

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Taina Machado Martins

**ABORDAGEM SOBRE OS KITS EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ZIKA NAS DIFERENTES METODOLOGIAS-
UM ESTUDO DE REVISÃO.**

Rio de Janeiro

2018

Taina Machado Martins

**ABORDAGEM SOBRE OS KITS EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ZIKA NAS DIFERENTES METODOLOGIAS-
UM ESTUDO DE REVISÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária.

Tutora: Marisa Coelho Adati

Preceptores: Álvaro da Silva Ribeiro

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Martins, Taina Machado

Abordagem sobre os kits empregados no diagnóstico laboratorial da zika nas diferentes metodologias- um estudo de revisão. / Luiza Vasconcellos. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

60 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Tutora: Marisa Coelho Adati.

Preceptores: Álvaro da Silva Ribeiro, Helena Cristina Balthazar Guedes Borges.

1. Kit de Reagentes para Diagnóstico. 2. Zika virus. 3. Sensibilidade e Especificidade. I. Título

Taina Machado Martins

**ABORDAGEM SOBRE OS KITS EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ZIKA NAS DIFERENTES METODOLOGIAS-
UM ESTUDO DE REVISÃO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 20/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Renata Faria de Carvalho (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Jarbas Emílio dos Santos (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Álvaro da Silva Ribeiro (Mestre)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

À Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Ao meu pai Antônio, minha mãe Alice e meu irmão Cainã pelo amor, incentivo, apoio incondicional, e por não terem medido esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu noivo Luithiano, pessoa com quem amo partilhar a vida, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Obrigada pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria durante esses dois anos.

À minha tutora, Marisa Coelho Adati, que me deu todo o suporte com suas correções e incentivo. Obrigada por seus ensinamentos e confiança no meu trabalho.

À equipe do Laboratório de Sangue e Hemoderivados/DI/INCQS por compartilharem comigo todos os momentos de alegrias e dificuldades durante todo esse tempo.

Aos fiscais da SubVisa do Rio de Janeiro, do setor de Saúde do Trabalhador, por terem me acolhido com tanto carinho e me ensinado ainda mais sobre Vigilância Sanitária.

E, por fim, a todos os meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

RESUMO

O Zika Vírus (ZIKV), teve recentemente uma rápida disseminação e foi vinculado à Síndrome de Guillain-Barré e ao nascimento de bebês com microcefalia, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar Emergência de Saúde Pública de importância Internacional. Diante deste cenário, ensaios destinados ao diagnóstico da doença foram disponibilizados no mercado nacional e internacional. O presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão integrativa da literatura científica, referente à qualidade dos *kits* utilizados no diagnóstico da infecção pelo ZIKV em suas diferentes metodologias, frente aos parâmetros de sensibilidade e especificidade. A busca foi realizada nas bases de dados Scielo, Scopus, PubMed e Google Acadêmico, e os artigos selecionados entre 2007 e 2017, em língua portuguesa e inglesa tendo como palavras-chave: “Zika virus”, “Diagnóstico”, “Kits”, “Teste Rápido”, “PCR”, “ELISA”, “Sensibilidade”, “Especificidade”, “Aedes”, “Flavivírus” e “Qualidade”. Os ensaios disponíveis para diagnóstico laboratorial de Zika são PCR em transcriptase reversa em tempo real (rRT-PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA), detecção de anticorpos neutralizantes de ZIKV via teste de neutralização de redução de placa (PRNT), imuno-histoquímica, imunofluorescência, teste rápido (imunocromatográfico) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Dos artigos selecionados, nem todos os ensaios foram abordados, apesar de já estarem disponíveis comercialmente, como teste rápido e imunofluorescência. Um total de sete artigos foram avaliados: quatro empregando o teste ELISA (abordando IgM; IgM/IgG; IgM, IgG e IgM/IgG), dois RT-PCR e um TMA. A sensibilidade dos *kits* ELISA variou de 23,7% a 88,2% para IgG; 20,7% a 58,8% para IgM; 39,5% a 100,0% para IgM/IgG. A especificidade foi de 95,2% a 100,0% para IgG; 95,7% a 100,0% para IgM; 92,5% a 99,8% para IgM/IgG. O limite de detecção para RT-PCR foi de 7 a 140 cópias/reação e 100% de especificidade. Para TMA foi observado 94,7% de sensibilidade e 94,8% de especificidade. Esta revisão mostrou valores aceitáveis ou até abaixo do limite de sensibilidade e especificidade dos *kits* analisados quando comparados aos parâmetros sugeridos pela OMS, o que pode levar a um diagnóstico incorreto colocando a saúde da população em risco. Vale ressaltar o baixo número de artigos que abordam os valores dos atributos de sensibilidade e especificidade em relação ao vasto número de artigos sobre a infecção pelo ZIKV.

Palavras-chave: Kits. Zika virus. Diagnóstico. Sensibilidade. Especificidade.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) has recently spread rapidly throughout the world and has been linked to Guillain-Barré syndrome and the birth of infants with microcephaly, leading the World Health Organization (WHO) to declare Public Health Emergency of International Importance. In view of this scenario, tests destined to the diagnosis of the disease were made available in the national and international market. The present work aimed to carry out an integrative review of the scientific literature regarding the quality of the kits used in the diagnosis of ZIKV infection in its different methodologies, against sensitivity and specificity parameters. The search was carried out in the databases Scielo, Scopus, PubMed and Academic Google, and the articles selected between 2007 and 2017, in Portuguese and English, with the following keywords: "Zika virus", "Diagnosis", "Kits" PCR ", " ELISA ", " Sensitivity ", " Specificity ", " Aedes ", " Flavivirus "or" Quality ". The available tests for laboratory diagnosis of Zika are real-time reverse transcriptase (rRT-PCR), transcription-mediated amplification (TMA), detection of neutralizing antibodies of ZIKV via plaque reduction neutralization test (PRNT), immuno-histochemistry, immunofluorescence, rapid test (immunochromatographic) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Of the selected articles, not all trials were addressed, although they were already commercially available, such as rapid test and immunofluorescence. A total of seven articles were evaluated: four using the ELISA test (IgM; IgM / IgG; IgM, IgG and IgM / IgG), two RT-PCR and one TMA. The sensitivity of the ELISA kits ranged from 23.7% to 88.2% for IgG; 20.7% to 58.8% for IgM; 39.5% to 100.0% for IgM / IgG. The specificity was 95.2% to 100.0% for IgG; 95.7% to 100.0% for IgM; 92.5% to 99.8% for IgM / IgG. The detection limit for RT-PCR was 7 to 140 copies / reaction and 100% specificity. For TMA, 94.7% sensitivity and 94.8% specificity were observed. This review showed values acceptable or even below the sensitivity and specificity limit of the analyzed kits when compared to the parameters suggested by WHO, which may lead to an incorrect diagnosis placing the health of the population at risk. It is worth emphasizing the low number of articles that address the values of sensitivity and specificity attributes in relation to the vast number of articles on ZIKV infection.

Keywords: Kits. Zika virus. Diagnosis. Sensitivity. Specificity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	12
Quadro 1	Algumas Arboviroses emergentes e re-emergentes no Brasil.....	14
Quadro 2	Distribuição e rota de introdução de diferentes virus de importância clínica.....	14
Figura 2	Genoma do ZIKV.....	15
Figura 3	Estrutura do ZIKV.....	16
Figura 4	Ciclo de vida do ZIKV.....	18
Figura 5	Mapa de pontos de ocorrência para <i>Ae. aegypti</i>	19
Figura 6	Mapa de pontos de ocorrência para <i>Ae. albopictus</i>	19
Figura 7	Os padrões de propagação do ZIKV e a distribuição global do mosquito <i>Aedes</i>	23
Figura 8	Casos prováveis de febre pelo ZIKV, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 e 2017.....	28
Figura 9	Países e territórios com casos confirmados do ZIKV (transmissão autóctone), 2014-2015 e taxas de microcefalia por estado no Brasil, 2010-2014 e 2015.....	31
Figura 10	Viremia da infecção pelo ZIKV.....	33

Figura 11	Algoritmo para detecção do ZIKV.....	34
Figura 12	Transcrição do RNA a DNA	36
Figura 13	Esquema de uma reação de PCR.....	37
Figura 14	Ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA).....	38
Figura 15	Placa de 96 poços utilizada em ELISA.....	39
Figura 16	Esquema do funcionamento de um teste rápido de fluxo lateral.....	40
Figura 17	Imunohistoquímica (IHQ).....	42
Figura 18	Fluxograma de seleção de artigos na presente revisão integrativa.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genoma das cepas H/PF/2013 (Polinésia Francesa) e protótipo MR 766 (África) do ZIKV.....	17
Tabela 2	Cepas de ZIKV utilizadas no estudo de Faye et al., 2013.....	21
Tabela 3	Mosquitos coletados como potenciais vetores infectados por ZIKV, Ke´dougou, 2011.....	22
Tabela 4	Países com infecção por ZIKV relatadas (até fevereiro de 2016).....	23
Tabela 5	Número de casos prováveis e incidência de febre pelo ZIKV, por região e Unidade da Federação, da Semana 01 até a Semana Epidemiológica 52, Brasil, 2016 e 2017.....	29
Tabela 6	Desempenho de um teste diagnóstico.....	47
Tabela 7	Desempenho esperado para sensibilidade e especificidade na detecção de ZIKV.....	48
Tabela 8	Apresentação da síntese de artigos incluídos na presente revisão integrativa.....	49

LISTA DE SIGLAS

aa	Aminoácido
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i>
cDNA	DNA complementar
CHIKV	Chikungunya Vírus
DENV	Dengue Vírus
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Envelope
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GCE	Cópias do Genoma Equivalente
hab	habitantes
HPA	Teste de Proteção de Hibridação
IC	Controle Interno
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHQ	Imunohistoquímica
JEV	Encefalite Japonesa
kB	Kilobase
MAC-ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
mRNA	RNA Mensageiro
NAT	<i>Nucleic Acid Amplification Technology</i>
NCR	Região Não-Codificadora
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
PrM	Pré-membrana / membrana
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placas
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase via Transcriptase

	Reversa
rRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em tempo real
RNA	Ácido Ribonucléico
SD	Desvio Padrão
SE	Semana Epidemiológica
SLEV	Encefalite de Saint Louis
ssRNA	RNA fita simples senso negativo
TMA	Amplificação Mediada por Transcrição
TPP	<i>Target Product Profile</i>
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
WNV	Vírus do Nilo Ocidental
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Distribuição dos arbovírus no mundo	13
1.2	O Zika vírus	14
1.3	O vetor	18
1.4	Epidemiologia e transmissão do Zika vírus	21
1.4.1	Yap (Oceania)	23
1.4.2	Polinésia Francesa.....	23
1.4.3	Nova Caledônia, Ihas Cook e Iha de Páscoa.....	24
1.4.4	Chegada do vírus nas Américas.....	24
1.4.4.1	<i>No Brasil</i>	25
1.4.5	Patologias associadas à doença.....	27
1.4.6	Formas de transmissão da doença.....	29
1.4.7	Detecção do Zika Vírus em diferentes fluidos corporais.....	29
1.5	Diagnóstico laboratorial	30
1.5.1	Testes Moleculares.....	32
1.5.1.1	<i>Amplificação de Ácidos Nucleicos</i>	33
1.5.2	Testes Sorológicos.....	35
1.5.2.1	<i>ELISA</i>	35
1.5.2.2	<i>Teste de Neutralização pela redução de placas (PRNT)</i>	37
1.5.2.3	<i>Teste Rápido</i>	37
1.5.2.4	<i>Imunofluorescência</i>	39
1.5.2.5	<i>Imunohistoquímica (IHQ)</i>	39
1.6	Justificativa	40
2	OBJETIVO	41
2.1	Objetivo geral	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	METODOLOGIA	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Da seleção dos artigos	44
4.2	Dos atributos de sensibilidade e especificidade	45
4.3	Dos artigos selecionados	47
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

No século XXI, no Brasil e no mundo as doenças transmitidas por vetores ainda são um grande desafio levando em conta a associação da carga individual e social como também a complexidade das ações para seu controle (PENNA, 2003). Doenças como Dengue, Malária, Doença de Chagas entre outras, são definidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como emergentes e outras, como a Febre Amarela, como doenças persistentes (OMS, 1999).

