivírus (48). Possui um genoma de RNA, fita simples e polaridade positiva com 10.794 nucleotídeos de tamanho. O genoma contém uma região 5' e 3' não traduzida flanqueando uma região codificadora que sintetiza 3 proteínas estruturais (do capsídeo, pré-membrana/membrana e do envelope) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (49) (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Genoma e estrutura do vírus Zika. Zika possui polaridade positiva com 7 genes não-estruturais e três genes estruturais. (Adaptado de Singh et al, 2016).

O nucleocapsídeo do vírus Zika é formado pela proteína C associada a uma molécula de RNA viral de cadeia simples (51). O vírus se replica nas membranas do retículo endoplasmático rugoso, como demonstrado em células cerebrais in vivo (45) e em neuroesferas in vitro (52).

### 1.2.4 Variabilidade genética

O vírus Zika foi classificado juntamente com Spondweni (SPOV) no mesmo cluster com base no sequenciamento da região de codificação completa do gene da proteína não-estrutural 5 (NS5) (53). O genoma completo do vírus (estirpe do protótipo ZIKV MR 766 – macaco *Rhesus* 766) foi completamente sequenciado pela primeira vez em 2007 (49). As sequências completas de outras cepas do vírus Zika do Brasil, Camboja, República Centro-Africana, Polinésia Francesa, Guatemala, Malásia, Nigéria, Porto Rico, Senegal, Tailândia e Estado Yap estão disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) (53) (54) (55)

Após o surto de Yap, na Micronésia, Lanciotti e colaboradores conduziram o primeiro estudo filogenético do vírus Zika (53). O sequenciamento completo do gene que codifica NS5

revelou três linhagens ou subclados diferentes do vírus: linhagem da África Oriental (protótipo de Uganda), linhagem da África Ocidental (cepas do Senegal) e a linhagem asiática (estirpe de Yap ZIKV 2007). A linhagem asiática divergiu de um ancestral comum que se expandiu no Sudeste da Ásia e Pacífico (53).

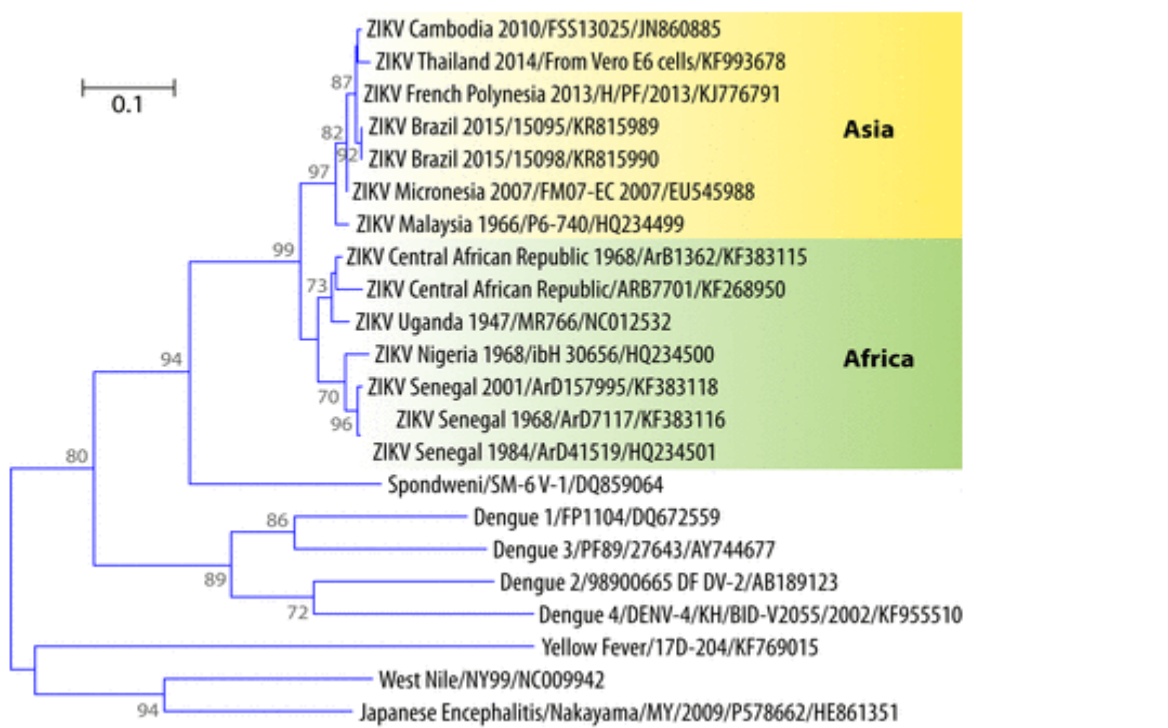
Com base em sequências genômicas completas, Haddow e colaboradores descreveram duas linhagens principais do vírus Zika: estirpe africana (Uganda, Senegal e Nigéria) e a estirpe asiática (Malásia 1966, Yap 2007 e Camboja 2010). Desta forma, o ZIKV que foi introduzido no estado Yap parece o do sudeste asiático (56) e que sua circulação nesta região se deu pelo menos, desde a década de 1960.

O percentual de identidade de toda a região de codificação da estirpe de Yap com a do protótipo ZIKM MR 766 foi de 88,9% (96,5% ao nível de aminoácidos) (53). De acordo com o sequenciamento parcial do gene que codifica M/E (membrana e envelope), a estirpe da Polinésia francesa teve mais proximidade da linhagem isolada no Camboja em 2010 do que a linhagem de Yap (6), ambas na linhagem asiática (12). As análises de sequenciamento por semicondutor de íons foram realizadas em dois isolados provenientes do surto da Polinésia Francesa e evidenciaram a microevolução genômica durante a epidemia (54).

Nas Américas, os isolados disponíveis sequenciados geraram as sequências do vírus Zika no Brasil, Colômbia, Porto Rico e Guatemala. (13) (55) (57). Todos apresentaram mais de 99% de identidade nucleotídica com as estirpes da Polinésia Francesa (55). Estas cepas podem constituir um grupo do Hemisfério Ocidental, dentro do genótipo asiático (55). O gene que codifica a NS5 da estirpe isolada na Ilha de Páscoa também apresentou 99,8% de similaridade ao nível de nucleotídeos com a estirpe da Polinésia Francesa (58).

Baseado em dados epidemiológicos e nas sequências, suporta-se a hipótese de que as cepas epidêmicas de vírus Zika emergiram por meio de mudança genética no vírus da linhagem asiática. Provavelmente, dois eventos ocorreram, um em Yap e outro na Polinésia Francesa. A última cepa apresentou maior virulência e foi introduzida no Brasil em 2015 dispersando para outros países americanos (59). Uma hipótese alternativa a esta é que o surgimento de doença grave associada ao vírus Zika foi uma função da incidência, ou seja, eventos de baixa frequência, como a síndrome de Guillain-Barré e microcefalia, só podem ser reconhecidos durante uma epidemia com grande número de casos, como os observados na Polinésia Francesa (> 30.000 casos) e Brasil (> 1.000.000 de casos). Assim, com apenas 14 casos humanos reconhecidos antes da epidemia do Estado de Yap, não se pode excluir a possibilidade de que as cepas ancestrais de ZIKV fossem capazes de causar complicações graves que não foram reconhecidas porque o número de casos humanos era muito pequeno.

Interessante observar que a sequência parcial do gene codificador de NS5 da linhagem isolada de um viajante retornando das Maldivas em junho de 2015 foi idêntica àquelas das linhagens da Polinésia Francesa, Brasil e Ilha de Páscoa (60), sugerindo uma provável introdução no Pacífico ou no Brasil. Uma árvore filogenética baseada na sequência parcial dos genes que codificam E do vírus Zika e outros flavivírus é mostrada na Figura 1.5.



**Figura 1.5** - Árvore filogenética de ZIKV mostrando as linhagens africana e asiática, incluindo as cepas que emergiram recentemente no Pacífico e no Brasil (59).

### 1.3 Vetor

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez a partir de *Aedes africanus* em 1948 (1). Isolados subsequentes do vírus nesta espécie incluíram duas cepas da Floresta Lunyo (62) e 12 cepas da Floresta Zika de Uganda (63). Outros arbovírus (vírus Ntaya, vírus da febre amarela, vírus da febre do vale Rift, e chikungunya) também foram isolados a partir de *Aedes africanus* (64). Estes mosquitos preferem fazer o repasto em macacos do que em seres humanos (65), mas também se alimenta de roedores, aves, répteis e espécies (63).

O primeiro isolado do vírus Zika na Ásia foi obtido a partir de *Aedes aegypti*, na Malásia em 1966; foi o primeiro isolamento do vírus a partir de um mosquito que não

o *Aedes africanus* (3). O vírus Zika também foi isolado a partir de um mosquito macho *Aedes furcifer* (66), sugerindo a possibilidade de transmissão vertical, que pode ser um importante mecanismo de manutenção do vírus Zika na natureza. A distribuição sazonal da taxa de infecção do vírus em mosquitos no Senegal mostrou dois picos de amplificação, em junho e entre setembro e dezembro (66).

O isolamento de um vírus em mosquito não é evidência de que ele seja um vetor desse vírus. Para demonstrar que um mosquito é um vetor, ele deve mostrar sua capacidade de transmissão (67). O primeiro estudo de competência vetorial a partir do *Aedes aegypti* para transmissão do vírus zika foi realizado em 1956 (68).

O período de incubação extrínseco do vírus zika (o tempo entre a infecção do vetor e quando ele se torna capaz de transmitir o vírus) foi de cerca de 15 dias (4). Em uma comparação de competência entre o vetor de febre amarela e zika, o período de incubação extrínseco foi menor e a transmissão do vírus Zika foi mais eficiente (4). Os autores sugeriram que esses dados poderiam explicar, em parte, a menor frequência de epizootias de febre amarela observada no leste do Senegal.

De acordo com relatos acontecidos no Pacífico durante surtos por vírus Zika, confirmou-se que o vírus pode ser transmitido por diferentes vetores durante surtos. Nas Ilhas Yap transmitido por *Aedes hensilii*, em Nova Caledonia por *Aedes aegypti*, na Polinésia Francesa por *Aedes aegypti* e/ou *Aedes polynesiensis*. No Gabão, *Aedes albopictus* foi o vetor do vírus pelo fato de que os níveis de *Aedes aegypti* eram baixos para transmissão (69). Em conjunto, estes dados indicam que, não há um padrão de preferência por espécies animais pelos vetores e nem uma preferência do vírus Zika para uma determinada espécie de mosquito vetor (2)(2). A competência de espécies americanas de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* para transmitir o vírus Zika é desconhecida, mas estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que ambas as espécies são bem adaptadas para transmitir dengue e chikungunya (70).

#### **1.4 Transmissão**

O meio de transmissão que se conhecia no passado para o vírus Zika era unicamente a picada de mosquitos do gênero *Aedes* (subgênero *Stegomyia*). Algumas espécies do gênero *Aedes* podem espalhar o vírus em regiões geográficas diferenciadas, tanto naturais quanto urbanas (2) (71), no entanto, o potencial como vetor é variável e apenas 20-50% das fêmeas infectadas

possuem partículas virais na saliva com capacidade de transmissão em algumas espécies (72) (73).

Fluidos corporais como saliva e a urina foram estudados como possíveis veículos para a transmissão do vírus Zika, uma vez que partículas viáveis do vírus foram isoladas da saliva e urina de dois pacientes na fase aguda no Brasil. O vírus foi cultivado em células Vero, induzindo efeitos citopáticos típicos (74). Não podemos afirmar que esses fluidos possam ser infectantes a ponto de transmitir o vírus a partir de um paciente infectado com um não-imune do hospedeiro humano. A carga viral nestes fluidos pode não ser suficiente para transmissão do vírus. Um relato na literatura sobre a transmissão do vírus Zika por mordida de macaco em um turista australiano voltando da Indonésia, foi descartada como improvável no momento (25).

A presença de partículas viáveis do vírus Zika em bolsas de sangue pode ter um impacto muito grande sobre as transfusões de sangue (59). Outros Flavivirus também apresentaram partículas de vírus em bolsas de sangue, relatados na literatura (75) (76). A circulação simultânea de dois ou mais arbovírus (73) em muitos países destaca a necessidade do monitoramento adequado de amostras de sangue para esses vírus. O material genético de três vírus diferentes tem sido detectado em amostras de um único paciente na América Latina (7) (77) e o RNA do vírus Zika e partículas viáveis foram detectados em amostras de sangue de doadores assintomáticos na Polinésia (78). No Brasil, o RNA viral foi detectado em um paciente que recebeu transfusão sanguínea de um doador assintomático que desenvolveu a doença alguns dias mais tarde (79). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendou que doadores de sangue com infecções laboratoriais ou clinicamente confirmados de vírus Zika deve ser elegível para doações de sangue somente depois de 30 dias após a recuperação clínica completa, e que os bancos de sangue devem ser notificados se os doadores desenvolverem quaisquer sintomas em uma semana após a doação de sangue (80). A luz ultravioleta e amotosaleno têm sido propostos como um método eficiente de inativar arbovírus nas amostras de sangue (81).

O vírus Zika também pode ser transmitido sexualmente. A evidência inicial foi confirmada a partir de dois pesquisadores norte-americanos do sexo masculino que foram para uma área endêmica no Senegal para coletar amostras de mosquitos. Um deles relatou hematospérmia e sua esposa, que não tinha viajado, permanecendo em seu lugar de residência (Colorado), apresentou artralgia, exantema e úlcera oral, semelhante aos sintomas apresentados pelo marido. O título de anticorpos de Zika e febre amarela apresentaram

considerável elevação em ambos os homens, mas as tentativas para a cultura do vírus foram infrutíferas. Pode-se supor que durante a fase aguda e virêmica da infecção, o dano ao endotélio vascular resulte em células sanguíneas e partículas de vírus Zika sendo liberados no sêmen, favorecendo a transmissão (33).

Cópias de RNA do vírus Zika ( $2,9 \times 10^7/\text{ml}$ ) foram detectadas no sêmen de um paciente durante um tempo prolongado e a carga viral manteve-se elevada ( $1,1 \times 10^7/\text{ml}$ ). A cultura realizada a partir do sêmen e urina desse paciente foi positiva, evidenciando uma grande possibilidade de que esses fluidos possam ser vias de transmissão do vírus (82). A carga viral no sêmen se apresentou 100.000 vezes mais elevada do que no soro e na urina, podendo ser explicado pelo privilégio imunitário dos órgãos reprodutores masculinos (83). O RNA viral foi detectado no sêmen até 188 dias após o início dos sintomas e o vírus infeccioso foi isolado no sêmen até 69 dias após a infecção, evidenciando a transmissão sexual em relações sem usos de preservativo como uma forte via de dispersão do vírus (84).

A transmissão vertical do vírus Zika tornou-se um sério risco para a gravidez e desenvolvimento fetal, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar a doença uma emergência de saúde pública de importância internacional em 01 de fevereiro de 2016 (PHEIC) (85). Besnard e colaboradores descreveram dois casos de transmissão perinatal do vírus na Polinésia Francesa (86). O RNA viral foi detectado no sangue, saliva, urina e amostras de mães e recém-nascidos, bem como no leite materno (até  $250 \times 10^4$  cópias de ARN / ml) a partir de ambas as mães, mas as culturas foram negativas no leite materno. As dúvidas sobre a segurança do aleitamento materno por mães infectadas com o vírus Zika também foram levantadas quando uma mulher com 35.000 cópias de RNA / mL de ZIKV no sangue no terceiro dia pós-parto teve seu leite analisado, no quarto dia foi encontrado 850.000 cópias / mL nessa amostra. As partículas replicaram em cultura de células Vero, atingindo 30.000.000 cópias / mL. Os resultados da amostra de sangue recém-nascido foram ambíguos e não é claro se a criança desenvolveu a doença (87).

Outro trabalho sugerindo transmissão vertical do vírus Zika ocorreu após a descoberta do RNA do vírus em amostras de líquido amniótico de duas gestantes do estado da Paraíba cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia. As amostras foram obtidas por amniocentese transabdominal guiada por ultrassonografia às 28 semanas de gestação (88). Este achado sugeriu que o vírus pode atravessar a barreira placentária, ter tropismo por células neuronais fetais, alterar a neurogênese e induzir danos neurológicos. (45) (88).



O RNA viral também foi detectado em tecidos cerebrais de dois recém-nascidos que não sobreviveram depois do nascimento, no Brasil. Antígenos virais foram detectados em células mononucleares no tecido cerebral de um destes recém-nascidos, um resultado que também sugere invasão viral das células imunitárias do hospedeiro (89).

### **1.5 Patogênese**

Os dados sobre a patogênese do vírus Zika são escassos. A transmissão mediada pelo vetor do vírus é iniciada quando um mosquito fêmea de *Aedes* se alimenta de sangue e injeta o vírus na pele do seu hospedeiro mamífero, seguido pela infecção de células permissivas através de receptores específicos. Na verdade, as células imunitárias da pele, incluindo fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas, foram todas consideradas permissivas para a infecção pelo vírus Zika. Os resultados também mostram um papel principal para o receptor de fosfatidilserina AXL como um receptor de entrada do vírus e para autofagia celular no aumento da replicação de ZIKV em células permissivas. A replicação do vírus Zika leva à ativação de uma resposta imune inata antiviral e a produção de interferon do tipo I em células infectadas. As células T são ativadas durante a fase aguda da febre Zika (Th1, Th2, Th9 e Th17) (61).

### **1.6 Manifestações clínicas**

As infecções pelo ZIKV geralmente são assintomáticas, mas quando sintomáticas, apresenta um quadro clínico manifestando-se principalmente por febre baixa, exantema maculopapular, geralmente pruriginoso, hiperemia conjuntival e artrite ou artralgia. Outros sinais e sintomas como cefaleia, dor retro-orbital, mialgia, edema das extremidades e vômitos podem aparecer (5) (88) (90) (91) (92). Normalmente a infecção pelo vírus é autolimitada, no entanto o aparecimento de síndromes neurológicas e autoimunes já foram associadas à infecção por ZIKV (17) (93).

#### **1.6.1 Complicações neurológicas**

Infecções por arbovírus e flavivírus, algumas vezes podem levar a quadros agudos auto-imune como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e polirradiculoneuropatia. A SGB caracteriza-se por parestesia de membros superior / inferior, ascendente fraqueza muscular e paralisia, que pode evoluir para doenças respiratórias, dificuldades de deglutição e morte. Os déficits sensorio-motor são simétricos e bilaterais (17). A SGB é complexa, envolvendo os receptores do tipo Toll, a produção de citocinas pró-inflamatórias, com atividade

mielinotóxica, as respostas imunes mediadas por células com a ativação de células T citotóxicas, produção de auto-anticorpos e ativação do complemento (94).

O primeiro relato da associação entre a infecção pelo vírus Zika e SGB foi relatado na Polinésia Francesa, em 2013 (17) em uma mulher que tinha febre, erupção cutânea e conjuntivite sete dias antes de evoluir para o quadro de desordem desmielinizante difusa levando a internação e confirmação da síndrome. Antígenos virais não foram detectados, nem anticorpos neutralizantes, mas imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) contra DENV e ZIKV estavam presentes o que pode ser uma das causas desta síndrome (95).

Um aumento na incidência de SGB foi observado à medida que o surto de infecção pelo vírus Zika na Polinésia progrediu, com uma incidência estimada de 0,24 casos / 1.000 infecções. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (74%), com idades entre 36-56 anos, com sintomas neurológicos em rápido progresso a partir do sexto dia. Foram detectados IgM ou IgG anti-Zika e anticorpos neutralizantes contra o vírus Zika em 98% e 100% dos pacientes, respectivamente. Nenhum dos pacientes com a síndrome tinha presença de RNA do vírus detectados por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), enfatizando não só o curto período de viremia da infecção, mas também a natureza auto-imune de SGB (96) (97).

Em julho de 2015, 4 meses após a confirmação da circulação do ZIKV no Brasil, o diagnóstico de SGB foi confirmado em 42 (55%) de 76 pacientes do Estado da Bahia, com 26 (62%) pacientes declarando ter tido os sintomas da doença (18). Segundo a OMS, até o final 2016, o aumento da incidência de SGB esteve presente em 13 países com circulação de vírus Zika nas Américas (18). No Brasil, foram relatados 1.708 casos de janeiro a novembro de 2015, com uma alta incidência registrada em Alagoas (516,7%), Bahia (196,1%), Rio Grande do Norte (108,7%), Piauí (108,3%), Espírito Santo (78,6%) e Rio de Janeiro (60,9%). Na América Latina, não se pode afirmar que as infecções por ZIKV foram responsáveis pela maioria dos casos de SGB, pois muitos deles não foram confirmados laboratorialmente, e deve-se lembrar de que muitos desses países estão experimentando a circulação simultânea de outras arboviroses que também podem causar SGB (13) (18) (73) (98) (99).

Nas Américas, um aumento da SGB tem sido relatado em três países (93). Em El Salvador, de 22 casos investigados em dezembro de 2015, 54% também apresentaram sintomas compatíveis com a febre Zika anterior a SGB. Na Venezuela, foi registrado um aumento de 2 a 3 vezes em relação à média anual nacional. Finalmente, um primeiro caso de

SGB possivelmente associado à infecção por ZIKV foi relatado pelo Ministério da Saúde francês na Martinica (93). Coletivamente, esses dados epidemiológicos reforçam a hipótese de uma relação entre ZIKV e GBS.