Dentre as doenças emergentes, destaca-se a Zika, transmitida por vetores, como o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo o mosquito *Aedes aegypti* o principal vetor, um artrópode, espécie da família Culicidae. Porém, o vírus também pode ser transmitido pelo *Aedes albopictus*, não nativo das Américas, introduzido no Brasil a partir da África, provavelmente no início do século XIX, que encontrou um meio ambiente propício e adequado à sua sobrevivência e reprodução, Figura 1. Após ações governamentais o mosquito *Aedes aegypti* foi erradicado do país em 1957, sendo reintroduzido em 1967, e novamente eliminado em 1973. Em 1976, foi reintroduzido no país, paulatinamente crescendo até os dias de hoje (TEIXEIRA e BARRETO, 1996; PENNA, 2003).

Figura 1 - Mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: <http://circuitomt.com.br/circuitomt01/2014/2015/Dezembro/05-12-201/dengue.jpg>.

O Zika Vírus (ZIKV), um arbovírus, é transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *A. Albopictus* (LUZ, 2015). Este vírus, atualmente responsável por uma arbovirose emergente em todo o mundo, foi isolado do sangue de um macaco Rhesus que vivia em uma floresta conhecida como Zika, em Uganda. A partir disto, estudos sorológicos se iniciaram em 1952 (Uganda e Tanzânia), nos quais foi detectada também a infecção em seres humanos (DICK et al, 1952; MAGUIÑA e GALÁN-RODAS, 2016).

A doença, denominada Zika, significa área coberta de grama ou vegetação e foi descoberta no ano de 1947 em primatas não humanos na África durante uma investigação sobre febre amarela. É caracterizada por sintomas como febre moderada, erupção cutânea, conjuntivite, vertigem, distúrbio digestivo, dores nas articulações e musculares, mal estar, dor retro-orbitária e dor de cabeça que dura em torno de 2 a 7 dias (DIAGNE et al, 2015).

1.1 Distribuição dos arbovírus no mundo

Os arbovírus (*arthropod-borne viruses*) foram assim classificados por infectarem vertebrados e invertebrados, possuindo distribuição geográfica por todos os continentes, tanto em regiões temperadas como tropicais, tendo na floresta amazônica uma das maiores reservas do mundo. As favoráveis condições climáticas, a grande diversidade da fauna e desmatamentos, assim como a abundante variedade de artrópodes hematófagos e vertebrados silvestre constituem os elementos fundamentais para a manutenção desses vírus na floresta (CASSEB et al, 2013).

Esta denominação, arbovírus, foi designada por meio da recomendação do Subcomitê Internacional para Nomenclatura Viral, em 1962, para os que são mantidos na natureza em ciclos envolvendo artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados. Estima-se que haja mais de 545 espécies de arbovírus, dentre essas, mais de 150 relacionadas com doenças em seres humanos, denominada arbovirose (VASCONCELOS et al, 2001).

A maioria dos arbovírus, estudados segundo as suas propriedades físico-químicas, encontra-se distribuída em seis famílias, que são: *Bunyaviridae*; *Flaviviridae*; *Reoviridae*; *Rhabdoviridae*; *Togaviridae*; *Asfaviridae* (HADDOW et al,

2012). A família mais importante é a *Flaviviridae* composta por 03 gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*, ressaltando o gênero *Flavivirus* com cerca de 39 espécies causadoras de manifestações clínicas desde doença febril indiferenciada, moderada ou grave, erupções cutâneas e artralgia, até síndrome neurológica e síndrome hemorrágica (LOPES et al, 2014). Deste gênero, destacam-se alguns vírus de importância médica: vírus da Febre amarela (YFV), Dengue (DENV), Febre do Nilo Ocidental (WNV), Encefalite de Saint Louis (SLEV), Encefalite japonesa (JEV) e Zika (ZIKV) conforme Quadros 1 e 2 (LOPES et al, 2014).

Quadro 1 - Algumas Arboviroses emergentes e re-emergentes no Brasil.

FAMÍLIA	VÍRUS	SIGLA	MANIFESTAÇÃO CLÍNICA
FLAVIVIRIDAE	Dengue	DENV	Febre branda ou Hemorrágica
	Nilo Ocidental	WNV	Meningite e Encefalite
	Encefalite de Saint Louis	SLEV	Meningite e Encefalite
	Ilhéus	ILHV	Doença febril e encefalite
	Zika	ZIKV	Doença febril e microcefalia

Fonte: Adaptado de Lopes et al, 2014.

Quadro 2 - Distribuição e rota de introdução de diferentes vírus de importância clínica.

VÍRUS	REGIÃO DE RISCO	REGIÃO ENDÊMICA	ROTA DE INTRODUÇÃO
DENGUE	Sul da Europa	Hemisfério Sul	Pessoas infectadas
ZIKA	Europa, Américas	África, Ásia, Brasil	Pessoas infectadas

Fonte: Adaptado de Kilpatrick e Randolph, 2012.

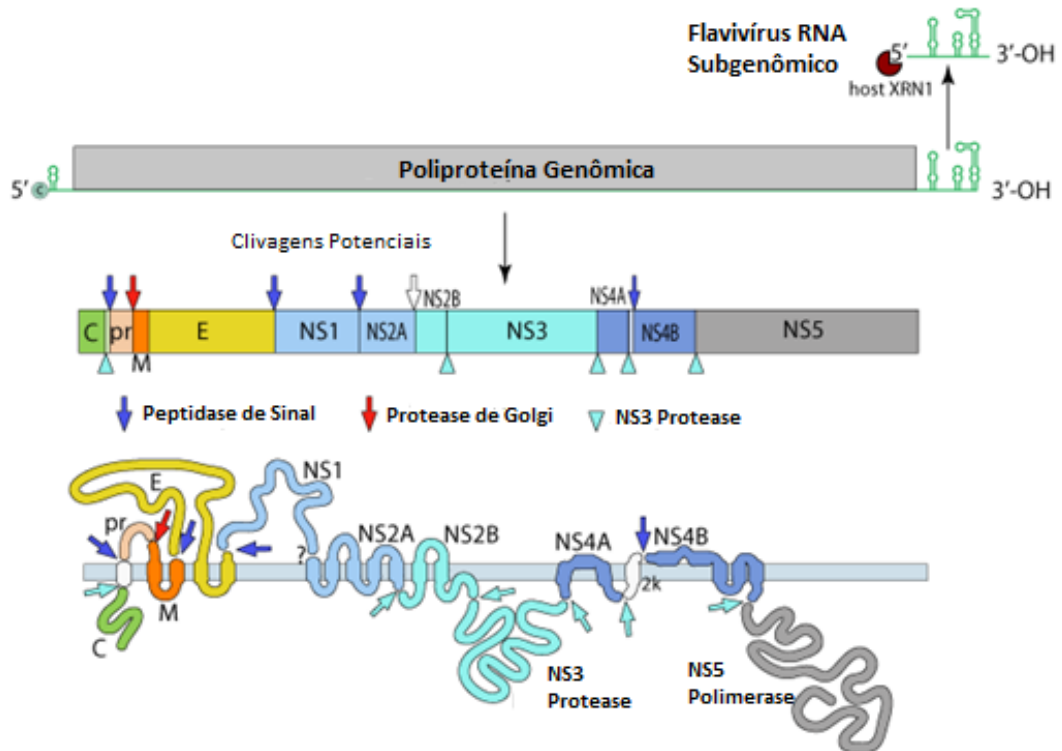
1.2 O Zika Vírus

O ZIKV, um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, é transmitido pela picada noturna dos mosquitos *Aedes aegypti* e *A. Albopictus*. Alguns estudos relatam três linhagens principais do ZIKV, uma original da Ásia e duas da África (LUZ, 2015).

O genoma do vírus é formado por Ácido Ribonucléico (RNA) fita simples de polaridade positiva, contendo aproximadamente 11 Kilobase (Kb). A poliproteína codificada é traduzida e processada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais (proteína C do capsídeo, pré-membrana/membrana (PrM),

envolpe (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que desempenham funções expressão e regulação viral como a replicação, virulência e patogenicidade, Figuras 2 e 3 (SANTOS et al, 2008; MUSSO e GUBLER, 2016).

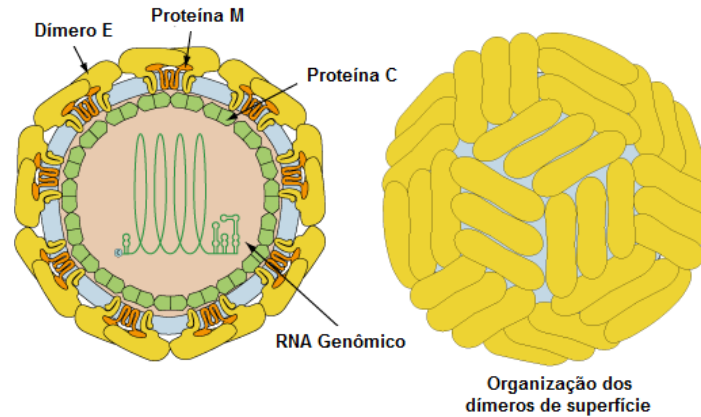
Figura 2 - Genoma do ZIKV.



Fonte: <http://viralzone.expasy.org/6756>

Sua estrutura é icosaédrica e seu genoma possui também duas regiões não codificantes, NCR 5' e 3' NCR. Compreende um único quadro de leitura aberta longa: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Além disso, as proteínas NS1, NS3 e NS5 são grandes e altamente conservadas, enquanto as proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B são hidrofóbicas e menores, Figuras 2 e 3 (FAYE et al, 2014).

Figura 3 - Estrutura do ZIKV.



Fonte: <http://viralzone.expasy.org/6756>

O genoma completo do ZIKV (cepa protótipo – MR-766) foi sequenciado pela primeira vez em 2007. Possui genoma com 10.794 nucleotídeos e sua janela aberta de leitura codifica 3419 aminoácidos (aa), Tabela 1 (KUNO e CHANG, 2007).

Tabela 1 - Genoma das cepas H/PF/2013 (Polinésia Francesa) e protótipo MR 766 (África) do ZIKV.

Gene ou Região genômica	Medidas	
	Estirpe do protótipo MR 766 africano	Polinésia Francesa H/PF/2013
5' NCR	106 nt	107 nt
Capsid	122 aa	105 aa
PrM	178 aa	187 aa
Envelope	500 aa	505 aa
NS1	342 aa	352 aa
NS2A	226 aa	217 aa
NS2B	130 aa	139 aa
NS3	617 aa	619 aa
NS4A	127 aa	127 aa
NS4B	252 aa	255 aa
NS5	902 aa	904 aa
3' NCR	428 nt	428 nt
Genoma Completo	10,794 nt	10,617 nt

nt = nucleotídeos

aa = aminoácidos

Fontes:

Africano – Adaptado de Kuno et al., 2007.

H/PF/2013 - Adaptado de Barontiet al., 2014.

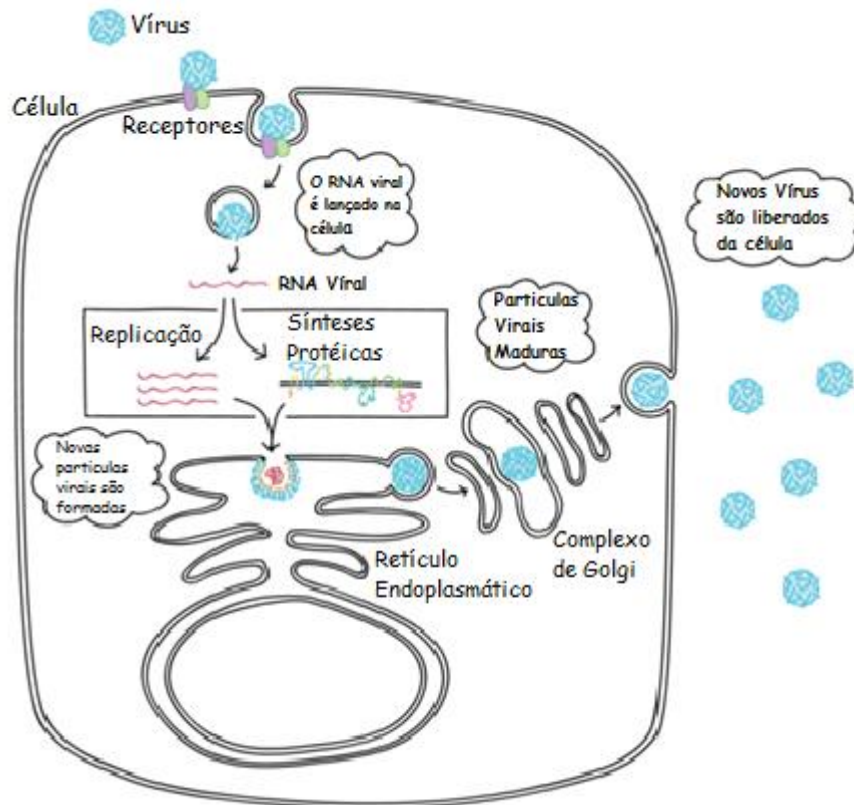
Um aumento da virulência foi observado nas cepas das epidemias de Yap, Polinésia Francesa e três cepas de ZIKV do Senegal, a partir de uma glicosilação na posição 154 do envelope do vírus. Esta modificação na glicoproteína, descrita em vários flavivírus, não foi observada na cepa do protótipo ZIKV MR 766 (LANCIOTTI et al, 2008; BARONTI et al, 2014).

Em relação à semelhança entre cepas dos genomas sequenciados e cepas encontradas no Brasil, Colômbia, Porto Rico, Guatemala e Ilha de Páscoa, todas demonstraram mais de 99% de identidade de nucleotídeos com as cepas da Polinésia Francesa (MUSSO e GUBLER, 2016).

O processo replicativo do ZIKV é semelhante ao dos flavivírus já descritos e se inicia nas células dendríticas, no local do repasto sanguíneo e, na sequência, se espalha para o nódulos linfáticos e corrente sanguínea. Normalmente, a replicação ocorre no citoplasma, no entanto, sugere-se que as proteínas do complexo replicativo do ZIKV podem ser transportadas para o núcleo das células infectadas (MOTA et al, 2016).

Segundo Smit et al (2011), a proteína E promove a ligação do vírus aos receptores na membrana do hospedeiro e após esta fase, o vírus é internalizado via endocitose. O RNA viral é liberado para o citoplasma após a fusão das membranas viral e hospedeira. O ssrNA traduzido e a poliproteína resultante é dividida em várias proteínas estruturais e não estruturais (proteínas C, prM, E e NS). A replicação ocorre na superfície do retículo endoplasmático. A transcrição e a replicação do dsDNA resultam na formação de novos mRNAs virais e ssrNA, respectivamente. Após a montagem viral no retículo endoplasmático, ocorre o transporte para o aparelho de Golgi. A proteína prM é clivada, o virion torna-se maduro e sai da célula via exocitose, Figura 4.

Figura 4 - Ciclo de vida do ZIKV.



Fonte: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biology-of-viruses/virus-biology/a/what-is-zika-virus>

1.3 O vetor

A doença é transmitida é pela picada de mosquitos infectados e o ZIKV foi isolado de várias espécies de mosquitos *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti*, encontrado nos trópicos e subtropicais, além do *Aedes albopictus*, estabelecido em parte da Europa, especialmente nos países mediterrâneos, Figuras 5 e 6 (MUSSO et al, 2014).

Figura 5 - Mapa de pontos de ocorrência para *Ae. aegypti*



Fonte: Kraemer et al., 2015.

Figura 6 - Mapa de pontos de ocorrência para *Ae. albopictus*



Fonte: Kraemer et al., 2015.

Estudos recentes sugeriram que outras espécies de mosquitos poderiam transmitir infecções por ZIKV, como o *Culex sp.*, amplamente observado em áreas tropicais (AYRES, 2016).

Faye et al (2013) relataram uma lista de espécies de mosquitos, das quais cepas do ZIKV foram isoladas, incluindo espécies como *Aedes*, *Anopheles coustani*, entre outros, Tabela 2.

Tabela 2 - Cepas de ZIKV utilizadas no estudo de Faye et al., 2013.

Referência	Hospedeiro	País	Ano de Isolamento
ArD 7117	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Senegal	1968
ArD 9957	<i>Aedes Furcifer</i>	Senegal	1969
ArD 30101	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Senegal	1979
ArD 30156	<i>Aedes Furcifer</i>	Senegal	1979
ArD 30332	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Senegal	1979
HD 78788	<i>Humain</i>	Senegal	1991
ArD 127707	<i>Aedes Furcifer</i>	Senegal	1997
ArD 127710	<i>Aedes Taylori</i>	Senegal	1997
ArD 127984	<i>Aedes Furcifer</i>	Senegal	1997
ArD 127987	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Senegal	1997
ArD 127988	<i>Aedes Furcifer</i>	Senegal	1997
ArD 127994	<i>Aedes Taylori</i>	Senegal	1997
ArD 128000	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Senegal	1997
ArD 132912	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	1998
ArD 132915	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	1998
ArD 141170	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2000
ArD 142623	<i>Anopheles Coustani</i>	Senegal	2000
ArD 149917	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2001
ArD 149810	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2001
ArD 149938	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2001
ArD 157995	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2001
ArD 158084	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2001
ArD 165522	<i>Aedes Vittatus</i>	Senegal	2002
ArD 165531	<i>Aedes Dalzieli</i>	Senegal	2002
ArA 1465	<i>Aedes Africanus</i>	Costa do Marfim	1980
ArA 27101	<i>Aedes Opok</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 27290	<i>Aedes Opok</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 27106	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 27096	<i>Aedes Africanus</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 27407	<i>Aedes Africanus</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 27443	<i>Muci Graham</i>	Costa do Marfim	1990
ArA 506/96	<i>Aedes Vittatus</i>	Costa do Marfim	1996
ArA 975-99	<i>Aedes Aegypti</i>	Costa do Marfim	1999
ArA 982-99	<i>Aedes Vittatus</i>	Costa do Marfim	1999
ArA 986-99	<i>Aedes Furcifer</i>	Costa do Marfim	1999
ArA 2718	<i>Aedes Luteocephalos</i>	Burkina Faso	1981
ArB 1362	<i>Aedes Africanus</i>	República Centro-Africana	1968
P6-740	<i>Aedes Aegypti</i>	Malasia	1966

Fonte: Adaptado de Faye et al., 2013.

Em 2014, foi observada a detecção ZIKV em dez espécies do gênero *Aedes*, além de *Mansonia uniformis*, *Anopheles coustani* e *Culex perfuscus*. Diallo et

al (2014) por meio do ensaio RT-PCR, mostraram cepas encontradas em mosquitos provenientes de diversas partes do Senegal como podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Mosquitos coletados como potenciais vetores infectados por ZIKV, Ke´dougou, 2011.

Espécies	Total Coletado	Proporção da Coleta (%)	Fêmeas Coletadas	Proporção da Coleta (%)	Amostras de Fêmeas Positivas	Taxa Mínima de Infecção
<i>Aedes aegypti</i>	250	2.22	245	2.20	1	4.08
<i>Aedes africanus</i>	505	4.49	505	4.54	5	9.90*
<i>Aedes dalzieli</i>	1718	15.27	1718	15.44	2	1.16
<i>Aedes furcifer</i>	2966	26.37	2939	26.42	5**	1.36
<i>Aedes hirsutus</i>	34	0.30	34	0.30	2	58.82*
<i>Aedes luteocephalos</i>	1259	11.19	1259	11.32	5	3.97
<i>Aedes mettalicus</i>	81	0.72	81	0.73	2	24.69*
<i>Aedes taylori</i>	422	3.75	395	3.55	2	5.06
<i>Aedes unilineatus</i>	38	0.34	38	0.34	1	26.31*
<i>Aedes vittatus</i>	1790	15.91	1728	15.53	3	1.74
<i>Anopheles coustani</i>	710	6.31	710	6.38	1	1.41
<i>Culex perfuscus</i>	22	0.19	22	0.20	1	45.45*
<i>Mansonia uniformis</i>	283	2.52	281	2.52	1	3.56
Outros	1169	10.39	1169	10.51	0	
Total	11247		11124		30	

* Estatisticamente Significativamente Maior

** Cinco ZIKAV isolados, incluindo um grupo de machos positivos

Fonte: Adaptado de Diallo et al., 2014.

Contudo, a detecção do vírus em uma amostra contida em um mosquito não o determina como vetor. É preciso provar em laboratório que um organismo é capaz de adquirir o patógeno, mantê-lo e transmití-lo a um hospedeiro (AYRES, 2016).

1.4 Epidemiologia e transmissão do zika vírus

Embora tenha sido relatado que a doença causada pelo ZIKV infecta seres humanos desde o início da década de 1950, o ZIKV foi primeiramente isolado de um humano no ano de 1969. Países com infecções relatadas pelo ZIKV até fevereiro de 2016 podem ser observadas na Tabela 4 (SIMPSON, 1964; CHANG et al, 2016).