Além disso, foi relatado um caso de mielite transversa em um adolescente mexicano nove dias após o início dos sintomas da infecção (101). Foi detectado na urina, soro e fluido cefalorraquidiano do paciente um elevado número de cópias de RNA do vírus Zika. Observações semelhantes foram feitas em pacientes com febre de dengue no Brasil (102).

### **1.6.2 Microcefalia e síndrome congênita**

Após a confirmação dos primeiros casos de ZIKV no Brasil, em maio de 2015, inicialmente no Nordeste, houve uma rápida disseminação do vírus a outras regiões do país, seguido pelo aumento significativo de notificações de recém-nascidos com microcefalia no Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos do Brasil (SINASC), resultando em 141 casos suspeitos de microcefalia, em novembro de 2015, no estado de Pernambuco. Posteriormente, um número excessivo de casos em outros estados do Nordeste (Paraíba e Rio Grande do Norte) foi detectado, além de registros de abortos e natimortos. Confrontado com este novo cenário, o Ministério da Saúde do Brasil declarou o evento como uma emergência de saúde pública de preocupação nacional em 11 de novembro de 2015 em resposta às crescentes preocupações sobre a possível associação entre o ZIKV e a microcefalia do recém-nato (16). Outros três alertas foram emitidos, um pela OPAS dias depois, em 17 de novembro, pelo ECDC em 24 de novembro (103) e um novo, no dia 1º de dezembro, pela OPAS (PAHO, 2015-Epidemiologic alert). O aumento no número de casos foi 20 vezes maior do que o número esperado, com 1248 casos relatados (59). No Brasil, no final de janeiro de 2016, 3.893 casos de microcefalia já tinham sido relatados desde outubro de 2015 (104). Os casos relatados têm origem em 21 estados e 724 municípios do país (93). Em fevereiro de 2016, a OMS declarou uma emergência de saúde global (105).

Após estudo retrospectivo na Polinésia Francesa, autoridades de saúde relataram 17 casos de malformações do sistema nervoso central (SNC), incluindo microcefalia, em recém-natos coincidentes com o período de surto de ZIKV na Polinésia. Até a realização do estudo, o número médio anual de casos de malformação em SNC neste país era de apenas um caso. (93) (103) (106).

A relação virológica e dados epidemiológicos favoreceram a hipótese de causa e efeito entre ZIKV e microcefalia. RNA do vírus foi detectado no líquido amniótico de duas

gestantes da Paraíba com histórico de doença exantemática e fetos com microcefalia detectados na ultrassonografia fetal (107). A partir desse relato, estudos adicionais foram feitos, possibilitando o sequenciamento completo do vírus isolado do líquido amniótico. A análise filogenética revelou que o vírus compartilha 97-100% da sua identidade genômica com a linhagem asiática isolada no surto da Polinésia Francesa e que a presença do genoma viral nos pacientes por algumas semanas após a fase aguda sugere que a carga viral intrauterina resulta da replicação persistente (88). Soma-se a essas evidências a identificação do genoma do ZIKV em células da placenta em um aborto na 8ª semana, por meio de técnicas de RT-PCR em tempo real, o que reforça o potencial da transmissão placentária (106).

Um estudo realizado por Mlakar e colaboradores demonstrou o neurotropismo do ZIKV e a sua detecção no tecido cerebral (45). Um estudo envolvendo dois abortos e dois recém-natos microcéfalos no Brasil, com alterações histopatológicas limitadas ao cérebro apresentaram resultados semelhantes reforçando o neurotropismo do vírus. A presença do vírus no tecido cerebral foi confirmada por RT-PCR e imunohistoquímica (89).

Outras evidências estão sendo observadas sobre outros órgãos, além do cérebro, sendo alvo do vírus Zika. A presença de alterações oculares em bebês com microcefalia como atrofia macular (108), lesões maculares e perimaculares com atrofia do nervo óptico durante o surto de ZIKV em Salvador, Bahia (109) e recentemente danos graves na retina de recém-nascidos em São Paulo, com síndrome congênita de Zika levaram à cegueira desses bebês (110).

Não podemos ignorar a possibilidade de que a microcefalia seja apenas a primeira evidência relacionada com a infecção pelo ZIKV e que outras complicações, graves ou não, possam acometer outros órgãos que não apenas o cérebro pelo fato de terem sido relatas complicações oftalmológicas e auditivas em recém-nascidos afetados pelo vírus (108) (111).

Microcefalia não é uma doença propriamente dita, mas sim um alerta de destruição ou déficit do crescimento cerebral, podendo ser classificada como primária (de origem genética, cromossômica ou ambiental, incluindo infecções) ou secundária, quando resultante de evento danoso que atingiu o cérebro em crescimento, no fim da gestação ou no período peri e pós-natal. As sequelas da microcefalia vão depender da sua etiologia e da idade em que ocorreu o evento, sendo que, quanto mais precoce a afecção, mais graves serão as anomalias do sistema nervoso central (112). No caso da síndrome da Zika congênita, parecem ocorrer alterações cerebrais também nos segundo e terceiro trimestres da gestação (113) (114). A microcefalia

congenita pode desenvolver diversas alterações, sendo as mais frequentes a deficiência intelectual, paralisia cerebral, epilepsia, dificuldade de deglutição, anomalias dos sistemas visual e auditivo, além de distúrbio do comportamento (TDAH e autismo) (115). Apesar de ainda serem escassos os conhecimentos sobre a evolução natural da doença e sua patogenia, as evidências atuais são fortes o suficiente para estabelecermos a relação causal entre a infecção pelo ZIKV durante a gravidez, em especial no primeiro trimestre e não necessariamente sintomática, e o aumento da frequência de abortos, natimortos e mortalidade precoce, além da microcefalia (45) (88) (107) (116) (117). Um estudo de coorte realizado em 1501 bebês no Brasil demonstrou que as mães de alguns desses bebês tiveram sinais clínicos consistentes com a infecção por vírus Zika durante a gravidez, mas a maioria não fez teste diagnóstico para comprovar a infecção (118).

Ao exame físico dos recém-nascidos com síndrome da infecção congênita pelo ZIKV, chama atenção a microcefalia, geralmente grave, com importante desproporção craniofacial. Outras dismorfias, como acentuada protuberância óssea occipital, fontanelas fechadas ao nascer, excesso de pele e/ou dobras de pele no escalpo, além de hérnia umbilical são frequentemente observadas (119).

Entre as anormalidades neurológicas observadas destacam-se a hipertonia global grave com hiperreflexia, irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbio de deglutição, além de respostas auditivas e visuais comprometidas. Algumas crianças apresentam crises convulsivas já no período neonatal, e observou-se um aumento da frequência destas crises durante o seguimento, sendo a ocorrência de crises epilépticas mais evidentes a partir dos três meses de idade e os espasmos epilépticos o tipo mais comum (119).

Ainda são escassos os conhecimentos sobre essa nova síndrome, tanto sobre sua evolução natural, como dos seus fatores de risco ou associados. Desconhecemos a frequência de abortos e morte fetal ou neonatal, assim como todo o espectro de comprometimento das crianças afetadas e o grau de gravidade prognóstica das mesmas. Pela complexidade dos casos, a assistência desses bebês deve ser realizada por equipe multidisciplinar. Diante do impacto familiar, é recomendável apoio psicológico e social a essas famílias. Garantir essa assistência no Sistema Único de Saúde (SUS) é o desafio do momento.

## **1.7 Resposta Humoral a Flavivirus**

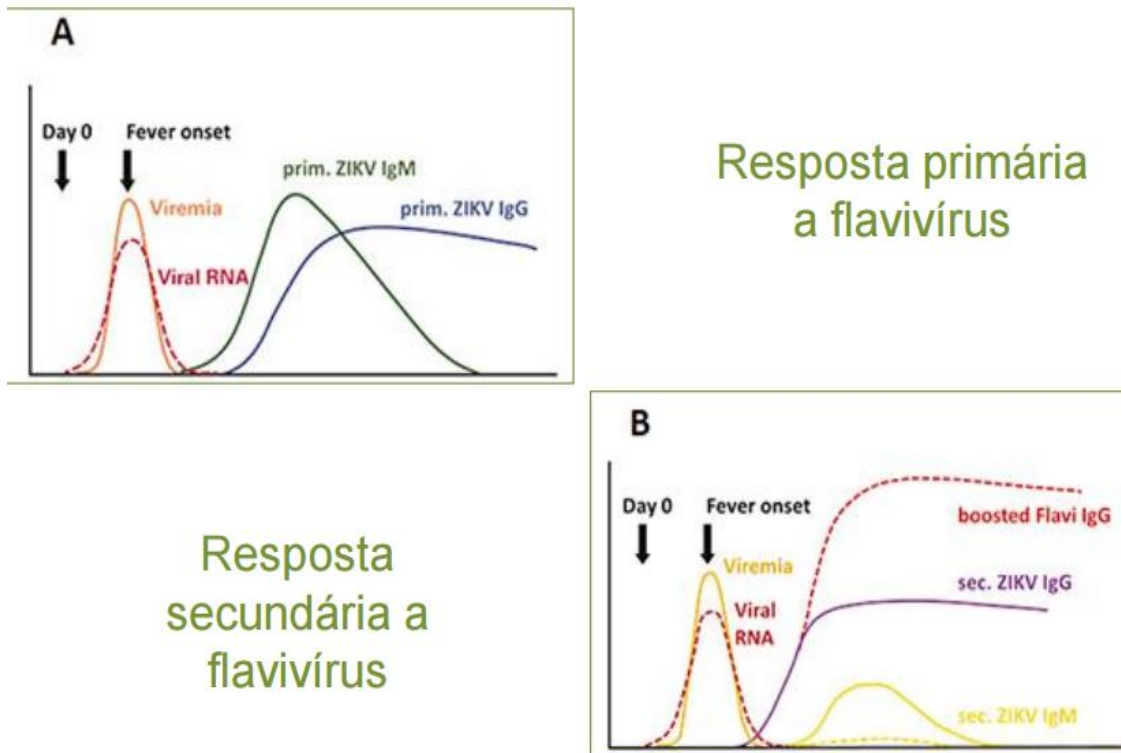
Nos casos de Dengue, a viremia atinge seu pico logo após o aparecimento dos primeiros sintomas, muitas vezes antes mesmo do paciente buscar atendimento nos serviços de saúde. Vírus circulantes permanecem, no entanto, detectáveis geralmente até o quinto dia de doença, coincidindo com o período em que os níveis de anticorpos começam a elevar-se (120).

O isotipo dominante de imunoglobulina em uma infecção primária é a IgM. Cerca de 8% dos pacientes apresentam níveis detectáveis de IgM já nos primeiros dias de doença (principalmente no segundo dia de doença), enquanto a maioria encontra-se presente no sexto dia após o aparecimento dos primeiros sintomas (121). Os níveis de IgM aumentam rapidamente e atingem seu pico por volta de duas semanas, permanecendo detectáveis por 2 a 3 meses, sendo considerado como indicador de infecções recentes (121) (122).

Em uma resposta primária, anticorpos IgG começam a aparecer a partir do quinto dia de doença. Os títulos de IgG aumentam lentamente a partir da primeira semana de infecção e permanecem detectáveis por toda a vida.

Uma população com imunidade prévia ao DENV desenvolve uma resposta secundária caracterizada pelo rápido aumento no título de IgG após o início dos sintomas e pelo alto grau de reação cruzada, mesmo contra outros Flavivirus, apresentado por esses anticorpos (123). Os níveis de IgM na resposta secundária são consideravelmente mais baixos do que na resposta primária. A relação entre os títulos de IgM e IgG e a especificidade dos anticorpos pode ser, portanto, usados na caracterização de respostas primárias e secundárias para DENV (124).

No esquema abaixo um esquema da cinética da resposta de ZIKV, que ainda não é bem conhecida mas pela experiência diagnóstica, se parece um pouco com a resposta dos flavivirus onde na infecção primária a viremia é alta nos primeiros 5 dias de doença (detecção de RNA) e anticorpos IgM aparecem a partir do 5º dia. O IgG aparece mais tardiamente (15º). Na infecção secundária, a viremia não muda muito, mas a resposta de IgG é alta logo nos primeiros dias. O IgM se apresenta em níveis mais baixos e mais tardiamente (Figura 1.6).



**Figura 1.6** - Esquema da cinética da resposta imune a Flavivirus: A) Resposta primária com aparecimento precoce de IgM e tardio de IgG e B) Resposta secundária com aparecimento precoce de IgG e tardio de IgM.

### 1.8 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial é de grande importância porque permite a detecção precoce da instalação de surtos da doença e do agente infeccioso, permitindo a condução de investigações epidemiológicas pertinentes, minimizando desta forma, a expansão de doenças. Existe atualmente um esforço científico global para obter uma melhor compreensão do vírus Zika, seus vetores, modos de transmissão e história natural da doença. A chave para este esforço é ter um diagnóstico preciso da infecção pelo vírus Zika; entretanto, os testes disponíveis são limitados por vários fatores (125). Além dos aspectos clínicos inespecíficos da infecção por ZIKV, o diagnóstico laboratorial é um fator desafiante por conta da baixa viremia e reatividade cruzada de anticorpos anti-ZIKV com outros flavivírus (53).

É importante salientar que a infecção pelo vírus Zika pode provocar sinais e sintomas semelhantes aos observados em doentes com outro vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus), incluindo vírus da dengue, um flavivírus relacionado, e vírus Chikungunya, um alfavírus não relacionado. É também importante notar que um resultado positivo para um destes vírus não se opõe a infecção com os outros. Co-infecção com o vírus Zika e vírus da dengue ou chikungunya é raro, mas possível (77) (126) (127). As características clínicas da infecção por zika, dengue e chikungunya são bastante parecidas, assim a intensidade de cada

sinal e/ou sintoma pode ajudar a diferenciá-las. Devido à amplitude do diagnóstico diferencial, os dados epidemiológicos também favorecem o levantamento das hipóteses diagnósticas (31). A dengue, pela abrangência no território nacional, é um dos principais diagnósticos diferenciais a ser realizado. Por apresentarem geralmente quadros de febre, mialgias e cefaleia mais intensos que nas infecções por ZIKV, as infecções por dengue também podem ser associadas a quadros hemorrágicos. Ao contrário da infecção por ZIKV, a infecção por dengue tipicamente não está associada à conjuntivite e edema de extremidades. Os quadros de exantema nas infecções por ZIKV normalmente são mais exacerbados. Além disso, as infecções por chikungunya normalmente se apresentam com dor nas articulações relativamente intensa (podem ser até incapacitantes) afetando as mãos, pés, joelhos e costas, ao contrário do observado em ZIKV. Hepatomegalia normalmente só é observada nas infecções por chikungunya (91) (128). Outras doenças exantemáticas devem ser consideradas dependendo da clínica e da procedência geográfica do paciente. Os métodos moleculares e imunológicos são importantes na questão da especificidade do diagnóstico. A seguir alguns métodos de detecção do vírus Zika e de outros flavivirus associados.

### **1.8.1 Isolamento Viral**

O isolamento viral é considerado o “padrão ouro” para comparação com outros métodos, uma vez que é a evidência direta da infecção viral, capaz de diagnosticar o vírus durante a fase aguda da doença, quando os títulos de anticorpos ainda não atingiram níveis detectáveis.

Isolamento de ZIKV a partir de amostras de soro de macaco e *Aedes africanus* foi realizado pela inoculação em cérebro de rato (1). Os métodos de isolamento subsequentes utilizados incluem inoculação em embrião de galinha, sacos alantóicos e membrana corioalantóide, bem como culturas de células (129) (130).

A inoculação do soro, coletado na fase aguda, em linhagens celulares de mosquito, tais como *Aedes albopictus* (C6/36), *Aedes pseudoscutellaris* (AP61) é comumente empregada para o isolamento do vírus dengue (131). Atualmente, o isolamento viral com linhagem de células C6/36 de *Aedes albopictus* tem sido o método de escolha, por sua facilidade de manutenção e sensibilidade (132) (133).

O isolamento pode ser observado pela presença do efeito citopático (ECP), no entanto algumas amostras podem produzir discreto ou nenhum ECP, sendo por isso indicada a confirmação da presença do vírus através do teste de imunofluorescência que, no caso de



dengue, também é utilizado para identificar o sorotipo utilizando-se anticorpos monoclonais sorotipo-específicos (DENV-1 a 4) (134) (135).

O ZIKV foi então isolado por inoculação intratorácica nos mosquitos *Toxorhynchites splendens* e posteriormente em células C6/36 com soro do doente (21). ZIKV foi cultivado com sucesso a partir de sangue humano (6), sêmen (82) e urina (30). Embora não tenha sido isolado no leite materno, foi detectado por RT-PCR (86). O isolamento de vírus é de particular importância para determinar os caracteres fenotípicos do vírus (136). Se não estiverem disponíveis vírus infecciosos, não é possível realizar alguns testes sorológicos, tais como ensaios de neutralização cruzada ou testes de competência de vetor.

### **1.8.2 Detecção molecular**

A amplificação de flavivirus é uma técnica realizada em dois passos pelo fato desses vírus serem de RNA. A transcrição reversa de RNA genômico em DNA de cadeia de simples (DNA complementar) seguido pela conversão em DNA de cadeia dupla e amplificação podem ser executados em uma mesma reação (137).

A PCR em tempo real renovou o conceito de amplificação por PCR tornando a técnica muito mais rápida e eficiente do que a PCR convencional. Esta técnica combina a amplificação por PCR com uma sonda fluorescente e a detecção do produto amplificado no mesmo ensaio (138). Utiliza primers e sondas específicas para o vírus em uma região conservada do genoma. O uso da fluorescência, na sonda, permite a detecção dos produtos, conforme eles são produzidos, ou seja, em tempo real, sem a necessidade da eletroforese (139).

Na detecção molecular de ZIKV podem ser utilizadas duas estratégias: a detecção de RNA de flavivirus, que requer testes adicionais para identificação de qual flavivirus foi amplificado e a detecção específica de RNA de ZIKV.

Os ensaios de RT-PCR com primers e sondas permitem a detecção de novos flavivírus ou variantes de flavivírus conhecidos, mas por vezes carecem de sensibilidade. Por exemplo, o RT-PCR de flavivirus não amplificou o RNA de ZIKV a partir de soro de um paciente doente. Quando utilizado o primer específico de ZIKV, o RNA foi detectado (29). Em geral, os protocolos de detecção molecular utilizam a parte terminal do gene que codifica NS5 ou a porção 3' do genoma dos flavivirus por conta dessa região ser altamente conservada no genoma (140).

ZIKV foi detectado com sucesso em ensaios de RT-PCR para flavivirus utilizando o gene que codifica a proteína E (141), o gene que codifica a proteína não-estrutural NS1 (142), a proteína não-estrutural NS3 (143) e a proteína não-estrutural NS5 (144) (145).

Após a detecção de RNA de Flavivirus, a identificação ao nível de espécie requer testes adicionais. Vários métodos podem ser utilizados, incluindo RT-PCR com primers específicos para cada espécie. Além dos primers são necessários conjuntos específicos de sondas e controles positivos para todos os flavivírus predominantes na região (141); ELISA (teste imunoenzimático) para detecção de amplificado, o DNA digoxigenina-modificada (146); hibridação (147) e sequenciamento de ácidos nucleicos. O sequenciamento é agora o método de escolha para identificação ao nível da espécie, porque está disponível na prática rotineira na maioria dos laboratórios moleculares. Protocolos de RT-PCR utilizando primers e sondas específicos para ZIKV têm sido desenvolvidos utilizando como alvo o gene que codifica o envelope (148), a junção da membrana do invólucro (codifica-E do gene M), o envelope parcial (PE) gene codificante e o gene que codifica NS5 (149) (150). O protocolo desenvolvido por Lanciotti e colaboradores foi projetado para detectar a cepa Yap ZIKV 2007. Mesmo que RT-PCR seja muito sensível, resultados falso-negativos em comparação com os de cultura têm sido relatados (149). Além disso, ZIKV RT-PCR não é capaz de detectar a diversidade genética e distribuição geográfica de todas as estirpes ZIKV (149). Como os primers e sondas disponíveis foram criados com base apenas em algumas sequências do genoma, as novas sequências ZIKV disponíveis devem ser rapidamente depositadas no GenBank para assegurar que o protocolo possa detectar a estirpe circulante. Os kits comerciais para ZIKV RT-PCR já estão disponíveis, mas principalmente para uso em pesquisa.

### **1.8.3 Diagnóstico em fluidos corporais**

Convencionalmente, o diagnóstico da grande maioria dos arbovírus é realizado em amostras de soro ou plasma. A utilização de sangue venoso é fundamental para a realização de praticamente todos os ensaios de diagnóstico para vírus. Embora relativamente simples, em se tratando de um ambiente clínico, a coleta de material clínico exige profissionais treinados, insumos e equipamentos, processamento e armazenamento, representando um problema para locais mais remotos e com pouca infraestrutura. A flebotomia é invasiva, dolorosa e pode representar um desafio a mais para o Programa de Vigilância e os serviços de saúde pública. Neste contexto, a coleta de amostras como saliva e urina por serem menos invasivos e mais fáceis de coletar, pode ser uma alternativa mais satisfatória e conveniente à coleta de sangue venoso, principalmente em determinadas populações, como recém-nascidos, crianças, idosos, indivíduos febris ou ainda, em estudos epidemiológicos de vigilância em voluntários saudáveis por permitir acesso fácil a populações fora do ambiente clínico (151).