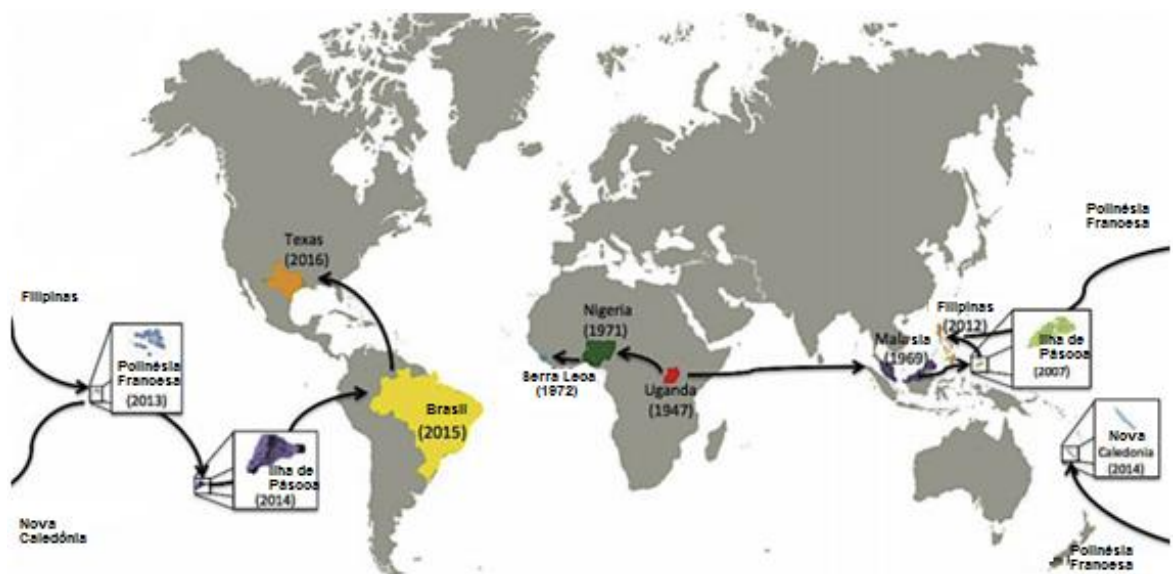
Tabela 4 - Países com infecção por ZIKV relatadas (até fevereiro de 2016).

País	Continente	Primeira Infecção Reportada	Número de Casos	Doenças Associadas
Australia	Oceânia	2015	Relato de caso após mordida de macaco, importação das Ilhas Cook, relato de caso depois de viajar para a Indonésia	Desconhecido
Brasil	América do Sul	2015	440.000 - 1.300.000	4.000 casos de microcefalia
Cambodia	Ásia	2010	Relato de caso	Nenhum
Canada	América do Norte	2013	Relato de caso de transmissão da Tailândia	Desconhecido
Colombia	América do Sul	2015	578 RT-PCR casos confirmados desde 28 de Novembro de 2015	Desconhecido
Ilha de Pascoa	América do Sul	2014	89 Amostras	Desconhecido
El Salvador	América Central	2014	Relato de caso	Desconhecido
Estados Federados da Micronésia	Ásia	2007	70% da População	Desconhecido
Polinésia Francesa	Ásia	2013-14	Relato de caso	Desconhecido
Alemanha	Europa	2013-14	Transmissão em viajante da Malsia, e um viajante da Tailandia	Desconhecido
Indonésia	Ásia	1977	7 casos	Desconhecido
Italia	Europa	2015	Relato de paciente do Brasil e da Polinésia Francesa	Desconhecido
Jamaica	América Central	2015	Relato de caso	Desconhecido
Japão	Ásia	2013-14	2 casos importado da Polinésia Frnacesa	Desconhecido
Maldivas	Ásia	2015	Relato de Caso	Desconhecido
Nova Caledônia	Ásia	2014	2 pacientes com co-infecção com dengue	Desconhecido
Nigéria	África	1954	Primeiro caso de humano infectado, casos adicionais em 1971-75	Desconhecido
Noruega	Europa	2013	Após viajar para o Taiti	Desconhecido
Filipinas	Ásia	2012	Relato de caso de um adolescente de 15 anos de idade	Desconhecido
Ilhas Salomão	Ásia	2012	Relato de Caso	Desconhecido
Suriname	América do Sul	2012	Relato de Caso	Desconhecido
Tailandia	Ásia	2012-14	7 casos	Desconhecido
USA	América do Norte	2015	Casos em Nova York e Texas, até hoje são 31 casos confirmados	Desconhecido
Vanuatu	Ásia	2014	2 casos	Desconhecido
Venezuela	América do Sul	2015	Relato de caso	Desconhecido

Fonte: Adaptado de Chang et al., 2016.

Na linha do tempo abaixo podemos observar a propagação do ZIKV e a distribuição global do mosquito *Aedes*, Figura 7.

Figura 7 - Os padrões de propagação do ZIKV e a distribuição global do mosquito *Aedes*.



Fonte: Chang et al., 2016.

Ao longo dos anos, as infecções humanas causadas pelo ZIKV eram esporádicas e limitadas somente à África e à Ásia. Contudo, em 2007 ocorreu uma epidemia de Zika na Ilha Yap, na Micronésia (DUFFY et al, 2009). Em 2013, um grande surto foi constatado na Polinésia Francesa e chegou à América em 2015, desde então tem se expandido rapidamente (CAO-LORMEAU et al, 2014; IOOS et al, 2014; OEHLER et al, 2013; ZANLUCA et al, 2015). A co-circulação de ZIKV com outros arbovírus, como o vírus da dengue (DENV) e da Chikungunya (CHIKV) também foi documentada na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014).

1.4.1 Yap (Oceania)

Em abril de 2007, foram observados muitos casos de erupção cutânea, conjuntivite e artralgia em Yap, nos Estados Federados da Micronésia. Os resultados dos testes laboratoriais sugeriram que o agente causador era o DENV. Alguns meses depois, as amostras foram enviadas para o *Center for disease control and prevention* (CDC), nos Estados Unidos (EUA), para testes confirmatórios. A partir de um ELISA para pesquisa de anticorpos IgM obtiveram resultados positivos para Dengue. Entretanto, ensaios por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) com primers de flavivírus presentes nas amostras dos pacientes geraram fragmentos de DNA, que quando submetidos à sequência de ácidos nucleicos, demonstraram cerca de 90% de identidade com ZIKV. Logo, pôde-se concluir que o ZIKV foi o real agente causador da epidemia de Yap (LANCIOTTI et al, 2008; CHANG et al, 2016).

1.4.2 Polinésia Francesa

Em 2013, um grande surto foi constatado na Polinésia Francesa, concomitante com uma epidemia de dengue causada pelos sorotipos 1 e 3. Neste surto, pacientes da mesma família apresentaram sintomas clínicos parecidos com os da Dengue, tais como febre por volta de 38°, dor de cabeça, astenia, artralgia e erupção cutânea, além de úlceras aftosas, conjuntivite e tornozelos inchados. Ensaios de RT-PCR foram realizados e geraram resultados negativos tanto para ZIKV quanto para DENV, CHIKV e Vírus do Nilo Ocidental (WNV). Após duas semanas, o soro de outro paciente que apresentava os mesmos sintomas gerou

resultado positivo por uma RT-PCR específica de ZIKV e foi confirmado por sequenciamento de RNA da proteína prM / E região de codificação. Cerca de 19 mil casos suspeitos foram registrados e dos 584 soros testados, 294 foram positivos por RT-PCR ZIKV (CAO-LORMEAU et al, 2014).

1.4.3 Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa

Desde fevereiro de 2014 foram confirmados 1.385 casos de infecção por ZIKV na Nova Caledônia, incluindo 35 casos importados (32 da Polinésia Francesa, 2 de Vanuatu e um das Ilhas Cook) e dois casos de co-infecções (DENV e ZIKV). Nas Ilhas Cook, um pequeno surto foi detectado em março de 2014, após confirmação laboratorial de 18 casos pelo Instituto Louis Malardé, Polinésia Francesa (Institut National de Veille Sanitaire Français). Dos 905 casos relatados, 49 foram confirmados como infecções por ZIKV. Já na Ilha de Páscoa, especulou-se que o surto ali presente foi desencadeado durante o Festival Anual Tapati que atrai pessoas de outras partes do Pacífico, inclusive da Polinésia Francesa onde foram relatados muitos casos de Zika (DUPONT-ROUZEYROL et al, 2015).

No Brasil, também foi relatada co-circulação em Camaçari na Bahia. Os pacientes obtiveram o diagnóstico de uma doença aguda viral e receberam tratamento para uma doença semelhante à dengue. Amostras de soro de 24 pacientes foram obtidas e analisadas na Universidade Federal da Bahia por ELISA específico para IgG e IgM contra DENV, e por RT-PCR para detectar DENV, CHIKV, WNV, Vírus Mayaro e ZIKV. As amostras de sete pacientes foram positivas para ZIKV, três positivas para CHIKV e todas as amostras foram negativas por RT-PCR para DENV, Vírus Mayaro e WNV (CAMPOS et al, 2015).

O primeiro caso de transmissão autóctone de ZIKV confirmado foi na Ilha de Páscoa, em fevereiro de 2014, no sudeste do Oceano Pacífico. Após alguns meses, o primeiro caso de transmissão autóctone por ZIKV foi confirmado no Brasil. O vírus identificado, pertencente ao genótipo asiático, foi detectado por RT-PCR e o resultado confirmado por seqüenciamento de DNA (ZANLUCA et al, 2015).

1.4.4 Chegada do vírus nas Américas

A primeira transmissão autóctone por ZIKV foi confirmada em abril de 2015, na Bahia e em outros estados como Rio Grande do Norte, Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo, entre outros. Nos meses seguintes, a transmissão por ZIKV foi observada em vários países das Américas (Colômbia, em outubro; Guatemala, El Salvador e Suriname, em novembro; Honduras, Panamá, Venezuela, México e Paraguai, em dezembro), nos quais a transmissão provavelmente esteve associada ao vetor *A. aegypti* (DONALISIO et al, 2017).

Em maio de 2015, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgaram um comunicado de alerta sobre infecção por ZIKV que teve como período de duração entre Maio de 2015 e Maio de 2017 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Já no final de janeiro de 2016, a circulação autóctone de ZIKV foi relatada em mais de 20 países no Caribe, América Central, Norte e Sul, e uma epidemia foi relatada em Cabo Verde em Novembro (MUSSO e GUBLER, 2016).

1.4.4.1 No Brasil

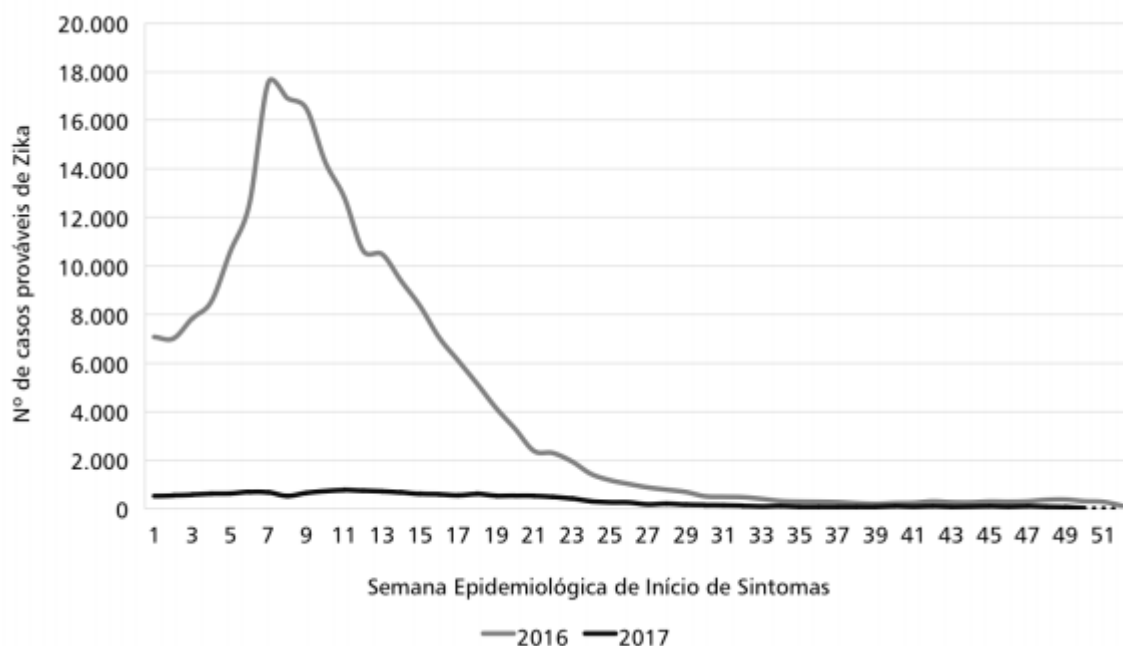
No início de 2015, no Brasil, houve um surto de infecção pelo ZIKV no nordeste do Brasil, e em setembro, começou a ser detectado um acentuado crescimento no número de recém-nascidos com microcefalia nas áreas afetadas pelo ZIKV (SCHULER-FACCINI et al, 2016). Consequentemente, um alerta foi publicado em dezembro, pela OPAS sobre o aumento da ocorrência de microcefalia no Brasil (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em outubro de 2015, 14 estados relataram transmissão autóctone pelo ZIKV, dentre eles os estados de: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Roraima e São Paulo. No mesmo mês, o Ministério da Saúde da Colômbia confirmou o primeiro caso autóctone de infecção por ZIKV em Bolívar (OMS, 2015).

A febre pelo ZIKV foi acrescentada à Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública pela Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016, unificada pela Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde. O Boletim Epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde apresentou os dados de 2017, até a Semana Epidemiológica (SE) 52 (1/1/2017 a 30/12/2017), comparados com igual período do ano de 2016.

Em 2016, SE 1 a 52, foram registrados 216.207 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, e oito óbitos por ZIKV foram confirmados, sendo quatro óbitos no Rio de Janeiro, dois no Espírito Santo, um no Maranhão, e um na Paraíba. Em 2017, da semana 01 até a SE 52, foram registrados 17.452 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, com taxa de incidência de 8,5 casos/100 mil hab; destes, 8.839 (50,6%) foram confirmados. Além disso, foram confirmados laboratorialmente dois óbitos por ZIKV, nos estados de São Paulo e Rondônia. Comparando por regiões observa-se maior taxa de incidência nas regiões Centro-Oeste e Norte: 39,3 casos/100 mil hab. e 12,4 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre as UFs, destacam-se Mato Grosso (65,0 casos/100 mil hab.), Goiás (57,8 casos/100 mil hab.), Tocantins (44,9 casos/100 mil hab.) e Roraima (39,5 casos/100 mil hab.). Estão apresentados na Figura 8 e na Tabela 5 os números de casos prováveis, que são os casos notificados, excluindo-se os descartados por diagnóstico laboratorial negativo, com coleta oportuna ou diagnosticados para outras doenças (BRASIL, 2018).

Figura 8 - Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2016 e 2017.



Fonte: BRASIL, 2018.

Tabela 5 - Número de casos prováveis e incidência de febre pelo ZIKV, por região e Unidade da Federação, da Semana 01 até a Semana Epidemiológica 52, Brasil, 2016 e 2017.

Região/Unidade da Federação	Casos prováveis (n)		Incidência (/100 mil hab.)	
	2016	2017	2016	2017
Norte	12.861	2.201	72,6	12,4
Rondônia	923	141	51,6	7,9
Acre	79	40	9,7	4,9
Amazonas	4.485	429	112,1	10,7
Roraima	169	203	32,9	39,5
Pará	4.664	688	56,4	8,3
Amapá	405	11	51,8	1,4
Tocantins	2.136	689	139,3	44,9
Nordeste	75.338	5.270	132,4	9,3
Maranhão	4.608	516	66,3	7,4
Piauí	236	154	7,3	4,8
Ceará	4.340	1.503	48,4	16,8
Rio Grande do Norte	3.699	460	106,4	13,2
Paraíba	3.750	115	93,8	2,9
Pernambuco	445	39	4,7	0,4
Alagoas	6.827	249	203,2	7,4
Sergipe	217	17	9,6	0,8
Bahia	51.216	2.217	335,3	14,5
Sudeste	92.937	3.732	107,6	4,3
Minas Gerais	13.865	758	66,0	3,6
Espírito Santo	2.333	352	58,7	8,9
Rio de Janeiro	71.529	2.210	430,0	13,3
São Paulo	5.210	412	11,6	0,9
Sul	898	93	3,1	0,3
Paraná	661	61	5,9	0,5
Santa Catarina	69	20	1,0	0,3
Rio Grande do Sul	168	12	1,5	0,1
Centro-Oeste	34.173	6.156	218,2	39,3
Mato Grosso do Sul	1.722	76	64,2	2,8
Mato Grosso	21.628	2.148	654,3	65,0
Goiás	10.477	3.867	156,5	57,8
Distrito Federal	346	65	11,6	2,2
Brasil	216.207	17.452	104,9	8,5

Fonte: BRASIL, 2018.

Em maio de 2017, o Ministério da Saúde declarou fim do risco da Emergência Internacional em Saúde Pública para Zika, pois o número de registros da infecção caiu cerca de 95% nos primeiros meses do ano em comparação com o mesmo período de 2016. Portanto, o Brasil não preenche mais os requisitos exigidos para manter o estado de emergência (PORTAL BRASIL/ MS, 2017).

1.4.5 Patologias associadas à doença

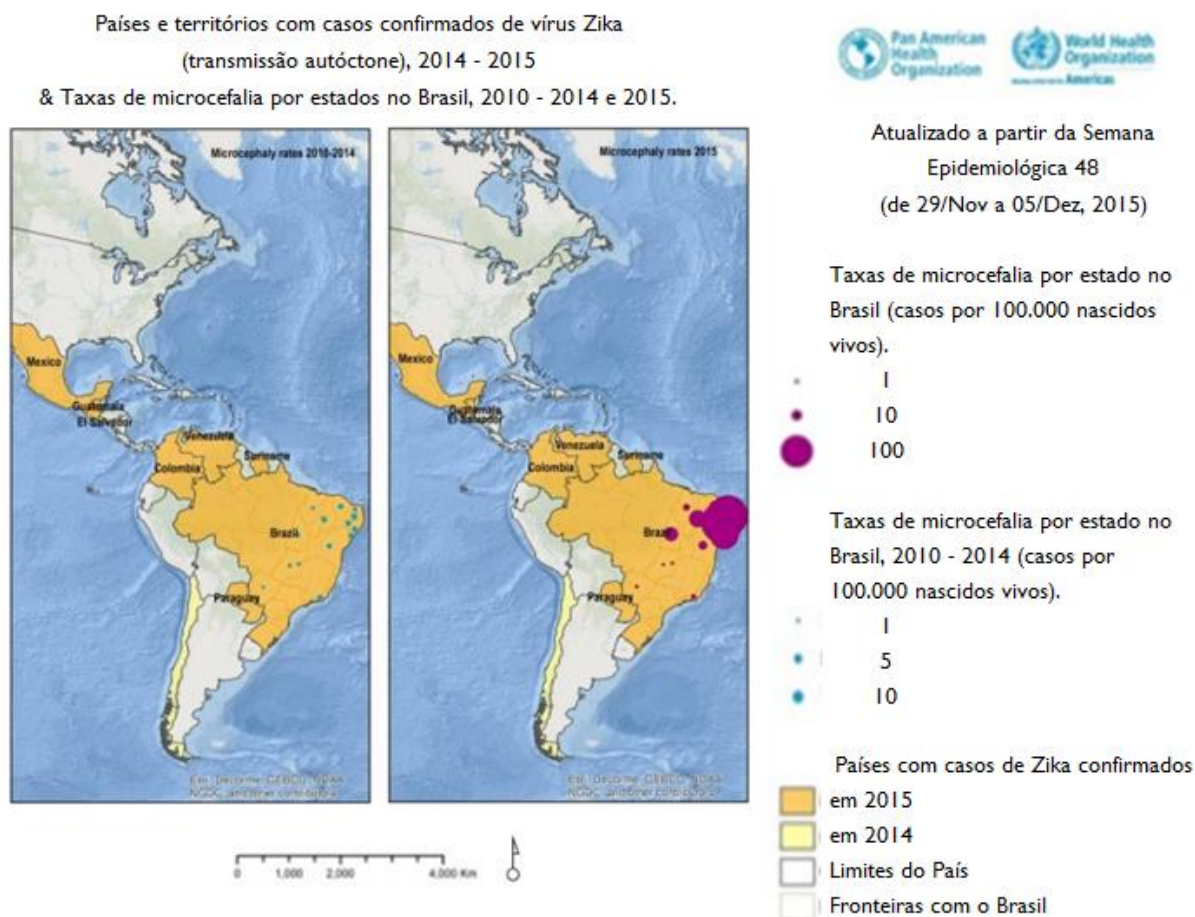
Desde o início de sua disseminação pelo Brasil, a doença tem sido associada à Síndrome de Guillain-Barré e ao nascimento de bebês com microcefalia, levando a OMS a declarar Emergência de Saúde Pública de importância Internacional (DI FILLIPIS, 2016).

A Síndrome de Guillain-Barré é uma doença aguda e imunitária, na qual a função motora geralmente é afetada, começando distalmente e progredindo ao longo de um período de quatro semanas. Ocorre principalmente 2-8 semanas após uma infecção e os pacientes afetados apresentam fraqueza generalizada, arreflexia e um grau variável de distúrbios sensoriais envolvendo os nervos cranianos. O risco da síndrome de Guillain-Barré aumenta com a idade e os homens são mais comumente atingidos do que as mulheres (CAO-LORMEAU et al, 2016).

O primeiro estudo documentado a partir de uma grande quantidade de pacientes que desenvolveram a Síndrome de Guillain-Barré após infecção pelo ZIKV foi de Cao-Lormeau et al (2016). Neste estudo, foram realizadas investigações sorológicas nas amostras de sangue de 42 pacientes que desenvolveram a Síndrome durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa. A presença de IgM foi detectada em 93% dos pacientes e cerca de 88% dos pacientes com a Síndrome relataram a ocorrência de sintomas devido à infecção por ZIKV cerca de 6 dias antes do início dos sintomas neurológicos. Logo, os resultados confirmaram que todos os pacientes haviam sido infectados pelo ZIKV.