Relatos na literatura demonstram a utilização da urina como uma fonte de detecção de RNA viral de ZIKV por mais de 15 dias após o início da doença pela técnica de RT-PCR em tempo real (152). Outros flavivirus como DENV e Oeste do Nilo (WNV) também foram detectados em urina (153) (154). De acordo com a literatura, pode se detectar RNA do vírus Zika em urina de viajantes retornando a seus países, tais como Nova Caledônia (152), Polinésia Francesa (86) (20), Japão (24) e Finlândia (60). ZIKV foi isolado a partir da urina após a viremia diminuir para níveis indetectáveis. Fluidos orais contêm saliva pura, proveniente das glândulas salivares, e fluido crevicular, que é um transudado do plasma derivado do leito capilar abaixo da margem dente-gengiva (155). A obtenção da saliva é simples, indolor, não invasiva e tem sido usada para detectar anticorpos e ácidos nucleicos específicos de patógenos em uma série de infecções virais, como Sarampo, Rubéola, Parvovírus B19 e Hepatites A e B (Nokes et al, 2001). Um estudo de incidência de DENV em uma comunidade comparando saliva com o plasma descreve uma sensibilidade e especificidade de 82% e 81% para saliva em comparação com o plasma (156). Amostras de sangue e saliva foram coletadas simultaneamente de pacientes durante o surto na Polinésia Francesa (20). O ZIKV foi mais frequentemente detectado na saliva em comparação com o sangue. Entre 182 pacientes que tiveram ambas as amostras coletadas o ZIKV foi detectado na saliva em 35 (19,2%) e não detectável no sangue enquanto que em 16 (8,8%) foi detectado somente no sangue e não detectado na saliva. A diferença no tempo mediano após o início dos sintomas (três dias) e a frequência dos sintomas em pacientes positivos apenas pelo sangue ou pela saliva não foi significativo (20). O uso de uma amostra de saliva complementar a do soro aumentou a taxa de detecção molecular de ZIKV na fase aguda da doença, mas não ampliou a janela de detecção de RNA do vírus, nem foi relacionada com as manifestações clínicas dos pacientes. A saliva foi interessante quando o sangue era difícil de coletar, especialmente em crianças e recém-natos.

O diagnóstico de Zika geralmente depende da detecção de RNA do vírus no sangue durante os primeiros dias após o início dos sintomas. Entre as amostras de 748 soros colhidas durante o surto da Polinésia Francesa (20), o tempo médio entre o início dos sintomas para um exame de sangue positivo foi de três dias. Os doentes podem ser virêmicos até 10 dias antes do início dos sintomas, como relato de um estudo de doadores de sangue assintomáticos (78). A carga viral no sangue de pacientes sintomáticos variou em alguns estudos de  $7,28 \times 10^6$  para  $9,3 \times 10^8$  cópias/mL (53) (86) e de  $2,5 \times 10^3$  para  $8 \times 10^6$  (média de  $7,2 \times 10^5$ ) cópias/mL em doadores de sangue assintomáticos (157).

No sêmen, a carga viral de Zika variou de  $1,1 \times 10^7$  a  $2,9 \times 10^7$  cópias/mL (20). No leite materno variou de  $2,9 \times 10^4$  a  $2 \times 10^6$  cópias/mL (86).

Amostras de leite materno de duas mães foram inoculadas em células Vero para detectar replicação de ZIKV e também foram testadas por RT-PCR durante surto na Polinésia Francesa. As amostras deram resultados positivos por RT-PCR, mas não foram detectadas partículas de ZIKV replicativas em cultura de células (86).

No líquido amniótico também foi detectado o genoma do Zika de duas gestantes. O vírus não foi detectado nem na urina nem no soro dessas gestantes (88).

#### **1.8.4 Diagnóstico sorológico**

A sorologia de ZIKV é normalmente realizada por meio de ELISA com confirmação por teste de neutralização por redução de placas (PRNT) de acordo com protocolos padrão (158) (159). Testes imunoenzimáticos são muito utilizados para o diagnóstico de flavivirus, devido a praticidade, especificidade e sensibilidade. Detectam anticorpos da classe IgM e IgG e antígenos NS1. Atualmente já existem três testes sorológicos comerciais em processo de validação para ZIKV nas agências reguladoras FDA EUA (United States Food and Drug Administration Emergency Use Authorization), CE/IVD (Conformité Européene/in Vitro Diagnostic) e aprovado pela ANVISA (106). O PRNT é o "padrão ouro" para diferenciação de anticorpos anti- flavivirus (160), porque é relativamente específico em infecções primárias de flavivirus (sem infecção prévia com outro Flavivirus) (161). O PRNT, no entanto, é feito apenas em laboratório altamente especializado, é caro e pode exigir laboratórios regulamentados devido à manipulação de vírus vivos. Novos protocolos que utilizam vírus recombinantes (162) ou partículas de vírus recombinantes (159) foram desenvolvidos, mas ainda não estão disponíveis para ZIKV. Os inquéritos sorológicos arbovirais realizados na Polinésia Francesa foram feitas por ELISA indireto com antígenos recombinantes (163) (164).

A maior experiência do diagnóstico de infecções pelo ZIKV por sorologia foi o ensaio de amostras de soro colhidas durante o surto de ZIKV no Estado de Yap (53). Análises sorológicas de pacientes infectados foram realizadas com ELISA anti-IgG e anti- IgM para ZIKV para diferenciar infecção primária e secundária. A confirmação foi feita pela técnica de PRNT para ZIKV, DENV, YFV, vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite do Murray Valley, WNV, e vírus da encefalite de St. Louis (53). Anticorpos anti-IgM contra ZIKV (ELISA) reagiram de forma cruzada com outros flavivírus, mas não com alfavírus, tais como o vírus Ross River ou CHIKV (5). Em infecções primárias por Flavivirus, a resposta de anticorpos IgM foi específica para ZIKV, mesmo sendo observado um grau limitado de reação cruzada com outros flavivírus, mas com PRNT altamente específica. Em contraste, na infecção secundária foi observado um elevado grau de reação cruzada com outros flavivírus tanto com anticorpos anti-IgM (ELISA) e pela técnica de PRNT (53). Critérios sorológicos

para confirmar a infecção por vírus Zika durante o surto nas ilhas Yap incluíram um exame positivo anti-IgM para ZIKV (ELISA), títulos  $\geq 20$  por PRNT e proporção  $\geq 4$  entre ZIKV/DENV também por PRNT (5).

Em caso de suspeita de Zika em uma população onde outros flavivírus são endêmicos, o diagnóstico sorológico é difícil de interpretar porque o alto grau de reações cruzadas nos ensaios IgM e IgG pode levar a resultados falso-positivos. Durante o surto na Polinésia Francesa, o diagnóstico sorológico de Zika não foi implementado por estar ocorrendo simultaneamente um surto de DENV-1 e DENV-3 e mais de 80% da população adulta tinham anticorpos para, pelo menos, um sorotipo dos DENV (157) (164). Se o risco de reações cruzadas com outros flavivírus é alto na população adulta com provável infecção anterior por flavivirus, o risco pode ser baixo para os novos imigrantes de áreas onde Zika não é endêmica, para os turistas e para as crianças. Todos os resultados sorológicos devem ser interpretados em relação ao estado do paciente. Theiler e Casals demonstraram que uma infecção por flavivirus resultou em um aumento dos anticorpos heterólogos a outros vírus do mesmo grupo (165). A imunização com a vacina de febre amarela não produz anticorpos contra ZIKV (166). Estes resultados realçam a necessidade de confirmação de pelo menos alguns casos durante os surtos por isolamento molecular e / ou viral.

### **1.8.5 Detecção em tecidos pós-mortem**

A análise imunohistoquímica com anticorpos monoclonais (167) e RT-PCR (168) podem ser utilizadas para detectar o antígeno do ZIKV em tecidos de autópsia. Esta pode ser de grande utilidade para a detecção do ZIKV em tecidos provenientes de casos de óbitos. Baseia-se na conjugação de marcadores, como moléculas de imunoglobulina, que com auxílio de um substrato específico localiza o antígeno tecidual. Atualmente há disponibilidade de grande número de anticorpos para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em blocos parafina, permitindo o estudo de blocos arquivados por longos períodos, principalmente em casos fatais (169). O diagnóstico de fase aguda da dengue pode ser realizado pela detecção de NS1 no sangue (170), mas este teste ainda não está disponível para ZIKV.

## **1.9 Prevenção e Controle**

Ainda não existe um tratamento específico para combater o vírus. O tratamento sintomático é essencial porque as dores, como a artralgia e cefaleia, constantemente relatadas

pelos pacientes, representam um incômodo bastante presente. É recomendado então que esses sintomas sejam tratados com o uso de paracetamol. Diante de exantema maculopapular, é orientada a administração de medicamentos anti-histamínicos (171). O uso de ácido acetilsalicílico não é recomendado devido ao risco de desenvolvimento da síndrome de Reye em crianças e da possibilidade de ocorrência de complicações hemorrágicas. Os pacientes devem ser aconselhados a beber bastante água, principalmente aqueles que estiverem vomitando (171) (172).

Não há vacina para ZIKV, embora vários estejam em fase de desenvolvimento com a tecnologia da vacina contra a dengue, portanto, são de extrema importância ações que promovam o controle do vetor, evitando sua proliferação. Tais ações são dificultadas por conta das características urbanas e domiciliares do *Aedes aegyptis*, de grande importância epidemiológica no Brasil por ter distribuição geográfica principalmente nas regiões tropicais. O cuidado deve ser adicional nas primeiras horas da manhã e ao final da tarde, período que corresponde ao de maior ocorrência da atividade do mosquito (31). Esses cuidados envolvem o uso constante de repelentes que contenham DEET, IR3535 ou icaridina, o uso de roupas longas e claras, além do uso de mosquiteiros (91). Utilizar telas de proteção é considerada uma medida importante.

A redução da densidade do vetor é essencial para diminuir a possibilidade de transmissão da doença. As ações com esse fim necessitam da adesão tanto das instâncias governamentais e órgãos competentes, quanto da população em geral. Em contrapartida, a sociedade também precisa se mobilizar e eliminar os possíveis focos de *Aedes* presentes nas suas residências (172). Vale ressaltar que devido à possibilidade de transmissão do vírus por outras formas que não através dos vetores (mãe para filho, sexual, transfusão de sangue, transplante e outras sob investigação) é recomendado também implementar medidas de controle e prevenção que considerem estas formas de transmissão (173). A infecção pelo ZIKV passou a ser de notificação compulsória em 2016 devido ao aumento do número de casos e a associação com microcefalia no feto.

## 2. Justificativa

O diagnóstico da grande maioria dos arbovírus é realizado em amostras de soro ou plasma. A utilização de sangue venoso é fundamental para a realização de praticamente todos os ensaios de diagnóstico para vírus. Embora relativamente simples, em se tratando de um ambiente clínico, a coleta de material clínico exige profissionais treinados, insumos e equipamentos, processamento e armazenamento, representando um problema para locais mais remotos e com pouca infraestrutura. A flebotomia é invasiva, dolorosa e pode representar um desafio a mais para o Programa de Vigilância e os serviços de saúde pública. Neste contexto, a coleta de amostras como saliva e urina por serem menos invasivas e mais fáceis de coletar, pode ser uma alternativa mais satisfatória e conveniente à coleta de sangue venoso, principalmente em determinadas populações, como recém-nascidos, crianças, idosos, indivíduos febris ou ainda, em estudos epidemiológicos de vigilância em voluntários saudáveis por permitir acesso fácil a populações fora do ambiente clínico.

O diagnóstico laboratorial tem sido uma ferramenta importante para o manejo clínico do paciente e para a vigilância epidemiológica e, a disponibilidade de diagnóstico rápido, sensível e específico aplicado em amostras de fácil coleta e transporte, pode aprimorar o tratamento do paciente assim como identificar outras doenças que não o ZIKV, melhorando a exatidão nos dados de vigilância.

Considerando a gravidade da situação, especialmente por conta do estado imunológico da população e o risco de propagação da doença em virtude da grande mobilidade populacional e da co-circulação de dois flavivirus estruturalmente semelhantes, DENV e ZIKV, e a ocorrência de reação cruzada entre ambos nos métodos sorológicos, justifica a avaliação da sensibilidade dos testes disponíveis no diagnóstico sorológico para ZIKV e DENV.

Propomos avaliar a sensibilidade do teste molecular utilizando amostras alternativas como urina e fluido oral comparado ao resultado apresentado utilizando o soro. No diagnóstico sorológico, propomos utilizar o teste *in house* MAC-ELISA CDC e Euroimmun para pesquisa de IgM anti-ZIKV, avaliando sensibilidade entre os testes. Sugerimos também determinar se existe reação cruzada nos testes de diagnóstico para dengue utilizando amostras positivas para Zika, melhorando a precisão dos resultados e recomendando ao Ministério da Saúde o melhor teste diagnóstico a ser utilizado frente a nova situação epidemiológica no país. Ainda no âmbito das reações cruzadas, propomos avaliar o teste comercial disponível para anti-ZIKV IgM e IgG com amostras sabidamente confirmadas para os flavivirus circulantes no Brasil e Malária.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar o uso de fluido oral e urina e de métodos sorológicos no diagnóstico laboratorial de vírus Zika

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Aplicar o protocolo de RT-PCR em tempo real para detecção de RNA de ZIKV descrito por Lanciotti e colaboradores (53), em amostras de fluido oral, urina e soro do mesmo paciente, avaliando sensibilidade das amostras alternativas comparadas ao soro;
- Comparar sensibilidade do teste *in house* MAC-ELISA CDC e o teste comercial Euroimmun utilizados na pesquisa de IgM anti-ZIKV e sua concordância;
- Verificar a reatividade de duas marcas de testes comerciais anti-NS1 para DENV contra amostras ZIKV positivas confirmadas por RT-PCR em tempo real;
- Avaliar percentual de reação cruzada do teste IgM anti-DENV da marca Panbio em amostras positivas para ZIKV confirmadas por RT-PCR em tempo real;
- Avaliar o desempenho do teste comercial Euroimmun para pesquisa de anticorpos IgM e IgG de ZIKV frente a soros de pacientes confirmados para dengue, febre amarela e malária;



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações Éticas**

As amostras de urina e saliva utilizadas neste estudo provêm da demanda espontânea do Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Referência Regional para Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika, armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , sem qualquer procedimento adicional para o paciente. O estudo encontra-se dentro dos objetivos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 027/07) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde.

### **4.2 Amostragem**

As amostras de urina, saliva e soro utilizadas neste estudo são provenientes do banco de amostras do Laboratório de Flavivírus, oriundas de pacientes com suspeita de Zika atendidos no Instituto Nacional de Infectologia da Fiocruz (INI/FIOCRUZ) no período de maio de 2015 a março de 2016. As amostras foram coletadas de acordo com o protocolo de coleta do INI e selecionadas de acordo com os dias de doença para cada grupo estudado. Amostras de fase aguda (do primeiro dia de doença até o quinto dia) e fase convalescente (acima de cinco dias de doença).

### **4.3 Coleta de amostras de urina e fluido oral**

As amostras de urina chegaram ao Laboratório acondicionadas em potes plásticos estéreis, mantidas sob refrigeração. Duas alíquotas de 2 mL de urina foram distribuídas em tubos eppendorf e armazenadas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ .

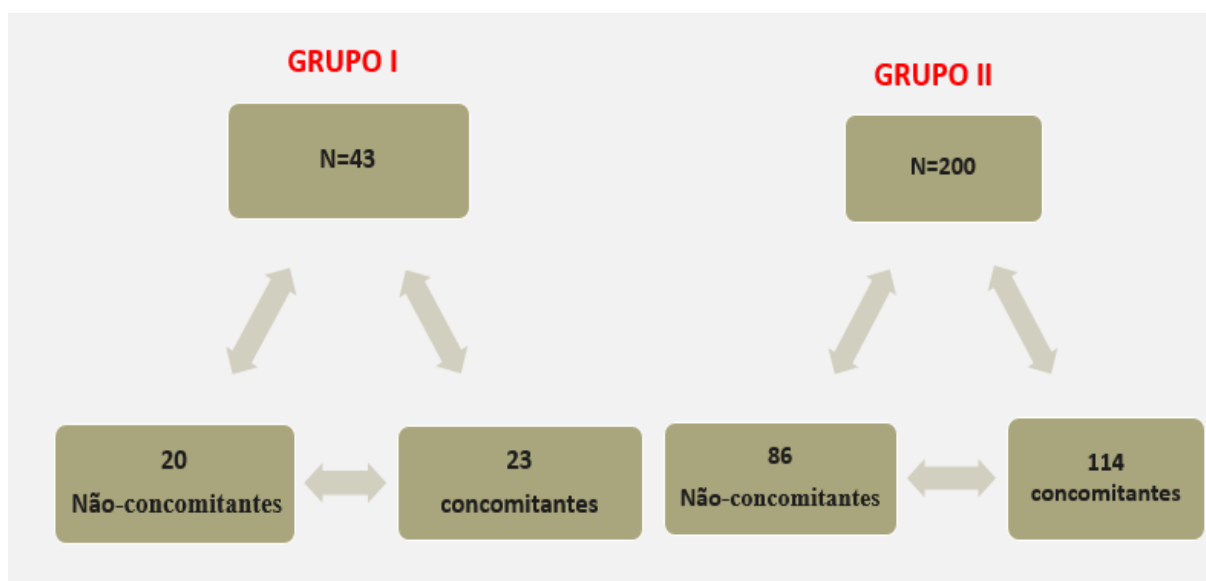
As amostras de fluido oral foram coletadas pela equipe do INI, utilizando o dispositivo de coleta da OraSure® (originalmente fornecido como um dispositivo de coleta oral para testes de HIV) (Epitopo, Inc., Beaverton, EUA). O procedimento de coleta nesse dispositivo consiste numa almofada de algodão pré-tratada com 800  $\mu\text{L}$  de conservantes e reagentes estabilizadores suportados por uma haste plástica. A almofada é colocada contra a lateral da gengiva e mantem a mesma pressionada por dois minutos. O fluido é concentrado no fundo do tubo de plástico e levado ao laboratório. Processamos este material sob centrifugação 1300  $\times g$  a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos e armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  (174).

#### 4.4 Classificação das amostras por grupos

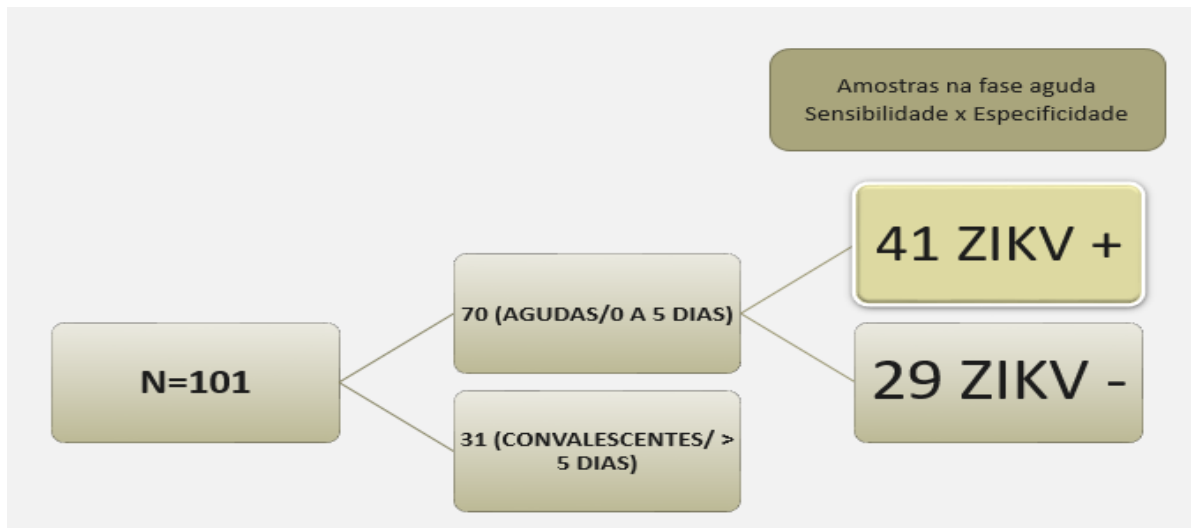
Dividimos as amostras por grupo, de acordo com o tipo e o teste diagnóstico a ser utilizado.

- ✓ Grupo I – Análise molecular: pacientes com coletas concomitantes ou não, de soro, fluido oral e urina;
- ✓ Grupo II - Análise molecular: pacientes com coletas concomitantes ou não de soro e urina;
- ✓ Grupo III - Análise sorológica: soros suspeitos de Zika testados por PCR em tempo real.
- ✓ Grupo IV – soros positivos para ZIKV confirmados por PCR em tempo real e coletados até o terceiro dia de doença para testar especificidade dos testes de NS1 de dengue e soros confirmados de ZIKV, independente do dia de doença para testar também a especificidade do teste Panbio anti-IgM de dengue;
- ✓ Grupo V - soros confirmados por diagnóstico molecular para DENV-1,2,3,4; por diagnóstico sorológico para Febre amarela e diagnóstico de gota espessa para Malária.