No estado do Pará, um recém-nascido apresentou microcefalia e outras anomalias congênitas vindo a falecer cinco minutos após seu nascimento. A presença do genoma viral foi detectada nas amostras de sangue e tecido deste bebê e confirmada pelo Instituto Evandro Chagas, Laboratório nacional de referência para arbovírus em Belém, Pará. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil há relação entre o aumento da ocorrência de microcefalia ou anomalias congênitas em recém-nascidos e a infecção pelo ZIKV. O maior risco de desenvolver microcefalia está associado com infecção pelo ZIKV no primeiro trimestre de gravidez. O Ministério da Saúde do Brasil também estabeleceu uma definição de caso para a microcefalia associada ao ZIKV (perímetro cefálico igual ou maior que dois desvios-padrão (SD) abaixo da média para sexo e idade gestacional no nascimento), Figura 9 (SCHULER-FACCINI et al, 2016; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Figura 9 - Países e territórios com casos confirmados do ZIKV (transmissão autóctone), 2014-2015 e taxas de microcefalia por estado no Brasil, 2010-2014 e 2015.



Fonte: PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015.

1.4.6 Formas de transmissão da doença

Apesar da transmissão principal do ZIKV ser por meio da picada do mosquito *Aedes*, há grandes evidências que apontam para uma via de transmissão sexual. Esta via foi primeiramente descrita em 2011 nos EUA por Foy e colaboradores (2011) e posteriormente relatada em vários outros países (FRÉOUR et al, 2016; OMS, 2016; FRANK et al, 2016; TURMEL et al, 2016).

Alguns estudos relatam também transmissão de pessoa a pessoa por contato sexual (FOY et al, 2011), transfusão sanguínea (MUSSO et al, 2014) e transmissão perinatal (BESNARD et al, 2014).

1.4.7 Detecção do Zika vírus em diferentes fluidos corporais

O RNA do ZIKV pode ser detectado em diferentes fluidos corporais com uma ampla gama de cargas virais. Há alguns anos foram publicados estudos que utilizavam a urina como amostra para diagnosticar infecções por flavivírus, como WNV e DENV. Estudos recentes foram feitos a fim de verificar se o ZIKV apresentava os mesmos resultados e puderam concluir que o diagnóstico da infecção por meio da urina pode ser útil. Todos os artigos citados até o momento utilizaram PCR-RT para o diagnóstico do vírus em questão na urina (BARZON et al, 2013; BONALDO et al, 2016; De M. CAMPOS et al, 2016; GOURINAT et al, 2015; KORHONEN et al, 2016; MUSSO et al, 2015; ROZÉ et al, 2016; SHINOHARA et al, 2016).

Também foi investigado em dois estudos o uso de saliva como amostra alternativa para detecção de RNA do ZIKV por meio de RT-PCR em tempo real (BARZON et al, 2016; MUSSO et al, 2015).

No laboratório de flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz, a partir de um teste de RT-PCR, foi identificado o RNA do ZIKV em amostras de líquido amniótico de duas gestantes, cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia no ultrassom pré-natal (OLIVEIRA et al, 2016).

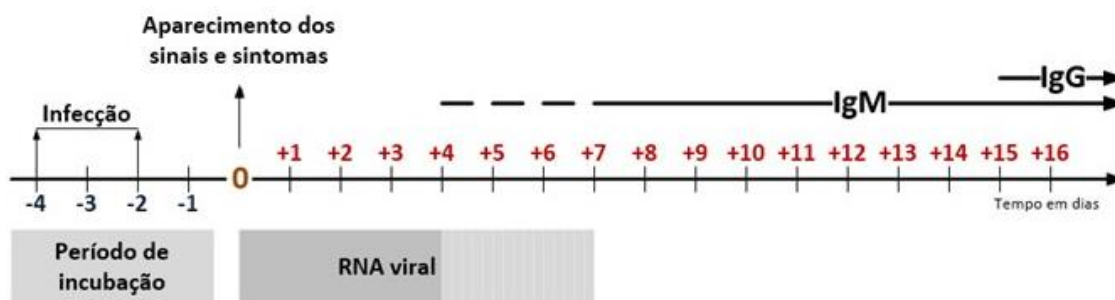
1.5 Diagnóstico laboratorial

Com o surgimento de novos arbovírus causadores de doenças febris semelhantes à dengue e transmitidas pelo mesmo vetor, como o ZIKV, destacou-se a necessidade do desenvolvimento de novos kits para diagnóstico destes vírus, que devem ser rápidos, sensíveis, eficientes, específicos, econômicos e de fácil manuseio, permitindo que tanto o vírus em questão quanto a infecção possam ser identificados nas amostras de pacientes testadas (CAO-LORMEAU et al, 2014).

O período de viremia do ZIKV é considerado curto, logo, a detecção direta do vírus ocorre nos primeiros 3 a 5 dias após o início dos sintomas. Os anticorpos (IgM, principais marcadores da infecção aguda, são sintetizados logo no início da resposta imunológica e sofrem um decréscimo com o tempo até desaparecerem, podendo ser detectados por até 3 meses. Os anticorpos IgG são sintetizados logo após a IgM, e permanecem no organismo por meses a anos sendo um ótimo

marcador de infecção passada ou de uma reinfecção, Figura 10 (CHARREL et al, 2016).

Figura 10 - Viremia da infecção pelo ZIKV.



Diagnóstico laboratorial por RT-PCR e Sorologia (IgM e IgG) para Zika virus.

Fonte: adaptado de Sullivan Nicolaides Pathology 2014

Fonte: http://4.bp.blogspot.com/-q3tGLWmhHQ0/VeRUHqQcWbl/AAAAAAAAAAOh8/ws_1-BUu_-4/s1600/deteccao_zika.PNG

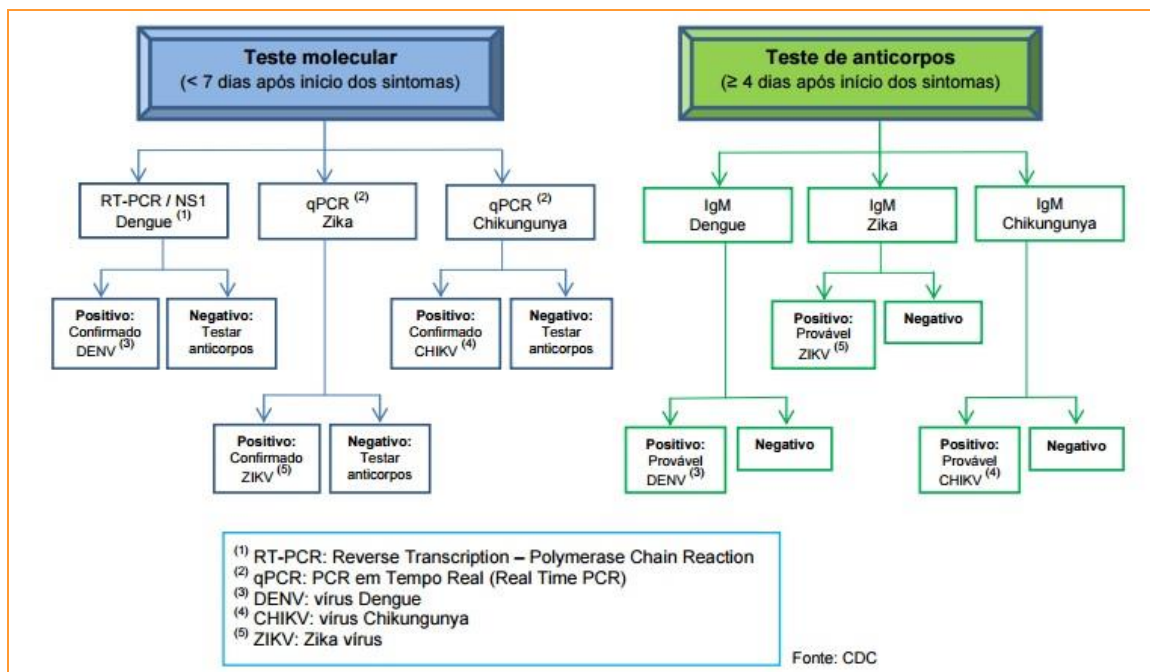
O diagnóstico do ZIKV pode ser difícil devido a problemas como baixa especificidade e reação cruzada com outros flavivírus, como o vírus da dengue, da febre amarela e da febre do Nilo Ocidental (CHANG et al, 2016). As epidemias de ZIKV podem ter ocorrido em maior número, porém diagnosticadas como Dengue de forma incorreta devido aos sintomas clínicos semelhantes e reatividade sorológica cruzada com DENVs, especialmente em casos de infecções secundárias por flavivírus. Se o ZIKV for o primeiro flavivírus, a reatividade cruzada é mínima. No entanto, quando a infecção por ZIKV ocorre após uma infecção por flavivírus, as chances de ocorrer reatividade cruzada no ensaio para IgM é maior. Também pode haver reatividade cruzada quando as infecções por ZIKV ocorrem em uma população com imunidade para Dengue ou outros flavivírus (LANCIOTTI et al, 2008).

Os ensaios disponíveis para diagnóstico laboratorial de Zika rRT-PCR, TMA, detecção de anticorpos neutralizantes de ZIKV via teste de neutralização de redução de placa (PRNT), imuno-histoquímica, imunofluorescência, teste rápido (imunocromatográfico) e ELISA. Apesar de já estarem disponíveis comercialmente, nem todos os ensaios foram abordados nos artigos selecionados, pelo simples fato de não existirem publicações sobre todos os ensaios anteriormente citados (CDC, 2016).

Cerca de 19 kits comerciais para diagnóstico do ZIKV foram aprovados no *Food and Drug Administration* (FDA). Estes kits foram disponibilizados por meio de autorização do uso urgente de diagnósticos in vitro, no entanto, nem todos os kits estão disponíveis no Brasil (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016).

Os testes são selecionados e realizados dependendo do momento de coleta das amostras em relação ao início da doença e das informações clínicas. Segundo o algoritmo, somente casos ocorridos com menos de sete dias após o início dos sintomas deverão ser encaminhados para RT-PCR. Caso o resultado seja negativo, a amostra é encaminhada para pesquisa de anticorpos por meio de ensaios sorológicos. Os ensaios sorológicos também são selecionados em caso de amostras coletadas quatro dias ou mais após o início dos sintomas, Figura 11 (CDC, 2016).

Figura 11 - Algoritmo para detecção do ZIKV.



Fonte: CDC, 2016.

1.5.1 Testes Moleculares

O ensaio molecular disponível comercialmente para diagnóstico laboratorial de Zika é o rRT-PCR. Testes moleculares têm sido utilizados frequentemente e com sucesso para diagnosticar doenças infecciosas apresentando maior sensibilidade e especificidade do que os testes sorológicos. Embora alguns testes tenham sido

desenvolvidos para detectar ZIKV utilizando a glicoproteína E e os genes NS5 (FAYE et al, 2008, 2013), o teste de Lanciotti et al (2008) é o mais utilizado para confirmar os casos de ZIKV no mundo por meio de uma combinação de dois PCR em tempo real/ conjuntos de sondas abrangendo as posições 835- 1137 do genoma do ZIKV (CAO-LORMEAU et al, 2014).