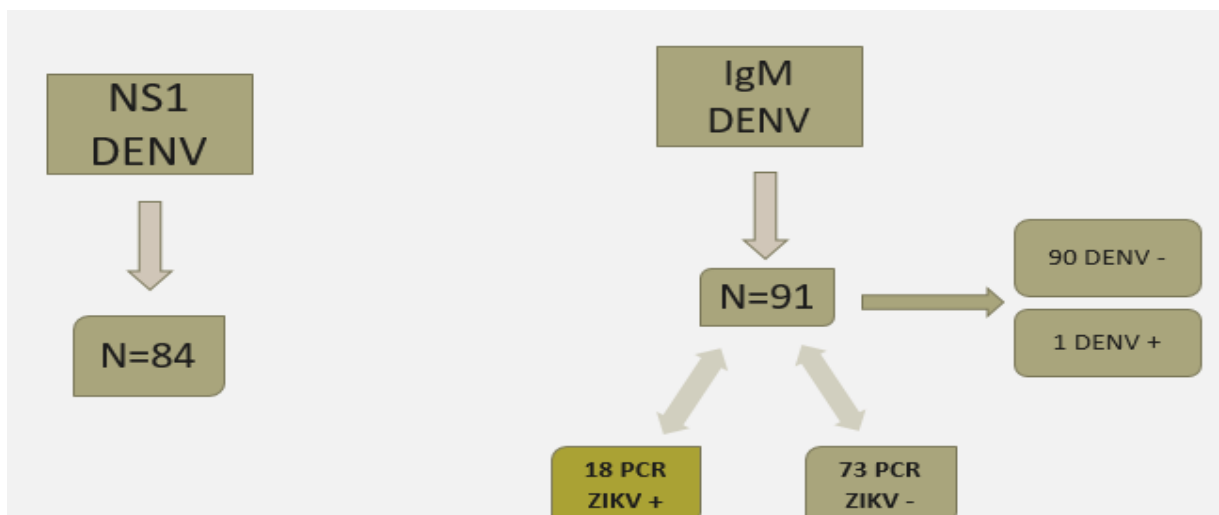
Em relação ao número amostral, cada grupo apresentou um valor, sendo os de análise molecular previamente calculado no programa OpenEpi. Nas figuras 1.7, 1.8, 1.9 e 1.10 estão representados esses dados conforme a análise proposta para cada objetivo:



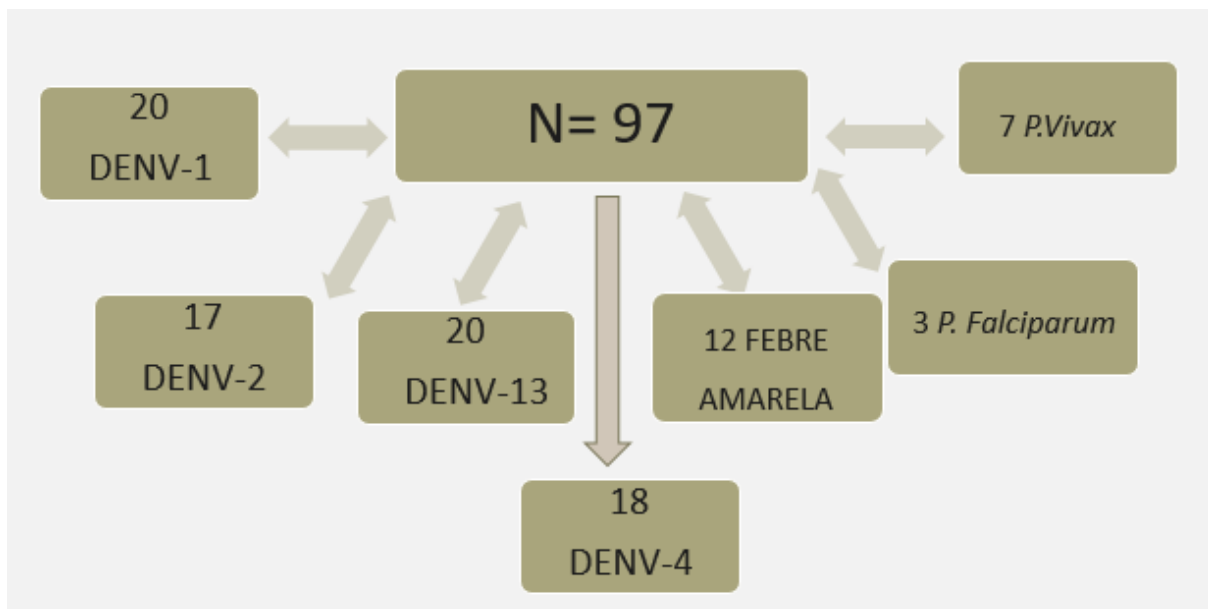
**Figura 1.7** - Distribuição das amostras alternativas utilizando a análise molecular (Grupos I e II).



**Figura 1.8** - Grupo III - Distribuição das amostras da análise sorológica confirmadas para ZIKV por PCR em tempo real. Somente as de fase aguda foram utilizadas para estabelecer sensibilidade e especificidade do teste ELISA Anti-IgM de ZIKV.



**Figura 1.9** - Grupo IV - Distribuição das amostras para análise da especificidade dos testes sorológicos de Dengue. Para pesquisa de antígeno NS1 utilizamos 84 amostras. Na de anticorpos IgM partimos de 91 amostras testadas por PCR para ZIKV e DENV e selecionamos apenas 18 amostras para o nosso estudo.



**Figura 1.10** - Grupo V- Distribuição das amostras para análise da especificidade do teste sorológico anti-IgM e anti-IgG de ZIKV frente a outros flavivírus e ao Plasmodium.

#### **Critérios utilizados para a inclusão e exclusão das amostras**

##### **Inclusão**

- Fichas epidemiológicas sugestivas de infecção por ZIKV para os grupos I, II, III e IV;
- Amostras de urina e fluido oral pareadas com soro recebidas para diagnóstico de ZIKV colhidas até o 20º dia de doença para o grupo I e II;
- Soros suspeitos de ZIKV na fase aguda e convalescente para o grupo III;
- Soros positivos para ZIKV até o terceiro dia de doença confirmado por RT-PCR;
- Soros positivos para Dengue, Febre amarela e Malária para o grupo IV;

##### **Exclusão**

- Amostras com a ficha epidemiológica sem data de início de sintomas e coleta para todos os grupos analisados;
- Amostras negativas para Dengue, Febre amarela e Malária no grupo V;
- Amostras negativas para ZIKV no grupo IV.

## 4.5 Desenho do estudo

Este estudo é do tipo analítico, transversal e observacional.

## 4.6 Metodologias Utilizadas

### 4.6.1 Extração do RNA viral

Os RNAs das amostras de urina, fluido oral e soro foram extraídos através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 4.6.1.a) Procedimento

Em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560 µL de tampão de lise AVL mais 5,6µL de Carrier/AVE com 140µL da amostra clínica. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Foram adicionados 560µL de álcool etílico PA a 100% e a suspensão foi homogeneizada. Um volume de 630µL da mistura foi transferido para uma coluna previamente identificada. Após centrifugação por 1 minuto a 8000 RPM, o eluído do tubo coletor foi desprezado. Novo tubo coletor foi utilizado na coluna e os 630µL restantes da mistura foram transferidos para a coluna. Após nova centrifugação por 1 minuto a 8000 RPM, o novo eluído foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo coletor. Adicionou-se 500µL do tampão de lavagem AW1 e após centrifugação por 1 minuto a 8000 RPM o eluído foi descartado. Adicionou-se 500µL do tampão de lavagem AW2 e após centrifugação por 3 minutos a 1400 RPM o eluído foi descartado. A coluna foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL previamente identificado. Adicionou-se 60µL de tampão de eluição AVE e após centrifugação por 1 minuto a 8000 RPM a coluna é descartada e o RNA armazenado a -70° C.

#### 4.6.2 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando sonda Taqman (RT-PCR) (Lanciotti *et al.*, 2008).

A reação foi realizada conforme protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores em 2008, com concentrações ideais dos iniciadores e sonda determinadas por ensaios de otimização. A sequência e posição dos iniciadores e da sonda do protocolo utilizado esta apresentada na Tabela 1.

**Tabela 4.1:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na síntese de cdna para amplificação dos fragmentos do gene do envelope do ZIKV.

Primer	Posição no genoma	Sequência (5→3)
<b>ZIKV1086</b>	1086-1102	CCGCTGCCCAACACAAG
<b>ZIKV1162c</b>	1162-1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
<b>ZIKV1107-FAM</b>	1107-1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACATCAA

Lanciotti *et al.*, 2008.

Numa microplaca óptica (PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA), de 96 micropoços, foram adicionados 20µl da mistura e reagentes conforme a tabela 2 em cada poço. Logo após, foram acrescentados 5µl do RNA extraído, obtendo assim um volume final de 25µl/ reação. Cada amostra e controles foram aplicados em duplicatas. Após a montagem da placa, coloca-se o filme, do inglês “Optical Adhesive Cover”, (PE Applied Biosystems – Foster City, California, EUA), na parte superior para selagem, logo em seguida é levada em centrífuga de placa, colocando na opção de “spin”, e posteriormente colocada no equipamento LinerGene 9660, para a reação de RT-PCR em tempo real, seguindo os parâmetros de ciclagem disponíveis na tabela 3 e posterior coleta de dados e análise dos resultados.

**Tabela 4.2:** Reagentes utilizados para a reação de RT-PCR em tempo real.

<b>REAGENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>	<b>µL/TUBO</b>
<b>2X Go Taq Probe Master Mix</b>	<b>1X</b>	<b>10</b>
20X Prime Time Mini qPCR assay kit	0,5 µM primer F	
(500nM primers 1086-1162c + 250nM sonda 1107FAM)	0,5 µM primer R 0,25 µM sonda	1
<b>50X GoScript RT Mix</b>	---	<b>0,4</b>
H <sub>2</sub> O (Promega)	---	3,6

**Tabela 4.3:** Parâmetros de ciclagem RT-PCR em tempo real.

<b>ETAPAS</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TEMPO</b>	<b>CICLO</b>
<b>RT</b>	45° C	15 min	1 ciclo
<b>Ativação da DNA polimerase</b>	95° C	2 min	1 ciclo
<b>Desnaturação da dupla fita</b>	95° C	15 seg	45 ciclos
<b>Anelamento (FAM)</b>	60° C	1 min	

#### **4.6.3 Ensaios Imunoenzimáticos para o diagnóstico de ZIKV**

##### **4.6.3.a) ELISA de captura de anticorpos (MAC-ELISA) IgM anti-ZIKV (Protocolo CDC/EUA)**

###### **Princípio da técnica**

O ensaio baseia-se na captura de anticorpos IgM humanos em uma placa de microtitulação com o anticorpo anti-IgM humana-seguido pela adição de antígeno específico de vírus Zika. Os antígenos utilizados para este ensaio são derivados da proteína de envelope do vírus.

###### **Procedimento**

A primeira etapa do ensaio consiste na sensibilização da placa com anticorpo anti-IgM humana, diluída a 1/500, previamente testada, em solução tampão carbonato/ bicarbonato pH 9,6 e incubamos na temperatura de 4°C “*overnight*”. Na próxima etapa, desprezamos a solução presente na placa e seguimos com a fase de bloqueio, na qual utilizamos 150µL de tampão de bloqueio (Leite Gloria/Piracanjuba 5% em PBS Tween 0,5% pH=7,4) e incubamos a placa em câmara úmida por 30 minutos à 37°C. Posteriormente, fazemos a lavagem da placa 5 vezes com tampão de lavagem (PBS Tween 0,5 pH=7,2). Próxima etapa se dá com a adição de 50µL das amostras de soro do paciente e amostras de soro controle positivo e negativo para anti-IgM ZIKV (previamente titulados) diluídos a 1/400 em solução tampão de lavagem. Aplicamos as

amostras em quaduplicata onde uma duplicata testaremos o antígeno viral (ZIKV) e na outra o antígeno normal. Colocamos a placa em câmara úmida e incubamos na temperatura de 37°C por 60 minutos. Repetimos o processo de lavagem e demos continuidade com a adição do antígeno: acrescentamos 50µL/ poço do antígeno viral na diluição ótima, em solução tampão de lavagem e do antígeno normal na mesma diluição do antígeno viral. Colocamos a placa na câmara úmida e incubamos na temperatura de 4°C “overnight”. Prosseguimos com outra lavagem e a adição do conjugado antinflavivírus (6B6C-1) na diluição 1/60, testada previamente, em solução tampão de bloqueio. Colocamos a placa na câmara úmida e incubamos a 37°C por 60 minutos. A última etapa de lavagem é feita 10 vezes. Logo em seguida, colocamos o substrato TMB (tetrametilbenzindina) e protegemos a placa imediatamente da luz. Colocamos a placa em câmara úmida e incubamos por 15 minutos à temperatura ambiente. O desenvolvimento de uma coloração azul intensa caracterizou os poços com reação positiva. Para bloquear a reação, utilizamos uma solução de parada (ácido sulfúrico) onde os poços que desenvolveram a cor azul mudaram para amarela. Após esse procedimento, deixamos a placa por 1 minuto à temperatura ambiente e depois realizamos a leitura no leitor de microplacas de ELISA com filtro de 450 nm. A leitura da densidade óptica (DO) foi comparada com a leitura visual para evitar que problemas no leitor passe despercebidos.

A interpretação dos resultados se dá da seguinte maneira: os controles positivo e negativo são soros humanos selecionados previamente de acordo com seus resultados no próprio teste. (No caso, utilizamos um soro controle cedido pelo Instituto Evandro Chagas). A média da densidade óptica do controle positivo viral dividido pela média do controle negativo viral deve ser maior que 2,0. O ELISA IgM ZIKV será considerado válido quando a razão entre o controle positivo e o negativo apresentarem densidade óptica dentro do padrão esperado. Para interpretação das DO das amostras: as que apresentarem valores de DO maior do que 3,0 serão consideradas positivas. As que apresentarem valores de DO entre 2,0 e 3,0 são consideradas inconclusivas e as que apresentarem DO menor do 2,0 são consideradas negativas.

#### **4.6.3.b) Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura para detecção de anticorpos da classe IgM anti-ZIKV utilizando o kit Zika vírus IgM® Euroimmun**

##### **Princípio da técnica**

Os anticorpos IgM foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgM, utilizando-se o kit Zika Vírus IgM® (Euroimmun). Microplacas de poliestireno cobertas com antígenos puros (proteínas não-estruturais recombinantes do vírus Zika) são usadas na fase



sólida. Se a amostra for positiva, anticorpos específicos no soro diluído se ligam aos antígenos da fase sólida.

### **Procedimento**

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. Diluímos as amostras com diluente próprio do kit (1:101), os controles não são diluídos. Antes de começar o procedimento, aguardar 10 minutos com a amostra já diluída por conta da presença no soro de fatores reumatóides que são absorvidos pelo complexo IgG/IgG anti-humana interferindo no resultado do teste. Colocamos 100 µL das amostras diluídas e dos controles sem diluir. Incubamos a 37°C por 60 minutos. Após incubação, lavamos a placa com tampão de lavagem disponível no kit e posteriormente acrescentamos 100 µL de conjugado, onde os anticorpos ligados são detectados utilizando anticorpos marcados com peroxidase e incubamos por 30 minutos em temperatura ambiente. Lavamos a placa conforme descrito pelo fabricante e adicionamos o cromógeno, que vão tornar os anticorpos visíveis, proporcionando uma reação de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro. A medição fotométrica da intensidade da cor deve ser feita no comprimento de onda de 450 nm (nanômetros) e um comprimento de onda de referência entre 620 nm e 630 nm dentro de 30 minutos após a adição da solução de paragem. Para validação do teste, é necessário que o calibrador resulte numa densidade óptica maior que 0.140 e o controle negativo fique abaixo de 0.070. O cálculo da densidade óptica da amostra é feito dividindo o valor dado na leitura pelo valor do calibrador. Se o resultado for menor que 0.8, a amostra é negativa. Se for maior ou igual a 0.8 até 1.1, a amostra é inconclusiva. Se for maior que 1.1, a amostra é positiva.

#### **4.6.3.c) Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura para detecção de anticorpos da classe IgG anti-ZIKV utilizando o Kit Zika vírus IgG® Euroimmun.**

##### **Princípio da técnica**

Os anticorpos IgG foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgG, utilizando-se o kit Zika Vírus IgG® (Euroimmun). Esta análise é semiquantitativa. Microplacas de poliestireno cobertas com antígenos puros (proteínas não-estruturais recombinantes do vírus Zika) são usadas na fase sólida. Se a amostra for positiva, anticorpos específicos no soro diluído se ligam aos antígenos da fase sólida.

## **Procedimento**

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. Diluímos as amostras com diluente próprio do kit (1:101), os controles não são diluídos e são utilizados . Colocamos 100µL das amostras diluídas e dos controles sem diluir nos poços da placa. Incubamos a 37°C por 60 minutos. Após incubação, lavamos a placa com tampão de lavagem disponível no kit e posteriormente acrescentamos 100µL de conjugado, onde os anticorpos ligados são detectados utilizando anticorpos marcados com peroxidase e incubamos por 30 minutos com temperatura ambiente. Lavamos a placa conforme descrito pelo fabricante e adicionamos o cromógeno, que vão tornar os anticorpos visíveis, proporcionando uma reação de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro. A medição fotométrica da intensidade da cor deve ser feita no comprimento de onda de 450 nm (nanômetros) e um comprimento de onda de referência entre 620 nm e 630 nm dentro de 30 minutos após a adição da solução de interrupção da reação. Para validação do teste, é necessário que o calibrador resulte numa densidade óptica maior que 0.140 e o controle negativo fique abaixo de 0,070. O cálculo da densidade óptica da amostra é feito dividindo o valor dado na leitura pelo valor do calibrador. Se o resultado for menor que 0.8, a amostra é negativa. Se o resultado estiver entre 0.8 e 1.1, a amostra é inconclusiva. Se for maior que 1.1, a amostra é positiva.

### **4.6.4) Captura de antígeno NS1 de Dengue**

#### **4.6.4.a) Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína não-estrutural NS1 do vírus Dengue utilizando o kit NS1 Antigen DX Select™ Focus Diagnostics**

##### **Princípio da técnica**

O ensaio Dengue NS1 é altamente sensível. Ele utiliza um imunoenensaio do tipo sanduíche, de duas fases, amplificado por enzimas para detectar níveis baixos de NS1 no soro.

##### **Procedimento**

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. Para diluir as amostras, controles e calibradores utilizamos 60µL de diluente para as amostras, controles e calibradores e igual volume dos mesmos. Utilizamos os controles negativo, positivos e calibradores em duplicata no teste. Depois colocamos 100µL de amostras, controles e

calibradores pré-diluídos nas cavidades. Cobrimos a placa e incubamos na estufa à 37°C por 60 minutos, em câmara úmida. Após incubação, lavamos a placa 6 vezes com tampão de lavagem.

Adição de conjugado: colocamos 100µL de solução conjugada em todas as cavidades. Cobrimos a placa e incubamos à 37°C por 30 minutos, em câmara úmida.

Lavagem: lavamos a placa 6 vezes com tampão de lavagem.

Adição de substrato: colocamos 100µL de substrato TMB em todas as cavidades. Incubamos por 20 minutos, à temperatura ambiente, no escuro.

Solução de bloqueio: colocamos 50µL de solução de bloqueio em todas as cavidades. Deixamos a placa descansar por 1 minuto. Secamos o fundo da placa e procedemos a leitura da absorbância em comprimento de onda de 450 nm.

Controle de qualidade do teste: para validação do teste, a média da duplicata do controle positivo deverá ser maior ou igual a 0,500. A do controle negativo menor do que 0,200. A do calibrador tem que ser maior que o controle negativo. A razão entre o controle positivo e o negativo deverá ser maior ou igual a 8,0. Se o calibrador ou os controles não estiverem dentro dos parâmetros, os resultados devem ser considerados inválidos e o ensaio repetido.

Interpretação dos resultados: Calculamos os limites com a média dos calibradores. Acrescentamos 10% desse valor para definir o limite superior e diminuimos 10% desse valor para definir o limite inferior. O que estiver acima do limite superior é considerado reagente, o que estiver abaixo do limite inferior é considerado negativo e o que tiver entre esses valores será considerado inconclusivo.

#### **4.6.4.b) Ensaio Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad)**

##### **Princípio da técnica**

Método imunoenzimático em uma fase realizado conforme recomendações do fabricante. Do tipo sanduiche, em formato de microplaca, o teste detecta o antígeno NS1 do vírus da dengue no soro ou plasma humano. O teste utiliza anticorpos monoclonais (AcM) para a captura e a revelação.

##### **Procedimento**

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. As amostras dos pacientes e os controles foram incubados diretamente e em simultâneo com o conjugado, por 90 minutos a 37°C, nos poços da microplaca sensibilizada pelos AcM. Em presença do antígeno NS1 na amostra, forma-se um complexo imune AcM - NS1 - AcM/peroxidase. Após as lavagens (6X) praticadas no final da incubação, a presença do complexo imune é revelada por adição de uma solução enzimática (TMB) que resulta em

coloração. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi parada por adição de uma solução de ácido sulfúrico. A densidade óptica obtida a 450/620 nm é proporcional à quantidade de antígeno NS1 presente na amostra testada. A presença do antígeno NS1 numa amostra individual é determinada por comparação entre a DO da amostra com a DO do controle.