Faye et al (2013) desenvolveram um rRT-PCR de apenas uma etapa para a região NS5, que o levou à uma detecção mais ampla tanto de cepas africanas quanto asiáticas.

1.5.1.1. Amplificação de Ácidos Nucleicos

Do inglês, “*nucleic acid amplification technology*”, o NAT é uma tecnologia que demonstra capacidade de amplificar sequências de ácidos nucleicos específicas de um organismo. Este teste pode ser feito através de vários tipos de técnicas, sendo as mais comuns, PCR e TMA. No TMA não é necessário o uso de termociclador como no PCR visto que a reação ocorre sob condições de temperatura constante. Neste teste, a sequência de ácidos nucleicos é amplificada a partir de *primers* e a reação utiliza um ciclo contínuo e isotérmico de amplificação de RNA. A enzima transcriptase reversa parte o molde de RNA viral gerando cópias de fita dupla de DNA, após, a RNA polimerase sintetiza novamente fitas simples de RNA a partir do molde de fita dupla de DNA, resultando em várias cópias de RNA do segmento do ácido nucleico de interesse (DNA ou RNA) (BARBAN, 2010).

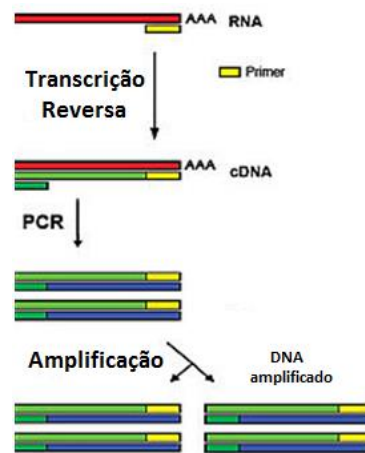
Os ensaios de RT-PCR foram desenvolvidos com a finalidade de detectar o vírus no início da doença, logo, um resultado de PCR positivo é uma prova definitiva de infecção atual. Uma amostra adequada para realização do RT-PCR necessita ser coletada preferencialmente durante os cinco primeiros dias de sintomas, sendo possível a realização do teste até o sétimo dia de doença. Períodos superiores apresentam chance reduzida de detecção do genoma viral por esta metodologia (CDC, 2017).

No PCR, como o genoma do ZIKV é uma cadeia de RNA, sua amplificação requer duas etapas, a transcrição do RNA genômico de cadeia simples em cDNA, seguido pela conversão para DNA de cadeia dupla e a amplificação do DNA, que podem ser realizados na mesma reação. O PCR em tempo real, que foi estabelecido em 1994, revolucionou a técnica de amplificação por PCR, pois combina a

amplificação por PCR com uma sonda fluorescente e detecção do produto amplificado na mesma reação o que o torna mais rápido do que a técnica de PCR convencional, Figuras 12 e 13 (MUSSO e GUBLER, 2016).

O RT-PCR, no entanto, requer uma extração de RNA viral anterior ao ensaio em si. Algumas desvantagens são: Uso de equipamentos caros, como o termociclador e risco de baixa qualidade da amostra devido à degradação do RNA durante transporte ao laboratório (KUROSAKI et al, 2017).

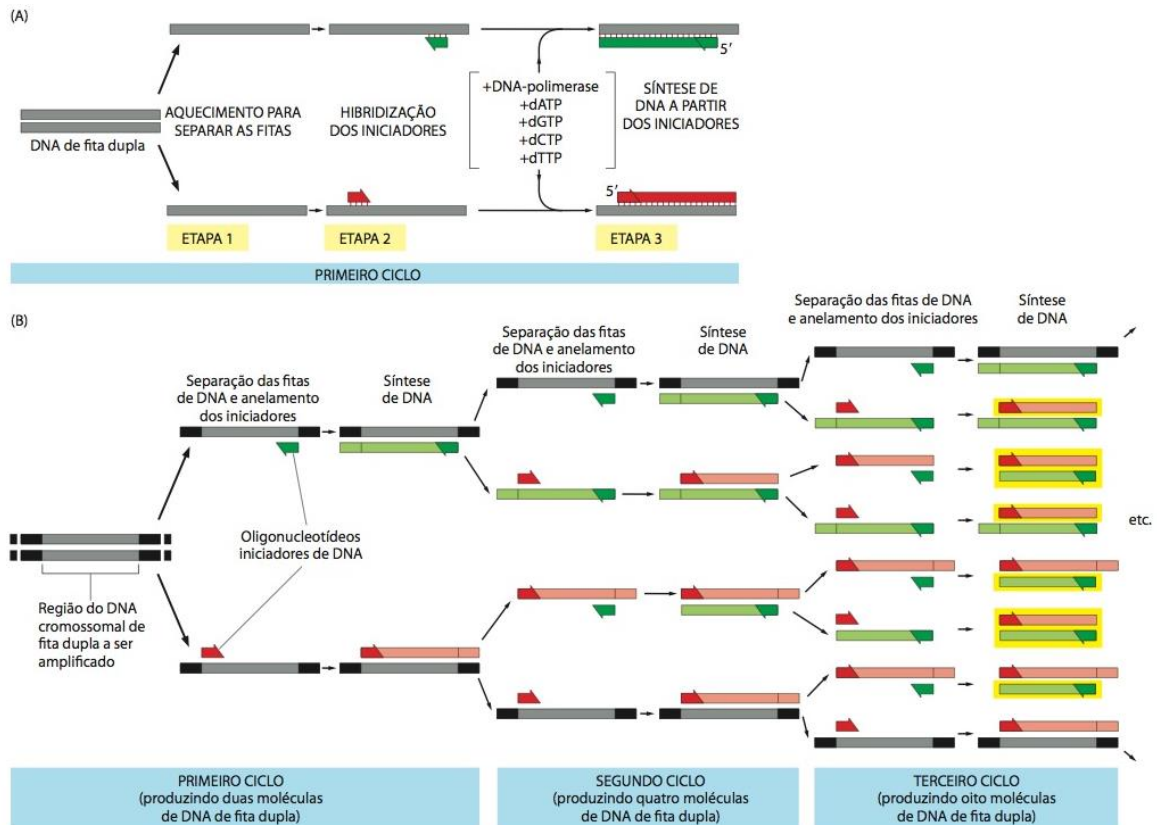
Figura 12 - Transcrição do RNA a DNA



Fonte: Adaptado de

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/thumb/c/c2/Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.jpg/220px-Reverse_transcription_polymerase_chain_reaction.jpg.

Figura 13 - Esquema de uma reação de PCR



Fonte: <http://www.kasvi.com.br/wp-content/uploads/2015/07/CICLOS-DA-PCR1.png>.

1.5.2 Testes Sorológicos

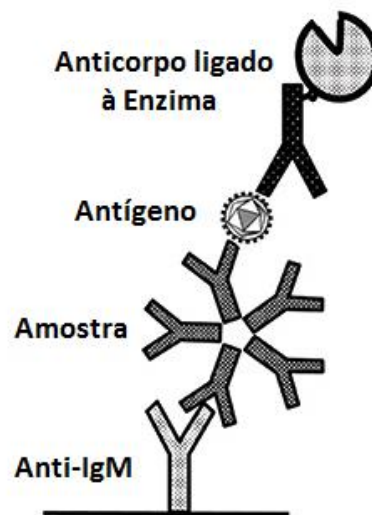
1.5.2.1 ELISA

Segundo Gabaglia (2017), os recentes kits para diagnóstico correspondentes à metodologia ELISA disponíveis no mercado não foram confirmados como específicos para ZIKV e apresentam reatividade cruzada para outros flavivírus e vacinas referentes aos mesmos.

O ensaio de imunoabsorção enzimática (MAC-ELISA) é um teste *in house* desenvolvido pelo CDC, logo, não está disponível comercialmente. Destina-se à detecção qualitativa de imunoglobulina M viral (IgM) produzidos durante os primeiros dias após o início dos sintomas clínicos em uma infecção primária. Os níveis de IgM são variáveis, mas geralmente são positivos a partir do quarto dia após início dos sintomas, continuando por 12 ou mais semanas após a infecção inicial. A captura de IgM por MAC-ELISA é a melhor abordagem para a detecção de anticorpos Anti-Zika

IgM por se tratar de um teste simples, sensível e aplicável ao soro e ao líquido cefalorraquidiano de uma variedade de espécies animais. As placas de 96 poços são revestidas com o anticorpo de captura Anti-IgM. Isto é seguido sequencialmente pela adição do soro do paciente e a presença de antígeno é detectada usando conjugado anti-viral com enzima-anticorpo. Um resultado colorimétrico é gerado pela interação da enzima e com um cromógeno-substrato e esta alteração colorimétrica é detectada por um espectrofotômetro (leitor de ELISA), Figuras 14 e 15 (CDC, 2017).

Figura 14 - Ensaio imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA).



Fonte: Adaptado de <https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/improving-diagnosis-of-zika-virus-infection-an-urgent-task-for-pregnant-women/#prettyPhoto/2/>

Figura 15 - Placa de 96 poços utilizada em ELISA



Fonte: <http://blog.pacificbiolabs.com/pacificbiolabs/2013/5/6/immunogenicity-testing-overview>

Novos ensaios estão sendo desenvolvidos a fim de diminuir a reatividade cruzada entre flavivírus presente nos atuais kits para diagnóstico sorológicos, principalmente em kits para detecção de DENV e ZIKV, o que pode levar a resultados falso positivos. Como estes vírus possuem alto grau de semelhança em suas proteínas, Rockstroh et al (2017) desenvolveram um ELISA específico e sensível para infecções por DENV e ZIKV, com base na proteína E como antígeno. A proteína E é muito utilizada em ensaios sorológicos para diagnóstico de flavivírus por praticamente todos os indivíduos infectados gerarem anticorpos contra ele.