O valor de corte corresponde ao valor médio das densidades ópticas das duplicatas de calibradores. Os resultados são expressos sob a seguinte forma, divide-se o valor da densidade óptica da amostra pelo valor da média dos calibradores. Os valores calculados e com resultados  $<0.5$ ,  $0.5 - 1.0$ , e  $\geq 1.0$  são definidos como negativo, inconclusivo e positivo, respectivamente.

#### **4.6.5 Ensaios Imunoenzimáticos para detecção de anticorpos IgM anti -DENV**

##### **4.6.5.a) Ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura para detecção de anticorpos da classe IgM anti-DENV Panbio ®.**

###### **Princípio da técnica**

Os anticorpos IgM foram detectados pela técnica imunoenzimática de captura de IgM, utilizando-se o kit ELISA-IgM anti-dengue PanBio ®, Pty., Ltd., Brisbane, Austrália. Quando presentes, os anticorpos séricos da classe IgM se combinam com anticorpos anti-IgM ligados à superfície de poliestireno dos micropoços das tiras do teste.

###### **Procedimento**

O procedimento foi realizado de acordo com a instrução do fabricante. As amostras e os controles foram diluídos num diluente próprio e incubadas por 1 hora a 37°C em estufa. Posteriormente, lavamos a placa para a remoção do soro residual com tampão de lavagem (salina tamponada com fosfato 7,2 a 7,6, Tween20 e conservante). Utilizamos um concentrado de antígenos dos sorotipos DENV 1-4 diluído num diluente próprio. Esses antígenos são produzidos por meio de um sistema de expressão da célula do inseto e imunopurificação por anticorpo monoclonal específico. Adicionamos ao antígeno diluído parte igual de anticorpo monoclonal (Mab) conjugado HRP, que permitiu a formação de complexos antígeno-Mab. Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. Após incubação, os micropoços foram lavados e adicionamos um sistema de substrato incolor (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio – cromógeno TMB). O substrato é hidrolisado pela enzima e o cromógeno adquire cor azul. Para

interromper a reação utilizamos uma solução de ácido fosfórico 1M. O desenvolvimento da cor é indicativo da presença de anticorpos IgM anti-dengue na amostra sob teste. Procedimento realizado conforme orientações do fabricante. Para validação do teste, os ensaios possuem um fator de calibração que deve ser aplicado à absorbância do calibrador para determinar o valor do cut – off (ponto de corte do teste). É importante verificar a cada diferente lote o novo fator de calibração através da folha de especificações que acompanha o kit. O cálculo feito para definir os pontos de corte é a média da triplicata dos calibradores multiplicado pelo fator de calibração. O outro ponto é calculado com essa média multiplicado por 1,1. Para interpretação os resultados classificamos o ponto de corte 1 aquele que utilizou o fator de calibração e o outro ponto de corte 2. Se amostra tiver densidade óptica maior ou igual que o ponto de corte 1 é considerada positiva. Se for inferior ao ponto de corte 2, é negativa. Se tiver entre os pontos, é considerada duvidosa.

#### **4.7 Características de desempenho dos testes de diagnósticos**

Utilizamos a análise de eficiência de testes apresentando os percentuais de sensibilidade e especificidade em nosso estudo. Sensibilidade é medida pela capacidade que um teste diagnóstico tem de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. Especificidade é medida pela capacidade desse mesmo teste diagnóstico detectar os indivíduos verdadeiramente negativos, ou seja, diagnosticar os indivíduos sadios. Na avaliação de um teste diagnóstico existem quatro interpretações possíveis para o resultado do teste: duas em que o teste está correto e duas em que está incorreto. O teste está correto quando ele é positivo na presença da doença (resultados verdadeiros positivos), ou negativo na ausência da doença (resultados verdadeiros negativos). Por outro lado, o teste está incorreto quando ele é positivo na ausência da doença (falso positivo), ou negativo quando a doença está presente (falso negativo). Os melhores testes diagnósticos são aqueles com poucos resultados falso-positivos e falso-negativos. A figura 4.1 mostra as relações entre os resultados de um teste e o diagnóstico verdadeiro.

		Doença (padrão-ouro)		
		Presente	Ausente	
Teste	Positivo	Verdadeiro positivo a	Falso-positivo b	a + b
	Negativo	Falso-negativo c	Verdadeiro negativo d	c + d
		a + c	b + d	N(a+b+c+d)

**Figura 4.1** Tabela de validação de um teste diagnóstico

As seguintes proposições/indicadores podem ser calculadas da comparação dos resultados da tabela:

**Sensibilidade:**  $a / (a + c)$     **Especificidade:**  $d / (b + d)$     **Prevalência (real):**  $(a + c) / N$

**Prevalência estimada (teste):**  $(a + b) / N$     **Valor preditivo positivo:**  $a / (a + b)$

**Valor preditivo negativo:**  $d / (c + d)$     **Classificação correta (acurácia):**  $(a + d) / N$

**Classificação incorreta:**  $(b + c) / N$

Nosso estudo obteve esses resultados através do software R versão 3.2.2. libraries RCurl, RJSONIO, ggmap and ggplot2 (175). O intervalo de confiança foi de 95% em todas as análises.

A análise de sensibilidade e especificidade foi utilizada nas análises moleculares dos grupos I e II e nas sorológicas com as amostras do grupo III.

Para descrevermos a intensidade da concordância entre os testes MAC-ELISA e Euroimmun anti-IgM de Zika utilizamos a medida Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os dois testes. A interpretação do grau de intensidade da concordância do referido coeficiente é: o valor  $< 0$  apresentou-se sem concordância; 0,0 - 0,20, leve; 0,21 - 0,40, moderada; 0,41 - 0,60, forte; 0,61 - 0,80, muito forte; 0,81 - 0,99, quase perfeita; e 1,0, perfeita. (176).

Para avaliar reação cruzada nos testes de dengue com amostras positivas para Zika utilizamos o cálculo do percentual de falsos positivos. Utilizamos essa medida também no teste Euroimmun anti-IgM de Zika em amostras positivas para outros flavivirus e malária. Todas essas análises foram realizadas usando o software R versão 3.2.2.com intervalo de confiança de 95%.

## **5. RESULTADOS**

Avaliamos a aplicabilidade da urina e fluido oral frente ao soro na pesquisa de RNA de ZIKV utilizando 2 grupos de pacientes divididos de acordo com as amostras obtidas:

Grupo I – 20 pacientes com amostras de soro, urina e fluido oral coletados em dias diferentes e 23 pacientes com amostras pareadas (mesmo dia de doença) para os três espécimes clínicos.

Grupo II - 200 pacientes com coletas de soro e urina. O soro coletado de zero a cinco dias de doença foi definido como amostra de referência para nossa análise.

Nos testes sorológicos de pesquisa de IgM anti-ZIKV utilizamos amostras do grupo III. Foram testadas 101 amostras de soro pelo método de MAC-ELISA e pelo teste comercial Euroimmun, onde avaliamos sensibilidade e especificidade do teste utilizando o resultado do PCR neste mesmo soro, até o quinto dia de doença, como referência. Avaliamos também a concordância entre o MAC-ELISA e o teste comercial Euroimmun utilizando as mesmas amostras.

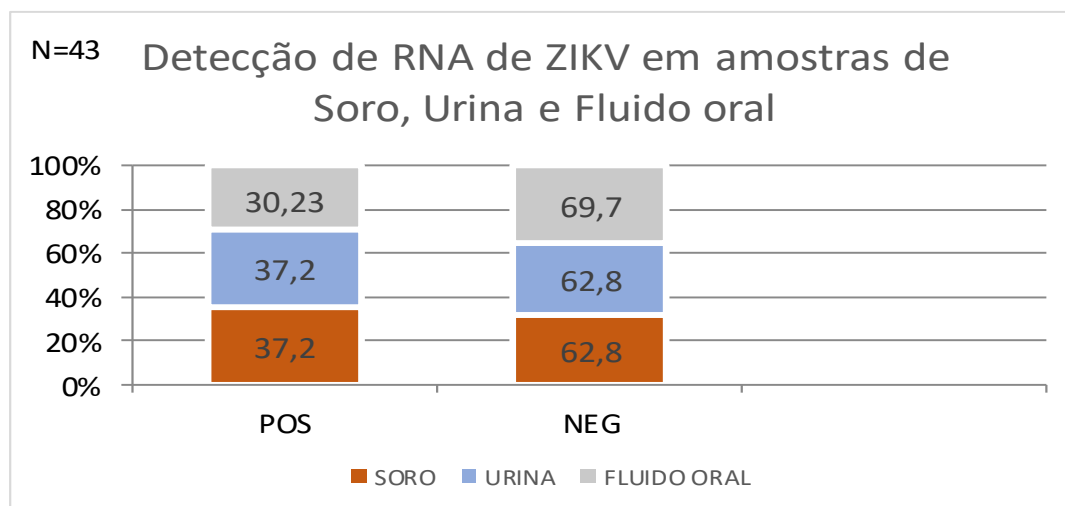
Verificamos a possibilidade de reação cruzada entre os testes comerciais de NS1 e IgM anti-DENV com amostras positivas para ZIKV, utilizando 84 e 91 amostras de soro respectivamente pertencentes ao grupo IV.

As amostras do grupo V foram usadas na avaliação do percentual de reação cruzada (especificidade) do teste comercial Euroimmun IgM anti-ZIKV frente aos flavivirus circulantes no Brasil e malária. Foram testadas 97 amostras de soro.

### **5.1 Avaliação das diferentes metodologias nos casos estudados**

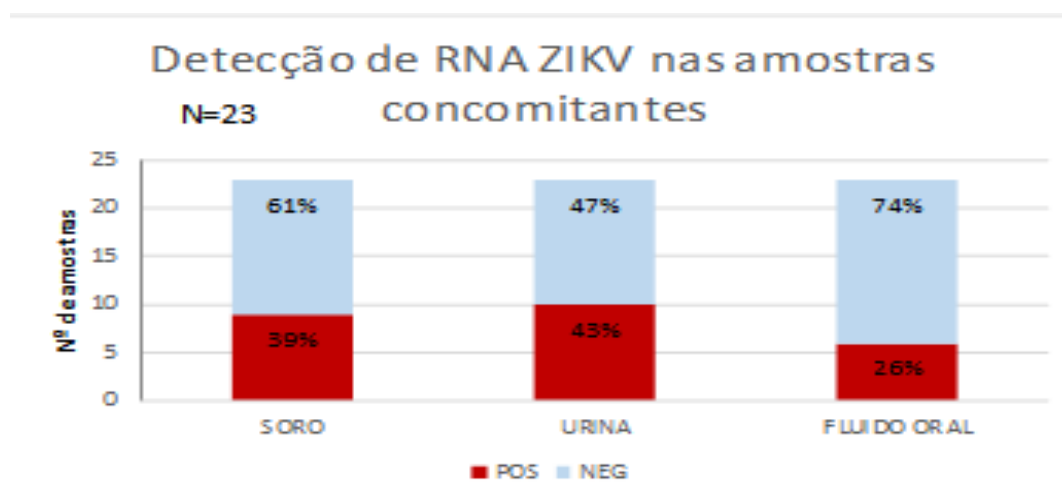
#### **5.5.1 Análise molecular - Grupo I**

O RNA viral foi detectado pelo método de RT-PCR em tempo real em todas as amostras dos pacientes testados no grupo I. Do total de 43 amostras de soro, urina e fluido oral, foram positivos 37,20% (16/43) no soro, 37,20% (16/43) na urina e 30,23% (13/43) no fluido oral (Figura 5.1). As idades variaram de 7 a 72 anos e em relação ao sexo, 67,44% (29/43) eram mulheres e 30,23% (13/43) homens.



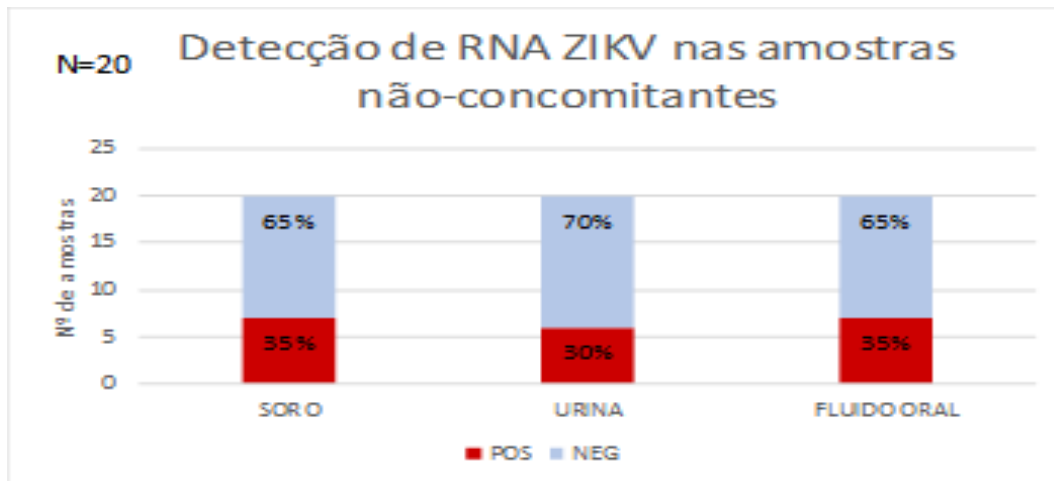
**Figura 5.1** - Percentual de detecção de RNA de ZIKV em cada espécime do grupo I.

No grupo I, analisamos amostras coletadas simultaneamente e no mesmo dia de doença como amostras que foram coletadas em dias diferente de doença. Representamos nas figuras 5.2 e 5.3 a detecção de ZIKV nos dois grupos de amostras, concomitantes e não-concomitantes.



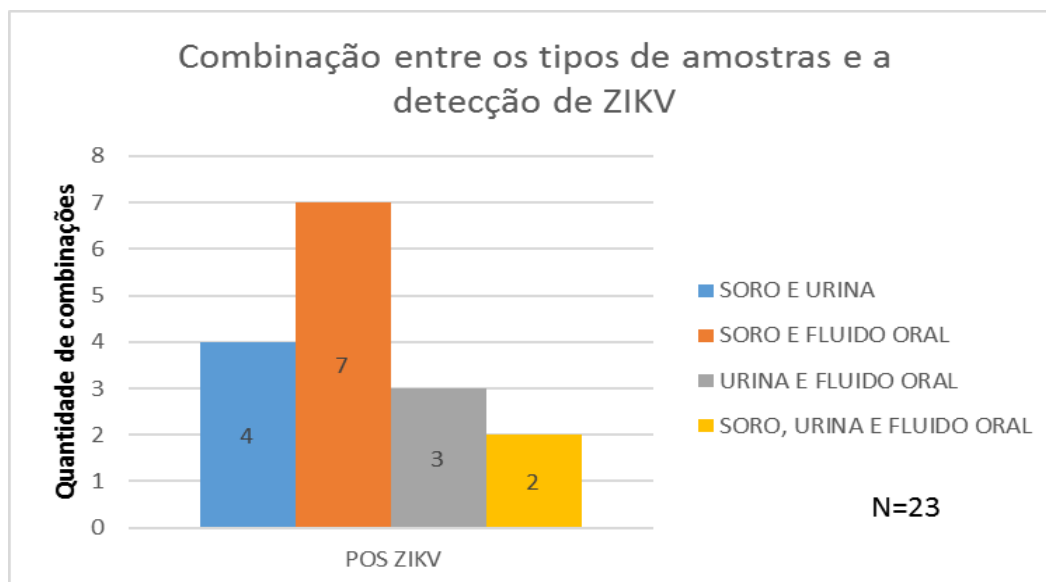
**Figura 5.2** – Resultado da detecção de ZIKV nas amostras de soro, urina e fluido oral coletadas no mesmo momento.





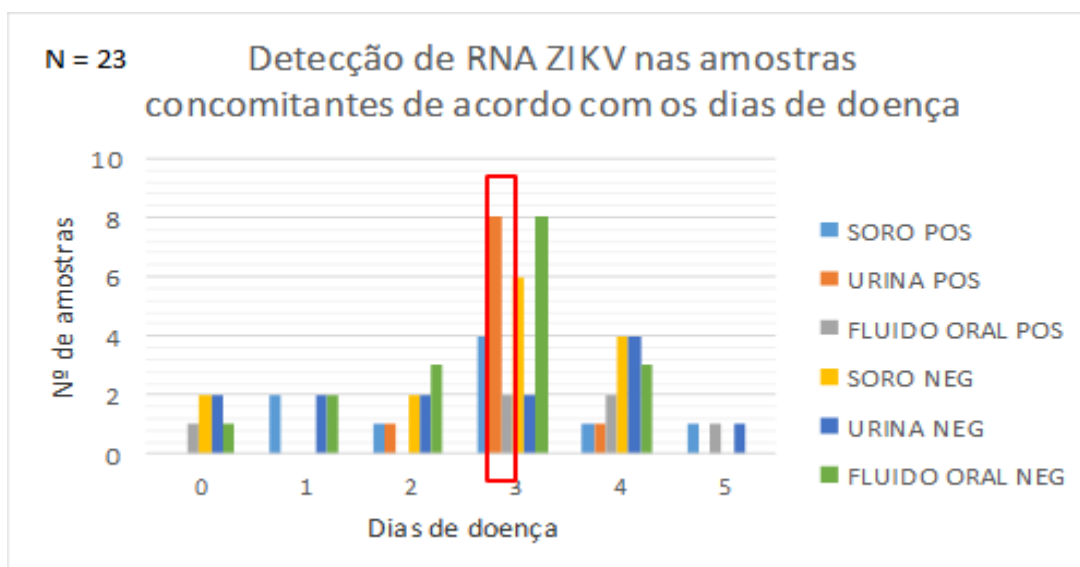
**Figura 5.3** - Resultado da detecção de ZIKV nas amostras de soro, urina e fluido oral coletadas em momentos diferentes.

Relacionamos também a detecção de ZIKV com a combinação de fluidos, sem considerar dias de doença. Os três fluidos coletados de um mesmo paciente apresentaram um percentual de 12,50% (2/16) de positivos. Urina e fluido oral 18,75% (3/16), soro e urina 25% (4/16) e soro e fluido oral 43,75% (7/16) (Figura 5.4).



**Figura 5.4** – Combinação entre os fluidos e a positividade de ZIKV.

A detecção de ZIKV nos três espécimes variou conforme os dias. Nesta análise utilizamos as 23 amostras coletadas no mesmo dia de doença na fase aguda. Observamos que no fluido oral houve detecção de ZIKV no dia zero. No soro, no primeiro dia de doença e na urina a partir do segundo dia. O pico de detecção dos três espécimes é no terceiro dia de doença (Figura 5.5).



**Figura 5.5** – Relação entre o tempo de coleta de cada espécime clínica e a detecção de ZIKV.

Nosso objetivo principal no grupo I (N=43) foi avaliar a sensibilidade e especificidade do teste utilizando urina e fluido oral comparadas ao soro por intervalos de dias de doença. Os intervalos foram de 0 a 2 dias, de 3 a 5 dias e maior que 5 dias de doença. A comparação entre urina e soro apresentou uma sensibilidade melhor no intervalo de 3 a 5 dias, de 44%, IC95 = [14-79]. A especificidade foi superior no intervalo de 0 a 2 dias, de 70%, IC95 = [35-93] (Tabela 5.1). Quando comparamos fluido oral com o soro, o intervalo de 3 a 5 dias também apresentou melhor sensibilidade, de 60% IC95 = [26-88]. A especificidade máxima foi observada no intervalo maior que 5 dias, 100% IC95 = [09-100] (Tabela 5.2).

**Tabela 5.1: Comparação da urina com o soro nos intervalos de dias de doença.**

Dias de doença	Nº amostras	Sensibilidade	Especificidade
0 A 2 DIAS	N=14	00% [00-72]	70% [35-93]
3 A 5 DIAS	N=22	44% [14-79]	38% [14-68]
>5 DIAS	N=03	00% [00-91]	00% [00-99]

**Tabela 5.2: Comparação do fluido oral com o soro nos intervalos de dias de doença.**

Dias de doença	Nº amostras	Sensibilidade	Especificidade
0 A 2 DIAS	N=12	33% [01-91]	56% [21-86]
3 A 5 DIAS	N=23	60% [26-88]	38% [14-68]
>5 DIAS	N=04	00% [09-100]	100% [09-100]

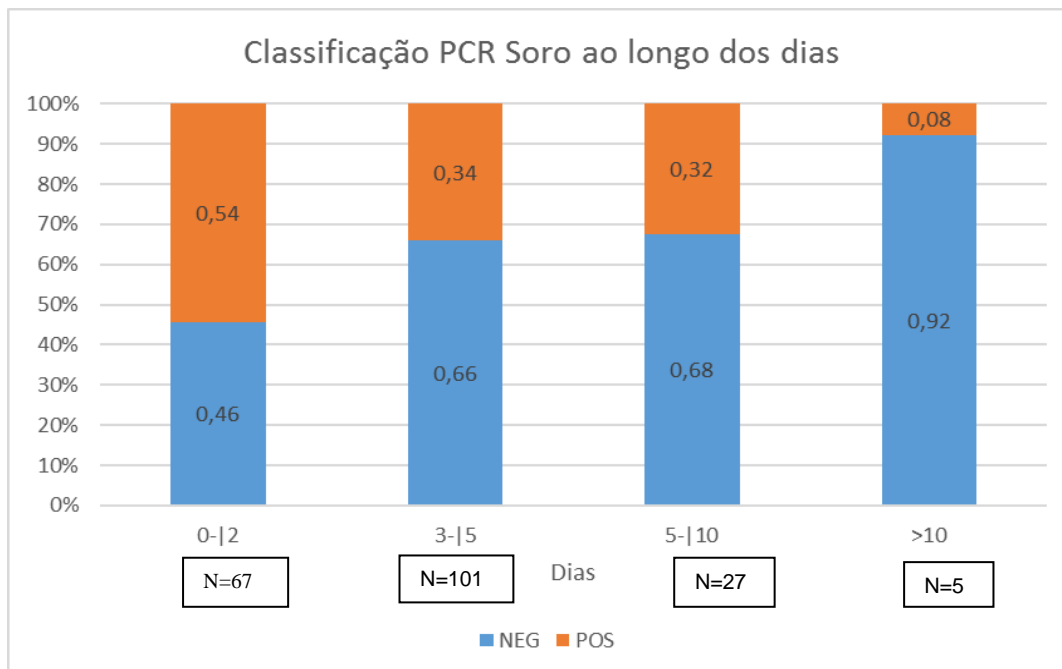
### 5.5.2 Análise molecular - Grupo II

Buscamos neste grupo fazer a detecção de ZIKV e avaliar sensibilidade e especificidade da urina comparado ao soro e o tempo de detecção desses espécimes ao longo dos dias de doença. Realizamos a qRT-PCR em 200 amostras de soro e urina coletados do mesmo paciente. O percentual de positivos para ZIKV no soro foi de 39% (78/200) e na urina 51,50% (103/200). Dessas 200 amostras, 114 foram concomitantes (coletadas no mesmo dia de doença) e 86 não concomitantes. O percentual de detecção em amostras concomitantes foi de 38,60% (44/114) no soro e 52,64% (60/114). Nas amostras não concomitantes, 39,53% (34/86) foram positivas no soro e 50% (43/86) na urina (Tabela 5.3).

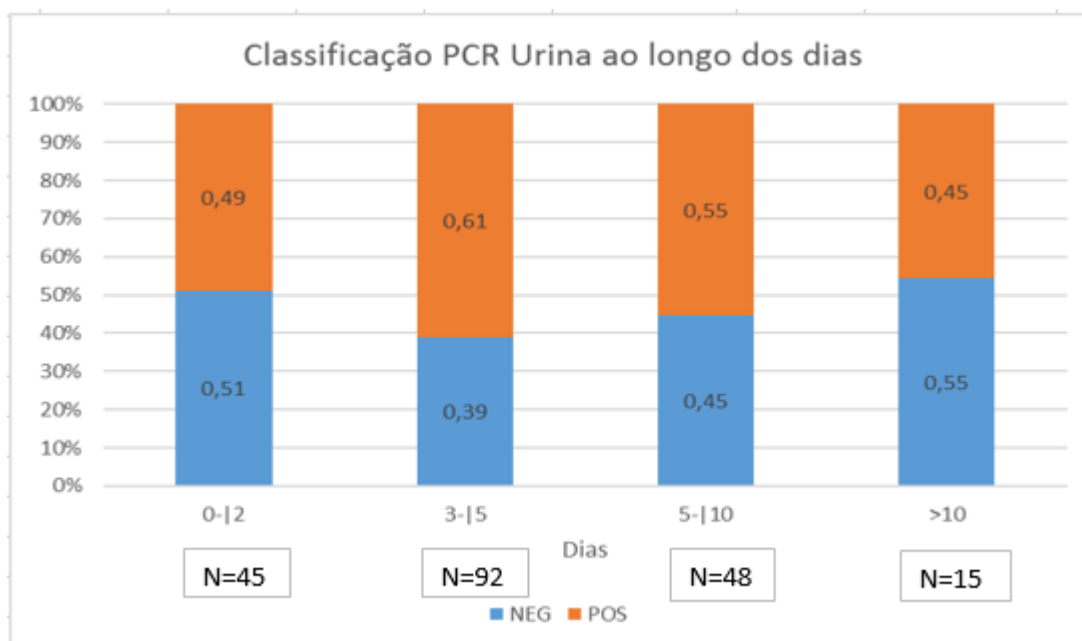
**Tabela 5.3** – Resultados das amostras de soro e urina no qRT-PCR de ZIKV

ESPÉCIMES	POS	NEG	POS CONCOMITANTES	NEG CONCOMITANTES	POS NAO-CONCOMITANTES	NEG NAO-CONCOMITANTES
SORO	39% (78/200)	61% (122/200)	38,6% (44/114)	61,4% (70/114)	39,54% (34/86)	60,46% (52/86)
URINA	51,5% (103/200)	48,5% (97/200)	52,64% (60/114)	47,36% (54/114)	50% (43/86)	50% (43/86)

Nas figuras 5.6 e 5.7 apresentamos o percentual de positivos em cada espécime clínico relacionando com os dias de doença. O soro obteve melhor percentual de detecção no intervalo de 0 a 2 dias de doença e a urina de 3 a 5 dias.



**Figura 5.6** – Percentual de detecção de ZIKV no soro por intervalos de dias de doença.



**Figura 5.7** – Percentual de detecção de ZIKV na urina por intervalos de dias de doença.

A análise de sensibilidade e especificidade para cada espécime clínico também foi feita nesse grupo, sempre utilizando o soro como amostra padrão de escolha. Os intervalos de dias de doença nesse grupo foram classificados de modo diferente: 0 a 2 dias, 3 a 5 dias, 5 a

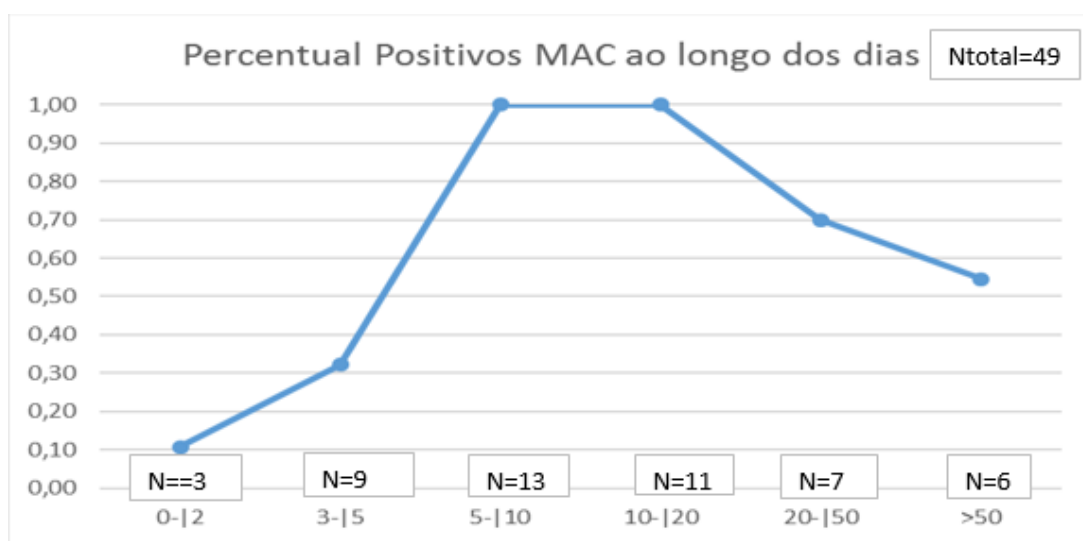
10 dias e 10 a 15 dias de doença. A comparação entre os dois fluidos nesse grupo apresentou máxima sensibilidade e especificidade no intervalo de 10 a 15 dias de doença, 100%, IC95 = [01-100] e de 100%, IC95 = [19-100] respectivamente (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4:** Sensibilidade e especificidade da urina comparada ao soro nos intervalos de dias de doença.

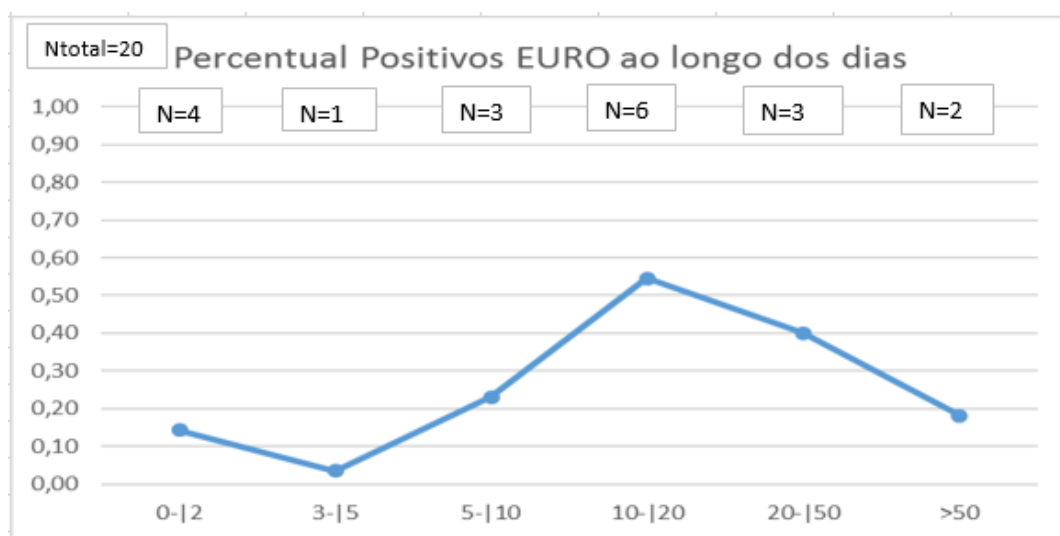
Dias de doença	Nº amostras	Sensibilidade	Especificidade
0 A 2 DIAS	N=45	57% [34-77]	59% [36-79]
3 A 5 DIAS	N=94	79% [62-91]	48% [35-62]
5 A 10 DIAS	N=30	73% [45-92]	60% [32-84]
10 A 15 DIAS	N=04	100% [01-100]	100% [19-100]

### 5.5.3 Análise sorológica Grupo III

Nosso objetivo no grupo III foi avaliar a sensibilidade do IgM anti-ZIKV MAC-ELISA/CDC e do teste comercial Euroimmun e estabelecer se existe concordância entre as duas metodologias. Um total de 101 amostras de soro foram testadas nos métodos. Em relação a positividade nos testes e os dias de doença, 48,51% (49/101) foi positivo no MAC-ELISA e 19,80% (20/101) no Euroimmun. Na figura 5.8 e 5.9 podemos observar o percentual de positivos por teste, estratificados por dias de doença.



**Figura 5.8** – Percentual de amostras positivas no MAC-ELISA estratificado por dias de doença.



**Figura 5.9** – Percentual de amostras positivas no Euroimmun estratificado por dias de doença.

Das 101 amostras, utilizamos na análise de sensibilidade e especificidade somente aquelas que tinham resultado para PCR de ZIKV e que estivesse até o quinto dia de doença (70/101) considerado o nosso padrão neste grupo. Na tabela 5.5 e 5.6 observa-se o percentual de sensibilidade e especificidade de cada método estratificado por dias de doença:

**Tabela 5.5:** Análise de sensibilidade e especificidade do MAC-ELISA.

Dias de doença	Nºamostras	Sensibilidade	Especificidade
0 A 2 DIAS	N=24	17% [04-41]	100% [42-100]
3 A 5 DIAS	N=26	36% [11-69]	67% [38-88]
>5 DIAS	N=20	75% [43-95]	12% [00-53]

**Tabela 5.6:** Análise da sensibilidade e especificidade do Euroimmun.

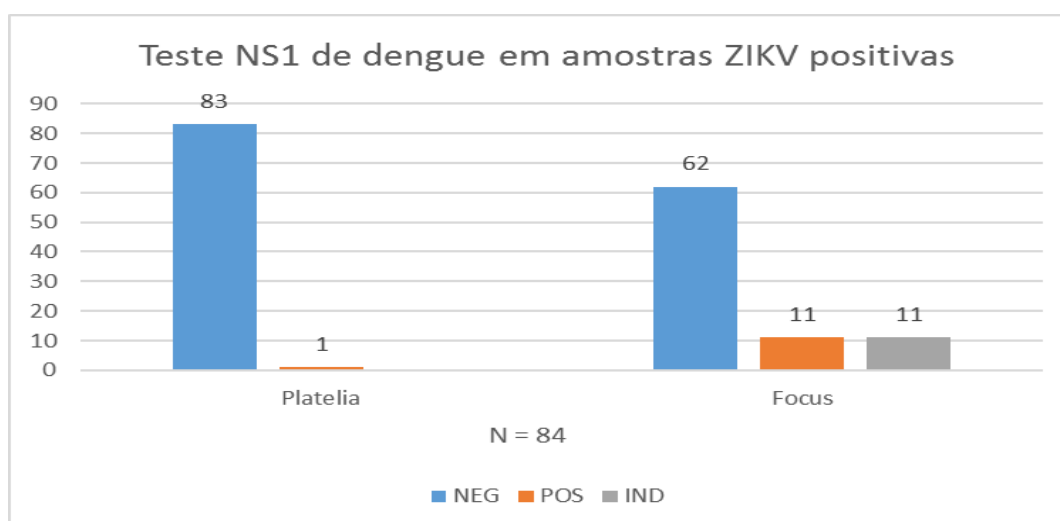
Dias de doença	Nºamostras	Sensibilidade	Especificidade
0 A 2 DIAS	N=25	17% [04-41]	86% [42-100]
3 A 5 DIAS	N=25	00% [00-41]	93% [68-100]
>5 DIAS	N=20	18% [09-100]	56% [09-100]

Ainda neste grupo de amostras, realizamos uma análise de concordância de resultados entre os dois testes, MAC-ELISA e Euroimmun. A comparação desses resultados é apresentada pelo índice de kappa, medida que expressa o índice de confiabilidade de um teste. Assim, analisando a concordância do MAC-ELISA com Euroimmun, foi obtida apenas uma leve concordância ( $k = 0,101$ ;  $p = 0,185$ ; IC = 95% [-0,034-0,24]).

#### 5.5.4 Especificidade dos testes de Dengue e Zika

Em função do elevado grau de reatividade cruzada de anticorpos observado entre flavivirus, descrito na literatura, principalmente em infecções de Zika com dengue, realizamos análises com amostras do grupo IV em testes comerciais utilizados na rotina diagnóstica de dengue com amostras positivas de Zika observando o percentual de reação cruzada apresentado. Avaliamos também o teste anti-IgM e anti-IgG para Zika em amostras sabidamente positivas para os quatro sorotipos de dengue, febre amarela e malária, pertencentes ao grupo V do nosso estudo.

Analisamos 84 amostras positivas para ZIKV pelo método de PCR nos testes Platelia™ Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) e Dengue NS1 Antigen DX Select™ Focus Diagnostics com objetivo de comparar o percentual de reação cruzada nos dois testes. Essas amostras foram estratificadas por dias de doença. No dia zero, analisamos 20 amostras, no dia um e no dia dois, 21 amostras e no dia três, 22 amostras para cada teste. O percentual de positivos no Platelia foi de apenas 1,19% (1/84). No Focus, 13,09% (11/84) testaram inconclusivo e 13,09% (11/84) testaram positivo (Figura 5.10). O teste Platelia apresentou o menor percentual de reação cruzada nos quatro intervalos analisados (Tabela 5.7).



**Figura 5.10** – Amostras agudas positivas para ZIKV testadas nos kits Platelia e Focus.

**Tabela 5.7:** Percentual de reação cruzada nos testes de NS1 para dengue com amostras positivas para ZIKV.

Dias de doença	Nº amostras	Platelia	Focus
0	N=20	0%	35%
1	N=21	0%	20%
2	N=21	5%	15%
3	N=22	0%	11%

Testamos a reação cruzada no teste anti-IgM de dengue da Panbio, utilizando 91 amostras previamente testadas no PCR de ZIKV e de DENV. Apenas 19,78% (18/91) foram utilizadas nesta análise, pois apresentaram PCR de ZIKV positivo e de DENV negativo. O percentual de reatividade foi de 16% IC95 = [04-42], caracterizados como falso-positivos para dengue. Tentamos fazer a análise inversa, ou seja, avaliar os falso-positivos para Zika, que são positivos para dengue. Isso não foi possível pois a única amostra positiva para dengue foi negativa para Zika.

Analizamos as amostras do grupo V, num total de 97 amostras, sabidamente positivas para os DENV1 (n=20), DENV2 (n=17), DENV3 (n=20) e DENV4 (n=18), febre amarela (n=12), *Plasmodium vivax* (n=7) e *P.falciparum* (n=3) nos testes anti-IgM e anti-IgG ZIKV da Euroimmun. Não foi observada reação cruzada no teste anti-IgM ZIKV. O mesmo não reproduziu falso-positivos nessas amostras (0% IC95 = [0-0,43]). Já o teste anti-IgG ZIKV apresentou reação cruzada para todos os agravos testados, exceto *Plasmodium vivax*. DENV-3 foi o que apresentou maior percentual 55% IC95 = [03-38] (Tabela 5.8).

**Tabela 5.8:** Percentual de reação cruzada nos testes Anti-IgM e Anti-IgG de Zika da Euroimmun com amostras positivas para dengue, febre amarela e malária.

Agravos	Nº amostras	Anti-IgM Zika	Anti-IgG Zika
DENV 1	N=20	0%	15% IC95 = [03-38]
DENV 2	N=17	0%	29% IC95 = [11-55]
DENV 3	N=20	0%	55% IC95 = [32-76]
DENV 4	N=18	0%	27% IC95 = [10-53]
Febre Amarela	N=12	0%	33% IC95 = [11-64]
<i>P.falciparum</i>	N=3	0%	33% IC95 = [01-87]
<i>P.vivax</i>	N=7	0%	0% IC95 = [00-43]



## 6. DISCUSSÃO

Um dos objetivos do nosso estudo foi avaliar a utilização de amostras alternativas (urina e fluido oral) no diagnóstico molecular de Zika comparado ao soro, que é uma amostra clínica, amplamente utilizada no diagnóstico. Observar que as amostras alternativas foram uma opção complementar ao diagnóstico do ZIKV, aumentando a possibilidade de detecção do vírus num período bem definido no curso da doença.

O uso de espécimes alternativos como urina e saliva para diagnóstico molecular na fase aguda de infecções por flavivirus foi relatado em pacientes com vírus Oeste do Nilo (154) e dengue (156). O diagnóstico em amostras de urina e saliva também foi relatado para outras infecções por vírus, como o da imunodeficiência humana (HIV), hepatite A, B e C e rubéola (177). O WNV foi detectado mais tempo na urina do que no soro (154) e pode ser isolado nesse espécime (178). Alguns estudos também sugerem que, como o WNV, o DENV pode ser detectado por mais tempo na urina do que na saliva ou soro (153) (179). Detecção de dengue também foi observado na saliva (180).

Relatos na literatura sugerem o uso da urina (152) (181) (182) (183) e saliva (20) (181) como espécimes clínicas de importância para o diagnóstico de infecção por ZIKV. Detecção do vírus na saliva também foi relatado em um recém-nascido e sua mãe, respectivamente, nos dias 2 e 3 pós-parto (86). Na Nova Caledônia, RNA de ZIKV foi detectado na urina de 6 pacientes até 20 dias após viremia (152).

Em nosso estudo com amostras do grupo I, podemos observar um percentual semelhante de positividade na urina em relação ao soro (37,2%) (Figura 5.1). Esse número demonstrou que a taxa de detecção na urina se aproximou da taxa do soro em amostras tanto coletadas simultaneamente quanto as que não foram concomitantes. Gourinat e colaboradores (152) também descreveram a detecção em urina, sugerindo a utilidade diagnóstica de outro fluido corporal para aumentar a janela de detecção diagnóstica. Observamos também que quando pareamos os três espécimes, soro e urina apresentaram melhor detecção do que o fluido oral (Figura 5.2). Nas amostras não concomitantes, os três espécimes apresentaram detecção parecida (Figura 5.3). Analisando a combinação dos fluidos, independente do dia de doença em que foram coletados, observamos que associar o soro com o fluido oral agregou valor ao diagnóstico de ZIKV (Figura 5.4). A combinação de soro e fluido oral no diagnóstico de ZIKV já foi relatada na literatura sugerindo uma melhora na capacidade de detecção do vírus (20). Embora nossos resultados necessitem ser confirmados em coortes maiores, eles sugerem que amostras alternativas podem ser utilizadas na detecção e rastreamento do ZIKV em

investigações de grande escala ou outros contextos epidemiológicos, como por exemplo, o retorno de viajantes de áreas endêmicas.

Nosso estudo também demonstrou que o RNA de ZIKV na urina pode ser detectado a partir do segundo dia de doença (Figura 5.5). Na análise de sensibilidade, o intervalo que apresentou melhor detecção foi de três a cinco dias (44%). A especificidade foi melhor no intervalo de zero a dois dias (70%) (Tabela 5.1), sugerindo que nesse período a capacidade de detectar os negativos é bem próxima do que se considera o ideal. Esses dados sugerem a relevância deste fluido como opção diagnóstica na fase aguda da doença como relatado na literatura (184).

Em outra análise com amostras de urina comparado ao soro, utilizando um número maior de espécimes, foi observado percentual maior de positividade na urina em relação ao soro tanto em amostras pareadas ou não-pareadas (Tabela 5.1). Analisando os espécimes separadamente, de acordo com o intervalo de dias de doença, observamos melhor detecção de ZIKV no soro entre zero e dois dias de doença e na urina de três a cinco dias (Figuras 5.6 e 5.7). A sensibilidade e especificidade foram máximas na detecção do ZIKV no intervalo de 10 a 15 dias (Tabela 5.4), este achado corrobora a outro já relatado na literatura (183). Estudos sugerem que ZIKV pode ser detectado por um período mais longo na urina do que no soro (152). Esse dado sugere que o vírus é excretado na urina, sendo o trato-geniturinário um potencial reservatório com atividade de replicação (182). Alguns resultados demonstraram positividade fora do período normalmente descrito na literatura de maior detecção do vírus, o que nos faz pensar que a data de início de sintomas pode ser de difícil confirmação, particularmente nos sintomas iniciais quase imperceptíveis. Sendo assim, a data de início dos sintomas e a data de coleta são informações indispensáveis no desfecho dos dias de doença e na escolha do melhor espécime a ser utilizado no diagnóstico.

Outra amostra alternativa investigada no nosso estudo foi o fluido oral. O material é facilmente coletado com uso de swab oral, que é um dispositivo de coleta de amostra não-invasivo e de interesse particular quando as amostras de sangue são difíceis de coletar. Tem como vantagem também ser utilizado em lugares remotos onde as unidades de saúde não possuem estrutura para coleta, armazenamento e processamento adequado das amostras de soro. Um relato na literatura sugere baixa detecção de ZIKV em fluido oral (184), o que não foi observado em nosso estudo, que demonstrou um percentual de 30,23% de detecção de vírus neste espécime (Figura 5.1). Os resultados discrepantes, na maioria das vezes, podem ser explicados por diferenças na população estudada e no tamanho amostral. Observamos nesta análise que a detecção de RNA viral foi maior no 3º dia de doença (Figura 5.5). Resultado semelhante também foi observado por Musso e colaboradores (20) onde o melhor

período de detecção também foi entre o 3º e o 5º dia. A sensibilidade observada nesse intervalo em nosso estudo foi de 60% (Tabela 5.2), a melhor dos três intervalos avaliados. A utilização do fluido oral aumentou a capacidade de detecção do RNA de ZIKV dentro da primeira semana do início de sintomas, mas não aumentou a janela de detecção como visto na urina.

Um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) pode ser utilizado para detecção de anticorpos IgM anti-vírus Zika no soro ou fluido cerebrospinal. No entanto, o método pode proporcionar resultados falsos positivos devido a reações cruzadas contra outros flavivírus relacionados devido ao alto grau de homologia estrutural (53) ou reatividade não específica, que pode acontecer em qualquer amostra, inclusive de indivíduos saudáveis, devido a resposta de anticorpos naturais ou substâncias metabólicas circulantes (185). O CDC sugere, nos casos positivos, a realização do teste de PRNT (teste de neutralização por redução de placas) para confirmação da infecção (186). O teste mede os anticorpos neutralizantes específicos do vírus. Assim, um anticorpo gerado contra uma das moléculas pode reagir com a outra, ainda que sua afinidade seja baixa. Em caso de regiões endêmicas para Zika e outros flavivírus, o PRNT nem sempre é capaz de fornecer um resultado definitivo e específico de flavivírus causando uma infecção recente, particularmente em pessoas com história prévia de infecção por flavivírus. Por esta razão, a confirmação PRNT não está recomendada de rotina em áreas onde o vírus da dengue é endêmico e a reatividade cruzada é provável que ocorra na maioria dos casos. A reatividade cruzada sorológica a outros flavivírus pode ser observada com a infecção primária de flavivírus, mas os títulos para o vírus infectante são geralmente mais elevados. Em contraste, quando a infecção com flavivírus ou vacinação anterior ocorreu, a resposta anamnésica pode produzir títulos elevados ou superiores ao vírus anterior, levando a resultados não interpretáveis ou confusos (187). Nosso estudo analisou amostras nos testes de captura de anticorpo IgM de Zika MAC-ELISA e Euroimmun e os resultados demonstraram um percentual maior de positivos confirmados no teste MAC-ELISA do que no Euroimmun, 48,51% e 19,80%, respectivamente. Ao longo dos dias de doença, o MAC-ELISA mostrou máxima eficiência entre o quinto e o vigésimo dia (Figura 5.8). O Euroimmun apresentou melhor eficiência no intervalo de 10 a 20 dias de doença (Figura 5.9). A análise de sensibilidade e especificidade também foi realizada nessas amostras e mais uma vez o teste MAC-ELISA apresentou percentual maior no intervalo acima de cinco dias de sintomas (75%) (Tabela 5.5). A falta de sensibilidade foi observada no intervalo de zero a dois dias de doença sugerindo que não se deve utilizar o teste neste intervalo, onde a detecção de negativos é alta e a presença de anticorpos não é observada. O teste Euroimmun apresentou baixa sensibilidade em todos os intervalos estudados enquanto que a especificidade foi

próxima do ideal nos cinco primeiros dias de doença (Tabela 5.6). Os dados apresentados sugerem que o método de MAC-ELISA é mais sensível do que o Euroimmun, entretanto a possibilidade de reação cruzada nos resultados pode ser maior, sendo o teste Euroimmun mais específico.

Completando a análise desse grupo de amostras, realizamos um teste de concordância entre os métodos para avaliar a confiabilidade dos testes. O índice kappa foi aplicado aos resultados e apresentou uma leve concordância ( $k = 0,101$ ), demonstrando que é necessária uma avaliação com um número maior de amostras para conclusão da sua utilização na rotina diagnóstica. Achados de outros estudos sobre detecção de anticorpos ZIKV pelo método de MAC-ELISA em uma região com epidemia de dengue encontrou resultados reativos para ZIKV, inclusive confirmados por PRNT, na ausência de infecção atual de ZIKV ou anterior (188). Como ZIKV está circulando em países com transmissão de vírus da dengue e também onde a vacina para febre amarela é comumente administrada, a incapacidade de diferenciar de forma confiável as respostas de anticorpo de flavivirus é um sério impedimento para um diagnóstico e vigilância precisos. Para os pacientes com suspeita de infecção por ZIKV, um resultado positivo por RT-PCR em tempo real confirma infecção pelo vírus, mas um resultado negativo não exclui a infecção. Nestes casos, o teste de anticorpos pode identificar recentes infecções adicionais por ZIKV. Se os testes de pesquisa de anticorpos IgM resultam positivos, equívocos, ou inconclusivos, um teste de neutralização por redução de placas (PRNT) pode ser utilizado para complementar a confirmação do diagnóstico. Estudos epidemiológicos baseados em métodos de laboratório eficazes e precisos são necessários. Em suma, ferramentas diagnósticas confiáveis são instrumentos para melhor a detecção da carga global de ZIKV e para alcançar uma resposta de saúde pública eficaz.

Diante de um novo cenário epidemiológico, com a circulação de ZIKV, CHIKV, DENV, se faz necessário a utilização de ferramentas de diagnóstico capaz de reconhecer esses vírus com rapidez e eficiência. A semelhança nas manifestações clínicas, ciclos de transmissão, distribuição geográfica e reatividade cruzada em ensaios sorológicos para esses vírus é comum. Frente a esta situação, nosso estudo analisou as reações cruzadas tanto em testes de dengue como de Zika, avaliando o quanto de confundimento essas reações trariam no diagnóstico e na conclusão dos casos.

Utilizamos amostras sabidamente positivas, confirmadas por RT-PCR em tempo real de ZIKV, frente a kits comerciais para diagnóstico de antígeno NS1 de dengue e anticorpos IgM de dengue. Um relato na literatura descreveu um caso importado de ZIKV para Suíça onde testes de captura de NS1 para dengue foram positivos (189). Na análise com os testes para NS1 de dengue, o teste Focus obteve positividade em 13,09% (Figura 5.10) das amostras

agudas analisadas sugerindo a reatividade cruzada com ZIKV, que pode impedir a identificação do vírus infectante específico, especialmente quando o paciente apresenta histórico de vacinação ou infecção prévia por um flavivírus relacionado. O teste Platelia se mostrou mais eficiente frente às amostras positivas para ZIKV com apenas 1,19% de positividade. Analisamos o percentual de reação cruzada dos testes nos dias de doença na fase aguda (de 0 a 3 dias) e podemos observar novamente que o teste Platelia apresentou um percentual de reação cruzada (5%) em apenas um dia de doença (2º dia), enquanto que o teste da Focus apresentou reação cruzada em todos os dias de doença (35% - dia 0) (20% - dia 1) (15% - dia 2) (11% - dia 3) (Tabela 5.7). Observamos uma queda nesse percentual de acordo com o passar dos dias de doença. Isso se explica pela viremia, que no Zika e em outros flavivírus, é alta no início da doença, mas de curta duração (185). Durante a fase aguda, a NS1 pode ser secretada ou estar associada à membrana e ambas as formas são apresentadas como imunogênicas (40) (190) (191). Nível elevado de NS1 circulante, foi demonstrado na fase aguda da dengue por ELISA de captura de antígenos encontrado no soro de pacientes com infecções DENV primário e secundário, até ao nono dia após o início dos sintomas (192) (193). A proteína NS1 de ZIKV induz uma resposta de anticorpos não neutralizante, específica do vírus, se mostrando um alvo de diagnóstico confiável (194). Nossos achados sugerem a capacidade dos testes de dengue em reconhecer a NS1 de Zika e seu potencial de reação cruzada, sendo esta uma informação importante para vigilância epidemiológica na escolha do melhor teste para diagnóstico de dengue e Zika.

Nossos dados sorológicos na análise de reação cruzada no teste anti-IgM de dengue indicam que os pacientes infectados com ZIKV podem ser positivos em um ensaio de IgM para DENVs. O percentual de reação cruzada foi de 16%, entretanto, nosso número amostral foi pequeno, mas suficiente para demonstrar a capacidade do teste em detectar falsos-positivos, particularmente se ZIKV é uma infecção secundária por flavivírus. Se ZIKV for o primeiro flavivírus encontrado, dados da literatura indicam que a reatividade cruzada é mínima (53). Se a infecção por ZIKV ocorrer após uma infecção por flavivírus, indica que a extensão da reatividade cruzada no ensaio de IgM é maior (53). Portanto, se as infecções por ZIKV ocorrerem em uma população com imunidade de base para DENV (ou outros flavivírus), nossos dados sugerem que pode ocorrer reatividade cruzada extensa no ensaio de IgM de dengue, podendo levar ao desfecho errado de que a dengue causou a epidemia. Nesse caso, o reteste e avaliação por outras técnicas de diagnóstico é necessária para fornecer uma resposta mais fidedigna. Além disso, o uso de isolamento de vírus ou RT-PCR para o diagnóstico laboratorial de infecções por dengue também evitaria essa má

interpretação. Portanto, o uso de testes de detecção de vírus em epidemias de dengue e Zika deve ser um componente dos algoritmos de testes laboratoriais.

Uma abordagem com amostras sabidamente conhecidas de dengue (1, 2, 3 e 4) e febre amarela e malária (*P.vivax* e *P.falciparum*) no kit Euroimmun não apresentaram resultados falsos positivos no IgM (Tabela 5.8), demonstrando uma alta especificidade do teste anti IgM-ZIKV em relação a possibilidade de reação cruzada. Já o kit de IgG apresentou percentual de reação cruzada em todas as amostras de dengue (1,2,3 e 4), destacando o dengue 3 com maior percentual, 55% de falsos-positivo (Tabela 5.8). Amostras de febre amarela (33%) (Tabela 5.8) também reagiram no kit, sugerindo a reação cruzada com flavivirus demonstrada na literatura (53). Para avaliar melhor o desempenho do teste em áreas endêmicas, amostras de residentes endêmicos que sofreram múltiplas infecções por DENV (e outros flavivírus) devem ser incluídas em outras avaliações, uma vez que estas amostras têm potencial para aumentar a reatividade cruzada.

As amostras de *Plasmodium falciparum* reagiram na mesma proporção que as de febre amarela (33%). Nos casos de infecção por *Plasmodium*, a ativação policlonal de células B induzida pelo parasita, pode causar a produção de anticorpos potencialmente reativos (195). Entre os pacientes com infecção por *Plasmodium* atual, até 30% de reações falso-positivas ou limítrofes foram relatadas utilizando o ELISA baseado em NS1 (196), o que também foi observado nas nossas análises. As amostras de pacientes com malária devem, portanto, ser incluídas nos painéis utilizados para avaliar a especificidade dos ensaios, particularmente aqueles que detectam anticorpos contra doenças tropicais.

## 7. CONCLUSÕES

- Amostras alternativas como urina e fluido oral se mostraram eficientes na detecção do vírus.
- A utilização da urina pareada ao soro sugeriu que o RNA de ZIKV pode ser detectado por um tempo maior após o início da infecção em comparação com o soro, dependendo do dia de doença.
- Amostras de urina devem sempre ser consideradas na escolha do material clínico para o diagnóstico molecular, pois aumenta a janela de detecção do vírus, conseqüentemente o número de casos confirmados.
- O uso de fluido oral no diagnóstico molecular comparado ao soro e sua utilização agregou valor ao diagnóstico de infecção pelo ZIKV.
- O fluido oral não pode substituir o soro como material clínico no diagnóstico de Zika. Sua coleta é de particular interesse quando amostras de sangue são difíceis de coletar, em locais remotos onde faltam instalações de saúde.
- Na fase aguda da infecção por Zika, recomendamos a coleta de soro e fluido oral para aumentar a sensibilidade da detecção molecular e a amostra de urina para aumentar a janela de detecção na fase inicial e o diagnóstico mais tardio da doença.
- Os testes anti-IgM de Zika MAC-ELISA e Euroimmun foram mais sensíveis e específicos, respectivamente. A reatividade cruzada com outros flavivirus dificulta a escolha de um teste eficaz na sorologia. A concordância entre eles não foi ideal. Neste caso, a utilização das duas metodologias pode ser uma alternativa para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico associando com o diagnóstico para dengue na tentativa de melhorar a interpretação dos resultados.
  - A reação cruzada entre flavivirus pode produzir resultados falso-positivos na rotina diagnóstica. Esta reatividade cruzada é devida ao elevado grau de homologia estrutural entre Zika e outros flavivirus.
  - A avaliação de reação cruzada em testes de detecção de NS1 de dengue com amostras positivas para ZIKV apresentou percentual mínimo para o teste Platelia e um alto grau no teste Focus. Concluímos que a utilização do teste Platelia pode ser utilizado em áreas com circulação de dengue e zika.
  - O teste Euroimmun anti-IgM Zika não apresentou reação cruzada enquanto que o teste IgG apresentou com todos os flavivirus testados e com *Plasmodium falciparum*. Os testes disponíveis para o vírus Zika IgM e IgG não podem distinguir de

forma confiável o vírus Zika de outras infecções por flavivírus, como o vírus Dengue, devido à reatividade cruzada. Até que testes específicos estejam disponíveis, os testes positivos para o vírus Zika IgM/IgG ou IgM contra o vírus dengue devem ser considerados evidências de infecção recente por flavivirus.

➤ Em relação a reação cruzada com *Plasmodium falciparum*, embora o risco de malária na América do Sul e Central seja limitado geograficamente, possíveis falsos positivos no ELISA Euroimmun de ZIKV não representam um grande problema nessa parte do mundo. A modelagem de distribuição de espécies mostrou adequabilidade ambiental para ZIKV em grande parte das regiões tropicais e subtropicais, onde a malária é endêmica. No entanto, acreditamos que os pacientes que forem diagnosticados pelo ZIKV ELISA devem estar cientes da possível interferência.

A avaliação dos testes de ELISA foi realizada apenas para fins de pesquisa e os autores não têm interesse financeiro.

➤



## 8. PERSPECTIVAS

O diagnóstico de infecção por ZIKV em amostra de urina e fluido oral é possível e melhora a capacidade de detecção do vírus. A atual situação epidemiológica do Brasil com a circulação de Zika, dengue, chikungunya e recentemente febre amarela nos leva a pensar num estudo com um número maior de amostras e utilizando outras metodologias na detecção molecular melhorando a vigilância desses arbovírus no país.

Utilizar outros protocolos de RT-PCR na confirmação da infecção por ZIKV em urina e fluido oral e observar a dinâmica viral e a capacidade de transmissibilidade do vírus utilizando esses fluidos corporais como via de transmissão.

O diagnóstico sorológico das infecções por ZIKV tem sido desafiador devido a reações cruzadas com outros flavivirus, infecções secundárias e vacinas anteriores, o que complica a interpretação, levando às vezes a resultados não confiáveis ou falso-positivos. Uma abordagem com mais amostras e testes mais específicos resultariam numa avaliação mais fidedigna dos nossos resultados melhorando o diagnóstico mais tardio que implica diretamente na elucidação dos casos de gestantes e no monitoramento da possibilidade de síndrome congênita do Zika e microcefalia.

Estudos futuros devem abordar a comparação de reação cruzada em amostras agudas e convalescentes anti-DENV positivo, considerando que a extensão da reatividade cruzada pode ser influenciada pelos níveis de NS1-DENV circulantes ou ligados a anticorpo (197).

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952;46(5):509-20. Epub 1952/09/01.
2. Faye O, Freire CC, Iamarino A, de Oliveira JV, Diallo M, Zanotto PM, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(1):e2636. Epub 2014/01/15.
3. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1969;18(3):411-5. Epub 1969/05/01.
4. Cornet M RY, Adam C, Valade M, Calvo M-A. 1979. Comparison between experimental transmission of yellow fever and Zika viruses in *Aedes aegypti*. *Cah Orstom Ser Entomol Med Parasitol* 27:47–53.
5. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(24):2536-43. Epub 2009/06/12.
6. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(6):1085-6. Epub 2014/05/27.
7. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(2):381-2. Epub 2015/01/28.
8. OMS WHOPssrW, ending 30th March, 2014. World Health Organization Western Pacific Region, Manila, Philippines.
9. ProMED mail P-mMZvPCEI, French Polynesia. ProMED-mail archive no. 20140309.2322907. <http://www.promedmail.org>. Accessed 12 September 2015.
10. 2015 P-mMZvPVP-manhwp0AS.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak BatPrECfDPaC, Stockholm, Sweden. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/rapid-risk-assessment-Zika%20virus-south-america-Brazil-2015.pdf>.
12. Nhan TX, Musso D. The burden of chikungunya in the Pacific. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(6):e47-8. Epub 2015/03/10.
13. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(10):1885-6. Epub 2015/09/25.
14. Zanoluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72. Epub 2015/06/11.
15. ProMED-mail. 6 November 2015. Zika virus—Suriname CVP-manhwp0AN.

16. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(3):55-8. Epub 2016/01/29.
17. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(9). Epub 2014/03/15.
18. <http://who.int/emergencies/zika-virus/strategic-response-framework.pdf?ua=1>  
WHOWZvmaG-BsIVp-Af.
19. SchulerFaccini L RE, Feitosa IML, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JJ, Neto JM, Wanderley HY, Cernach M, ElHusny AS, Pone MV, Serao CL, Sanseverino MT, Brazilian Medical Genetics Society-Zika Embryopathy Task Force. Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:59–62. 10.15585/mmwr.mm6503e2.
20. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;68:53-5. Epub 2015/06/14.
21. Alera MT, Hermann L, Tac-An IA, Klungthong C, Rutvisuttinunt W, Manasatienkij W, et al. Zika virus infection, Philippines, 2012. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(4):722-4. Epub 2015/03/27.
22. Buathong R, Hermann L, Thaisomboonsuk B, Rutvisuttinunt W, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2015;93(2):380-3. Epub 2015/06/24.
23. Shinohara K, Kutsuna S, Takasaki T, Moi ML, Ikeda M, Kotaki A, et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. *Journal of travel medicine*. 2016;23(1). Epub 2016/01/20.
24. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi M, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(4). Epub 2014/02/11.
25. Leung GH, Baird RW, Druce J, Anstey NM. Zika Virus Infection in Australia Following a Monkey Bite in Indonesia. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2015;46(3):460-4. Epub 2015/11/03.
26. Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, Moore PR, Taylor CT, Hewitson GR, et al. Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. *PLoS currents*. 2014;6. Epub 2014/06/20.
27. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Gunther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2015;63:32-5. Epub 2015/01/21.
28. Tappe D, Rissland J, Gabriel M, Emmerich P, Gunther S, Held G, et al. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(4). Epub 2014/02/11.
29. Waehre T, Maagard A, Tappe D, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(8):1412-4. Epub 2014/07/26.
30. Fonseca K, Meatherall B, Zarra D, Drebot M, MacDonald J, Pabbaraju K, et al. First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2014;91(5):1035-8. Epub 2014/10/09.
31. Summers DJ, Acosta RW, Acosta AM. Zika Virus in an American Recreational Traveler. *Journal of travel medicine*. 2015;22(5):338-40. Epub 2015/05/23.

32. McCarthy M. First US case of Zika virus infection is identified in Texas. *BMJ*. 2016;352:i212. Epub 2016/01/15.
33. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(5):880-2. Epub 2011/05/03.
34. Hearn P AB, Hewson R. et al. Identification of the first case of imported Zika fever to the UK: a novel sample type for diagnostic purposes and support for a potential non-vectorborne route of transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(5 suppl 1):62–63.
35. European Centre for Disease Prevention and Control. Zika virus disease epidemic: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome (first update) JAahe.
36. Boletim epidemiológico-Secretaria de Vigilância em Saúde-Ministério da Saúde-ISSN2358-9450 V, N°2-2017.
37. Sips GJ, Wilschut J, Smit JM. Neuroinvasive flavivirus infections. *Reviews in medical virology*. 2012;22(2):69-87. Epub 2011/11/17.
38. OMS WHOAahdWTRS.
39. Vasconcelos PFC T-d-RA, Pinheiro FP, Travassos-da-Rosa JFS. Arboviroses. In: Focaccia R, editor. *Tratato de Infectologia*. São Paulo. Atheneu; 2005. p. 289-302. [ Links ].
40. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of virology*. 1997;71(9):6650-61. Epub 1997/09/01.
41. Gubler DJ KG, Markoff L. 2007. Flaviviruses, p 1155–1227. In Knipe DM, Howley PM (ed), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
42. Schmaljohn AL MDATAFFIBS, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7633/>.
43. Lindenbach BD, Pragai BM, Montserret R, Beran RK, Pyle AM, Penin F, et al. The C terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *Journal of virology*. 2007;81(17):8905-18. Epub 2007/06/22.
44. Silva LR, Souza AM. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(3):267-73. Epub 2016/07/08.
45. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine*. 2016;374(10):951-8. Epub 2016/02/11.
46. Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses*. 2013;6(1):69-88. Epub 2014/01/02.
47. Beasley DW, Whiteman MC, Zhang S, Huang CY, Schneider BS, Smith DR, et al. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *Journal of virology*. 2005;79(13):8339-47. Epub 2005/06/16.
48. Murray PR, KS.; Pfaller, MA. *Microbiologia Médica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 888 p.
49. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*. 2007;152(4):687-96. Epub 2007/01/02.
50. Singh RK, Dhama K, Malik YS, Ramakrishnan MA, Karthik K, Tiwari R, et al. Zika virus - emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives - a comprehensive review. *The Veterinary quarterly*. 2016;36(3):150-75. Epub 2016/05/10.

51. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 2016;352(6284):467-70. Epub 2016/04/02.
52. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 2016;352(6287):816-8. Epub 2016/04/12.
53. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(8):1232-9. Epub 2008/08/06.
54. Vandenbogaert M CM, Diancourt L, Thiberge M, Sall A, Kwasiyorki A, Musso D, Desprès P, Manuguerra J-C, Caro V. 2014. Full-length genome sequencing and analysis of 3 ZIKV strains on an Ion Torrent PGM sequencer, abstr 22.133. 63rd Am Soc Trop Med Hyg (ASTMH) Meet, New Orleans, LA, 2 to 6 November 2014.
55. Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor Ldel C. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(5):933-5. Epub 2016/04/19.
56. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1477. Epub 2012/03/06.
57. Camacho E, Paternina-Gomez M, Blanco PJ, Osorio JE, Aliota MT. Detection of Autochthonous Zika Virus Transmission in Sincelejo, Colombia. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(5):927-9. Epub 2016/04/19.
58. Tognarelli J US, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, Parra B, Mora J, Becerra N, Lagos N, Vera L, Olivares B, Vilches M, Fernández J. 2016. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol* 161:665–668. 1.
59. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical microbiology reviews*. 2016;29(3):487-524. Epub 2016/04/01.
60. Korhonen EM, Huhtamo E, Smura T, Kallio-Kokko H, Raassina M, Vapalahti O. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(2). Epub 2016/01/23.
61. Tappe D, Perez-Giron JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical microbiology and immunology*. 2016;205(3):269-73. Epub 2015/12/26.
62. Weinbren MP, Williams MC. Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1958;52(3):263-8. Epub 1958/05/01.
63. Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve Isolations of Zika Virus from *Aedes (Stegomyia) Africanus* (Theobald) Taken in and above a Uganda Forest. *Bulletin of the World Health Organization*. 1964;31:57-69. Epub 1964/01/01.
64. Haddow AJ, Gillett JD, Corbet PS. Observations on the oviposition-cycle of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus), V. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1961;55:343-56. Epub 1961/10/01.
65. Haddow AJ, Dick GW. Catches of biting Diptera in Uganda, with anaesthetized monkeys as bait. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 1948;42(3-4):271-7. Epub 1948/12/01.
66. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Ba Y, Hanley KA, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS one*. 2014;9(10):e109442. Epub 2014/10/14.
67. Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya,

- Uganda S and Zika viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1953;47(1):13-48. Epub 1953/01/01.
68. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1956;50(3):238-42. Epub 1956/05/01.
69. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(2):e2681. Epub 2014/02/12.
70. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of virology*. 2014;88(11):6294-306. Epub 2014/03/29.
71. Marcondes CB, Ximenes Mde F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia) mosquitoes*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):4-10. Epub 2015/12/23.
72. Diagne CT, Diallo D, Faye O, Ba Y, Gaye A, Dia I, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC infectious diseases*. 2015;15:492. Epub 2015/11/04.
73. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Saweyog SC, Tided M, Machieng P, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(10):e3188. Epub 2014/10/10.
74. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(6):e0004816. Epub 2016/06/25.
75. 26:114-121. ZAVdNO-NaàstRBHH.
76. Petersen E, Wilson ME, Touch S, McCloskey B, Mwaba P, Bates M, et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas--Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;44:11-5. Epub 2016/02/09.
77. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(41). Epub 2014/10/28.
78. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(14). Epub 2014/04/18.
79. 6:9-10. VPDpvZunpenARP-AS.
80. de MdSBANdVANTCnCGGCTpgdrsnu.
81. Musso D, Richard V, Broult J, Cao-Lormeau VM. Inactivation of dengue virus in plasma with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion*. 2014;54(11):2924-30. Epub 2014/05/23.
82. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(2):359-61. Epub 2015/01/28.
83. Mansuy JM, Dutertre M, Mengelle C, Fourcade C, Marchou B, Delobel P, et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(4):405. Epub 2016/03/08.
84. Moreira J, Peixoto TM, Machado de Siqueira A, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*.

85. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet*. 2016;387(10020):719-21. Epub 2016/02/16.
86. 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 surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(13). Epub 2014/04/12.
87. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet*. 2016;387(10023):1051. Epub 2016/03/06.
88. Calvet G, Aguiar RS, Melo AS, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(6):653-60. Epub 2016/02/22.
89. Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, 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 Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(6):159-60. Epub 2016/02/20.
90. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;75(3):389-93. Epub 1981/01/01.
91. Ioos S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*. 2014;44(7):302-7. Epub 2014/07/09.
92. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(4):e0004636. Epub 2016/04/14.
93. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Rapid Risk Assessment. Zika virus disease epidemic: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Fifth update AS.
94. Nyati KK, Prasad KN. Role of cytokines and Toll-like receptors in the immunopathogenesis of Guillain-Barre syndrome. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:758639. Epub 2015/01/24.
95. Koga M, Gilbert M, Li J, Yuki N. Complex of GM1- and GD1a-like lipooligosaccharide mimics GM1b, inducing anti-GM1b antibodies. *PloS one*. 2015;10(4):e0124004. Epub 2015/04/14.
96. Malkki H. CNS infections: Zika virus infection could trigger Guillain-Barre syndrome. *Nature reviews Neurology*. 2016;12(4):187. Epub 2016/03/19.
97. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastere S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016;387(10027):1531-9. Epub 2016/03/08.
98. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. *The New England journal of medicine*. 2016;374(7):601-4. Epub 2016/01/14.
99. Ribeiro GS, Kitron U. Zika virus pandemic: a human and public health crisis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(1):1-3. Epub 2016/05/11.
100. <ECDC 2016 zika-virus-americas-association-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>.
101. Mécharles S HC, Poullain P, Tran T, Deschamps N, Mathon G, et al. Case report acute myelitis due to Zika virus infection. *Lancet* 2016; 8:6736.
102. de Sousa AM, Alvarenga MP, Alvarenga RM. A cluster of transverse myelitis following dengue virus infection in the brazilian Amazon region. *Tropical medicine and health*. 2014;42(3):115-20. Epub 2014/10/18.

103. European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. Rapid risk assessment. Microcephaly in Brazil potentially linked to the Zika virus epidemic. European Centre for Disease Prevention and Control S.
104. ProMED-mail. 28 January 2016. Zika virus—America AP-manhwpoAj.
105. Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ*. 2016;352:i657. Epub 2016/02/04.
106. Pan American Health Organization (PAHO); World Health Organization (WHO). Provisional remarks on Zika virus infection in pregnant women: Document for health care professionals. Montevideo UP.
107. Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in obstetrics & gynecology : the official journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2016;47(1):6-7. Epub 2016/01/06.
108. Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Gois AL, Belfort R, Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*. 2016;387(10015):228. Epub 2016/01/18.
109. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M, et al. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA ophthalmology*. 2016. Epub 2016/02/13.
110. de Oliveira Dias JR, Ventura CV, Borba PD, de Paula Freitas B, Pierroti LC, do Nascimento AP, et al. Infants with Congenital Zika Syndrome and Ocular Findings from Sao Paulo, Brazil: Spread of Infection. *Retinal cases & brief reports*. 2017. Epub 2017/01/07.
111. Staples JE, Dziuban EJ, Fischer M, Cragan JD, Rasmussen SA, Cannon MJ, et al. Interim Guidelines for the Evaluation and Testing of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection - United States, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(3):63-7. Epub 2016/01/29.
112. Harris SR. Measuring head circumference: Update on infant microcephaly. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*. 2015;61(8):680-4. Epub 2015/10/28.
113. Woods CG, Parker A. Investigating microcephaly. *Archives of disease in childhood*. 2013;98(9):707-13. Epub 2013/07/03.
114. Brasil P, Pereira JP, Jr., Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *The New England journal of medicine*. 2016;375(24):2321-34. Epub 2016/03/05.
115. Ashwal S, Michelson D, Plawner L, Dobyns WB. Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*. 2009;73(11):887-97. Epub 2009/09/16.
116. Miranda-Filho Dde B, Martelli CM, Ximenes RA, Araujo TV, Rocha MA, Ramos RC, et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *American journal of public health*. 2016;106(4):598-600. Epub 2016/03/10.
117. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell stem cell*. 2016;18(5):587-90. Epub 2016/03/10.
118. Franca GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*. 2016;388(10047):891-7. Epub 2016/07/04.
119. Eickmann SH, Carvalho MD, Ramos RC, Rocha MA, Linden V, Silva PF. [Zika virus congenital syndrome]. *Cadernos de saude publica*. 2016;32(7). Epub 2016/07/28. Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika.
120. Vorndam V KGLdodviIGDJ, Kuno G, editors. Dengue and dengue hemorrhagic fever—1997. London, United Kingdom: CAB International; 1997. pp. 313–334.



121. Nogueira RMR, Miagostovich MP, Filippis AMBd, Pereira MAS, Schatzmayr HG. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96:925-6.
122. Gubler D J, SGELdodadhfiHA, Cunha J F, editors. *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*. 1988. pp. 291–322.
123. Innis B L NA, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, Hoke C H. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;40:418–427.
124. Halstead SB. Dengue. *The Lancet*.370(9599):1644-52.
125. Chua A, Prat I, Nuebling CM, Wood D, Moussy F. Update on Zika Diagnostic Tests and WHO's Related Activities. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(2):e0005269. Epub 2017/02/06.
126. Pessoa R, Patriota JV, Lourdes de Souza M, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine*. 2016;95(12):e3201. Epub 2016/03/26.
127. Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;63(12):1584-90. Epub 2016/09/01.
128. Ginier M, Neumayr A, Gunther S, Schmidt-Chanasit J, Blum J. Zika without symptoms in returning travellers: What are the implications? *Travel medicine and infectious disease*. 2016;14(1):16-20. Epub 2016/02/16.
129. Taylor RM. Studies on certain viruses isolated in the tropics of Africa and South America; their growth and behavior in the embryonated hen egg. *J Immunol*. 1952;68(4):473-94. Epub 1952/04/01.
130. Digoutte JP, Calvo-Wilson MA, Mondo M, Traore-Lamizana M, Adam F. Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. *Research in virology*. 1992;143(6):417-22. Epub 1992/11/01.
131. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(1):33-42. Epub 2002/03/15.
132. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *The Journal of general virology*. 1978;40(3):531-44. Epub 1978/09/01.
133. Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1987;36(1):153-9. Epub 1987/01/01.
134. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1982;31(4):830-6. Epub 1982/07/01.
135. Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1984;33(1):158-65. Epub 1984/01/01.
136. American Committee on Arthropod-Borne Viruses SoIaCAIoacr-bvrotptEID.
137. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51. Epub 1992/03/01.
138. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(1):165-256. Epub 2006/01/19.

139. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(16):7276-80. Epub 1991/08/15.
140. Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;61:67-99. Epub 2004/01/13.
141. Gaunt MW, Gould EA. Rapid subgroup identification of the flaviviruses using degenerate primer E-gene RT-PCR and site specific restriction enzyme analysis. *Journal of virological methods*. 2005;128(1-2):113-27. Epub 2005/06/02.
142. Meiyu F, Huosheng C, Cuihua C, Xiaodong T, Lianhua J, Yifei P, et al. Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. *Microbiology and immunology*. 1997;41(3):209-13. Epub 1997/01/01.
143. Chow VT, Seah CL, Chan YC. Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. *Archives of virology*. 1993;133(1-2):157-70. Epub 1993/01/01.
144. Fulop L, Barrett AD, Phillipotts R, Martin K, Leslie D, Titball RW. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. *Journal of virological methods*. 1993;44(2-3):179-88. Epub 1993/10/01.
145. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(5):1922-7. Epub 2001/04/28.
146. Chang GJ, Trent DW, Vorndam AV, Vergne E, Kinney RM, Mitchell CJ. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(2):477-83. Epub 1994/02/01.
147. Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Research in virology*. 1994;145(2):93-104. Epub 1994/03/01.
148. Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, Ndiaye M, Alpha Sall A. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008;43(1):96-101. Epub 2008/08/05.
149. Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology journal*. 2013;10:311. Epub 2013/10/24.
150. Balm MN, Lee CK, Lee HK, Chiu L, Koay ES, Tang JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *Journal of medical virology*. 2012;84(9):1501-5. Epub 2012/07/25.
151. Parry JV. Simple and reliable salivary tests for HIV and hepatitis A and B virus diagnosis and surveillance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;694:216-33. Epub 1993/09/20.
152. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerging infectious diseases*. 2015;21(1):84-6. Epub 2014/12/23.
153. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(6):2047-52. Epub 2012/03/24.
154. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile Virus in Urine During Acute Infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2013;208(7):1086-92.

155. Roit L, Lenner, T. (1983). Oral immunity of oral disease. Second Edition. P279-304, Blackwell, Oxford.
156. Anders KL NN, Quyen NT et al (2012) An evaluation of dried blood spots and oral swabs as alternative specimens for the diagnosis of dengue and screening for past dengue virus exposure. *Am J Trop Med Hyg* 87(1):165–170.
157. Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014-2015. *Emerging infectious diseases*. 2017;23(4). Epub 2017/01/14.
158. Johnson AJ MD, Karabatsos N, Roehrig JT. 2000. Detection of anti-arboviral immunoglobulin G by using a monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 38:1827–1831
159. Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J*. 2013;195(1):33-40. Epub 2012/10/06.
160. Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Advances in virus research*. 2003;61:3-65. Epub 2004/01/13.
161. Calisher CH KN, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 70:37–43.
162. Johnson BW, Kosoy O, Hunsperger E, Beltran M, Delorey M, Guirakhoo F, et al. Evaluation of chimeric Japanese encephalitis and dengue viruses for use in diagnostic plaque reduction neutralization tests. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16(7):1052-9. Epub 2009/05/22.
163. . Aubry M, Finke J, Teissier A, Roche C, Brout J, Paulous S, Desprès P, Cao-Lormeau VM, Musso D. 2015. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. *Int J Infect Dis* 41:11–12. 10.1016/j.ijid.2015.10.005.
164. Aubry A TA, Roche C, Teururai S, Paulous S, Desprès P, Musso D, Mallet HP, Merceron S, Huart M, Sicard S, DeparisX, Cao-Lormeau VM. 2015. Serosurvey of dengue, Zika and other mosquito-borne viruses in French Polynesia, abstr 765. 64th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Philadelphia, PA, 25 to 29 October 2015. .
165. Theiler M, Casals J. The serological reactions in yellow fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1958;7(6):585-94. Epub 1958/11/01.
166. Bres P, Lacan A, Diop I, Michel R, Peretti P, Vidal C. [Arboviruses in Senegal. Serological Survey]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*. 1963;56:384-402. Epub 1963/05/01. Les arbovirus au s'en'egal. enqu ete s'erologique.
167. Buckley A, Gould EA. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *The Journal of general virology*. 1988;69 ( Pt 8):1913-20. Epub 1988/08/01.
168. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*. 2015;89(17):8880-96. Epub 2015/06/19.
169. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clinical neuropathology*. 1997;16(4):204-8. Epub 1997/07/01.
170. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum. *PLoS neglected tropical diseases*. 2008;2(8):e280. Epub 2008/08/21.
171. BRASIL. Ministério da Saúde. Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. *Boletim Epidemiológico* v, n. 26, p. 1-7, 2015b. Disponível em: Acesso em: 05 mar. 2016.

172. PAHO/WHO. Pan American Health Organization/World Health Organization (WHO). Epidemiological Alert: Zika virus infection - 7 May 2015. Washington DCPWbD.
173. Oster AM, Brooks JT, Stryker JE, Kachur RE, Mead P, Pesik NT, et al. Interim Guidelines for Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus - United States, 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(5):120-1. Epub 2016/02/13.
174. Tourinho RS, de Almeida AJ, Amado LA, Villar LM, Castro AR, de Paula VS. Could oral fluid be used to evaluate anti-hepatitis A virus status in individuals living in difficult-to-access areas? *Vaccine*. 2012;30(45):6421-6. Epub 2012/08/23.
175. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing V, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
176. 319-33. FMBaàpeVSPLdFTdrdp.
177. Elsana S, Sikuler E, Yaari A, Shemer-Avni Y, Abu-Shakra M, Buskila D, et al. HCV antibodies in saliva and urine. *Journal of medical virology*. 1998;55(1):24-7. Epub 1998/05/15.
178. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Squarzon L, Sinigaglia A, Ulbert S, et al. Isolation of West Nile virus from urine samples of patients with acute infection. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(9):3411-3. Epub 2014/06/22.
179. Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;101(7):738-9. Epub 2007/04/10.
180. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvao LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virology journal*. 2010;7:22. Epub 2010/01/29.
181. Fourcade C, Mansuy JM, Dutertre M, Delpèch M, Marchou B, Delobel P, et al. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2016;82:1-4. Epub 2016/07/09.
182. Lamb LE, Bartolone SN, Kutluay SB, Robledo D, Porras A, Plata M, et al. Advantage of urine based molecular diagnosis of Zika virus. *International urology and nephrology*. 2016;48(12):1961-6. Epub 2016/08/29.
183. Campos Rde M, Cirne-Santos C, Meira GL, Santos LL, de Meneses MD, Friedrich J, et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2016;77:69-70. Epub 2016/02/28.
184. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Preliminary Report. *New England Journal of Medicine*. 0(0):null.
185. Rabe IB, Staples JE, Villanueva J, Hummel KB, Johnson JA, Rose L, et al. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(21):543-6. Epub 2016/06/03.
186. Announcement: Guidance for U.S. Laboratory Testing for Zika Virus Infection: Implications for Health Care Providers. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2016;65(46):1304. Epub 2016/11/24.
187. Landry ML, St George K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2017;141(1):60-7. Epub 2016/10/21.
188. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(28):7852-7. Epub 2016/06/30.

189. Gyurech D, Schilling J, Schmidt-Chanasit J, Cassinotti P, Kaeppli F, Dobec M. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss medical weekly*. 2016;146:w14296. Epub 2016/02/10.
190. Mason PW. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology*. 1989;169(2):354-64. Epub 1989/04/01.
191. Falconar AK. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Archives of virology*. 1997;142(5):897-916. Epub 1997/01/01.
192. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(3):1053-7. Epub 2000/03/04.
193. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(2):376-81. Epub 2002/02/05.
194. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016;353(6301):823-6. Epub 2016/07/16.
195. Scholzen A, Sauerwein RW. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in Plasmodium infection. *Trends in parasitology*. 2013;29(5):252-62. Epub 2013/04/09.
196. Van Esbroeck M, Meersman K, Michiels J, Arien KK, Van den Bossche D. Letter to the editor: Specificity of Zika virus ELISA: interference with malaria. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(21). Epub 2016/06/03.
197. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(50). Epub 2016/12/23.

## 10. APENDICE



Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2015.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Para: Dra. Patrícia Brasil

Prezada Dra. Patrícia,

Com referência ao projeto "Detecção de formas não usuais de dengue a partir da vigilância de síndrome febril aguda", CAAE 0026.0.009.000-07, aprovado por este Comitê em 04/05/2007 – Parecer 027/2007, acusamos o recebimento da NOTIFICAÇÃO de inclusão de amostras de saliva e urina e eventualmente lágrima, para investigação de novas viroses como a infecção por Zika, recentemente demonstrada no soro dos participantes do projeto mencionado. Foi apresentado um novo TCLE (Versão de 20 de outubro de 2015).

Este documento foi apreciado e aprovado por esta Coordenação na presente data.

Atenciosamente,

D<sup>ra</sup> Lúcia Ferreira Camilo-Costa  
Coordenadora do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
Mat. SIAPE 983709620  
IPCC / FIOCRUZ

CAAE: 0026.0.009.000-07

VL