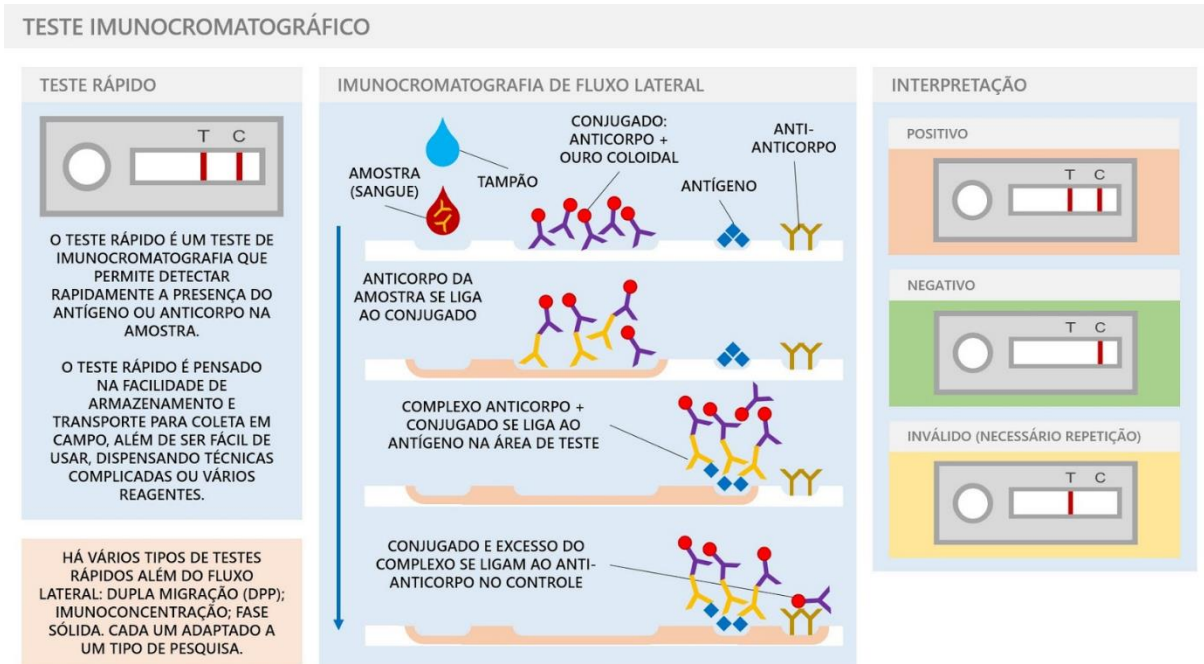
1.5.2.2 Teste de Neutralização pela redução de placas (PRNT)

O Teste de Neutralização pela redução de placas (PRNT) é um teste confirmatório para anticorpos, logo, pode medir a neutralização específica dos anticorpos do vírus, um fato que é relevante em regiões onde dois ou mais flavivírus coexistem. Contudo, PRNTs não discriminam entre classes de anticorpos e, especialmente em infecções secundárias por flavivírus, anticorpos neutralizantes de reação cruzada podem contribuir para a neutralização do vírus, questionando assim a adequação de PRNTs para confirmação de infecção. Além disso, as PRNTs são de difícil execução, demoradas e não adequadas para ensaios com grandes painéis, portanto, restrita somente à laboratórios altamente especializados (STEINHAGEN et al, 2016).

1.5.2.3 Teste Rápido

O teste rápido é um ensaio imunocromatográfico baseado na sensibilização de antígenos/anticorpos conjugados ao ouro coloidal que capturam imunoglobulinas e proteínas específicas do ZIKV presentes no soro, plasma ou sangue do paciente, formando um complexo antígeno-anticorpo que migra por capilaridade ao longo da membrana de nitrocelulose, Figura 16.

Figura 16 - Esquema do funcionamento de um teste rápido de fluxo lateral



Fonte: Adaptado de http://4.bp.blogspot.com/-tR-K2Cf2q8s/VfCfu_G7Icl/AAAAAAAAO30/LoXdRosRLI/s1600/teste_rapido.jpg

Após aplicação da amostra na membrana, a solução tampão de corrida é colocada sobre a amostra, quando aplicável. Os anticorpos/antígeno presentes na amostra fluem lateralmente pela membrana de nitrocelulose, passando pela área onde se ligam às proteínas específicas conjugadas ao ouro coloidal, e prosseguem em direção à área de teste (T). Na área T, o complexo anticorpo/antígeno - conjugado liga-se aos antígenos/anticorpos do agente infeccioso investigado, formando uma linha roxa/rosa (ou banda) colorida. O conjugado não ligado ao anticorpo/antígeno e o excesso do complexo imune continuam a migração, ao longo da membrana de nitrocelulose, em direção à área do controle (C), onde são capturados por anticorpos anti-Zika, formando outra linha (ou banda) colorida, que mostra o funcionamento correto dos reagentes e da reação. Na ausência de anticorpos/antígenos para Zika, a linha roxa/rosa não aparece na área do teste. A leitura do teste é visual e os resultados são obtidos geralmente em período que pode variar de 15 a 30 minutos, dependendo das recomendações de uso determinadas pelos diferentes fabricantes (SANG et al, 1998; SENGVILAI PASEUTH et al, 2017).

Ao longo da pesquisa na literatura não foram encontrados artigos referentes à esta técnica no diagnóstico da Zika, porém, já existem kits disponíveis no mercado nacional e internacional.

1.5.2.4 *Imunofluorescência*

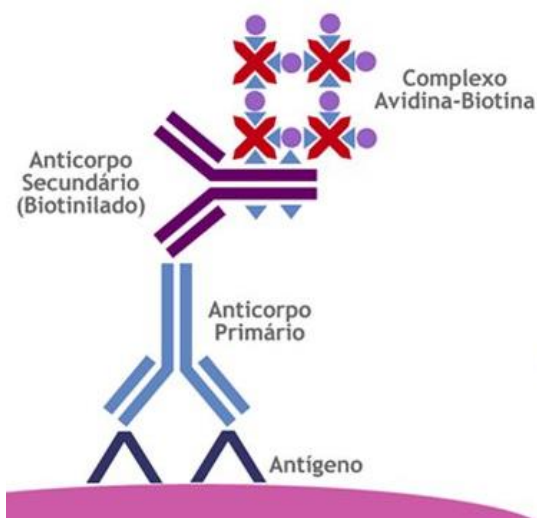
Nesta técnica, anticorpos monoclonais ou policlonais são conjugados com corantes fluorescentes (fluorocromos) e podem ser visualizados usando um microscópio de fluorescência, fluorômetro, scanner de fluorescência ou citômetro de fluxo. O anticorpo marcado com antígeno específico é colocado em uma lâmina de microscópio, incubado, lavado e visualizado sob um microscópio de fluorescência. Quando um corante fluorescente forma uma ligação covalente com o anticorpo, que é detectado por um anticorpo anti-imunoglobulina fluorescente, trata-se de uma imunofluorescência indireta (IFI). Os corantes escolhidos excitados por luz de um comprimento de onda, em geral, verde ou azul, e emitem luz de diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Com o uso de filtros seletivos, apenas a luz proveniente do corante ou do fluorocromo usado é detectada no microscópio de fluorescência (MURPHY, 2010).

Não foram encontrados artigos referentes à esta técnica no diagnóstico da Zika, porém, já existem kits disponíveis no mercado nacional e internacional.

1.5.2.5 *Imunohistoquímica (IHQ)*

Nesta técnica, o anticorpo específico é ligado quimicamente a uma enzima que converte um substrato incolor em um produto colorido, in situ. O anticorpo liga-se de forma estável ao seu antígeno, permitindo que o anticorpo não-ligado seja removido por lavagens. Essa técnica de detecção é similar ao ELISA e usa normalmente as mesmas enzimas ligadas somente com uma diferença na detecção. Na imunohistoquímica, os produtos corados são insolúveis e precipitam no local onde são formados podendo então serem observados diretamente ao microscópio óptico, Figura 17 (MURPHY, 2010).

Figura 17 – Imunohistoquímica (IHQ)



Fonte: [http://slideplayer.com.br/slide/3370716/11/images/8/Imunohistoqu%C3%ADmica+\(+IHQ\).jpg](http://slideplayer.com.br/slide/3370716/11/images/8/Imunohistoqu%C3%ADmica+(+IHQ).jpg)

1.6 Justificativa

Devido à rápida expansão do ZIKV pelo mundo e às suas diversas formas de transmissão, houve urgência na disponibilização de ensaios destinados ao diagnóstico rápido, seguro e eficaz da doença. Conseqüentemente, devido ao avanço da doença, a qualidade dos kits para diagnóstico destinados a detectar tal infecção em diferentes metodologias pode ter sido afetada em função da urgência do diagnóstico do vírus, entre outros fatores.

A urgência na produção e disponibilização destes kits no mercado nacional e internacional também se deve ao fato de que o ZIKV foi vinculado à Síndrome de Guillain-Barré e ao nascimento de bebês com microcefalia. Logo, o estudo de revisão na literatura internacional se faz necessário para um melhor entendimento desta infecção de caráter mundial, assim como demonstrar os parâmetros de Sensibilidade e Especificidade dos kits para diagnóstico da infecção pelo ZIKV disponibilizados comercialmente no mundo.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho é realizar uma revisão integrativa da literatura científica, referente à qualidade dos kits utilizados no diagnóstico da infecção pelo ZIKV em suas diferentes metodologias, frente aos parâmetros de sensibilidade e especificidade.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar uma abordagem geral sobre a infecção do ZIKV.
- Selecionar artigos científicos destinados ao diagnóstico do ZIKV em suas diferentes metodologias.
- Identificar e demonstrar os atributos de sensibilidade e especificidade dos produtos existentes no mercado nacional e internacional.

3 METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa, visto que determina o conhecimento atual sobre um tema específico, além de identificar, analisar e sintetizar resultados de estudos independentes sobre o mesmo assunto. Este método “combina dados da literatura teórica e empírica, além de incorporar um vasto leque de propósitos: definição de conceitos, revisão de teorias e evidências, e análise de problemas metodológicos de um tópico particular” (WHITTEMORE e KNAFL, 2005; SOUZA e CARVALHO, 2010).

Para a elaboração da presente revisão integrativa foram efetuadas as seguintes etapas: elaboração da pergunta norteadora; estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão de artigos (seleção da amostra); análise crítica dos artigos selecionados; interpretação dos resultados e apresentação da revisão.

A questão que serviu de guia para esta revisão foi a seguinte: Qual a qualidade dos kits disponibilizados no mercado nacional e internacional utilizados no diagnóstico da infecção pelo ZIKV em suas diferentes metodologias, frente aos parâmetros de sensibilidade e especificidade?

Para o levantamento dos artigos na literatura foram utilizadas as bases de dados SciELO, PubMed, Scopus e Google Acadêmico. A busca foi realizada somente pelo acesso on-line, utilizando as palavras-chave a seguir e suas combinações: “zika”, “diagnóstico”, “kits”, “teste rápido”, “PCR”, “PRNT”, “ELISA”, “sensibilidade”, “especificidade”, “aedes” e “flavivírus”.

Os critérios adotados para a seleção e inclusão dos artigos foram:

- a) artigos publicados em português e inglês;
- b) artigos com resumos disponíveis nas bases de dados selecionadas, no período compreendido entre 2007-2017;
- c) artigos na íntegra que retratassem a temática referente ao diagnóstico do ZIKV em suas diferentes metodologias;

Os critérios de exclusão definidos para a seleção dos artigos foram:

- a) artigos cujos títulos e resumos não eram referentes somente ao diagnóstico da Zika, exceto os que se referiam à kits para diagnóstico de ZIKV/DENV/CHIKV;
- b) artigos que apresentavam kits para diagnóstico ainda em desenvolvimento;

- c) artigos que não demonstraram sensibilidade e especificidade dos kits apresentados.

Por meio da leitura flutuante pôde-se obter uma visão abrangente do conteúdo dos artigos pesquisados. A etapa de exploração do material foi desenvolvida a partir da transcrição dos resultados e de trechos significativos, a fim de levantar o conhecimento já produzido sobre o ZIKV e as lacunas de conhecimento presentes nas metodologias disponíveis no diagnóstico da infecção em seres humanos e primordialmente os atributos de Sensibilidade e Especificidade de tais kits.

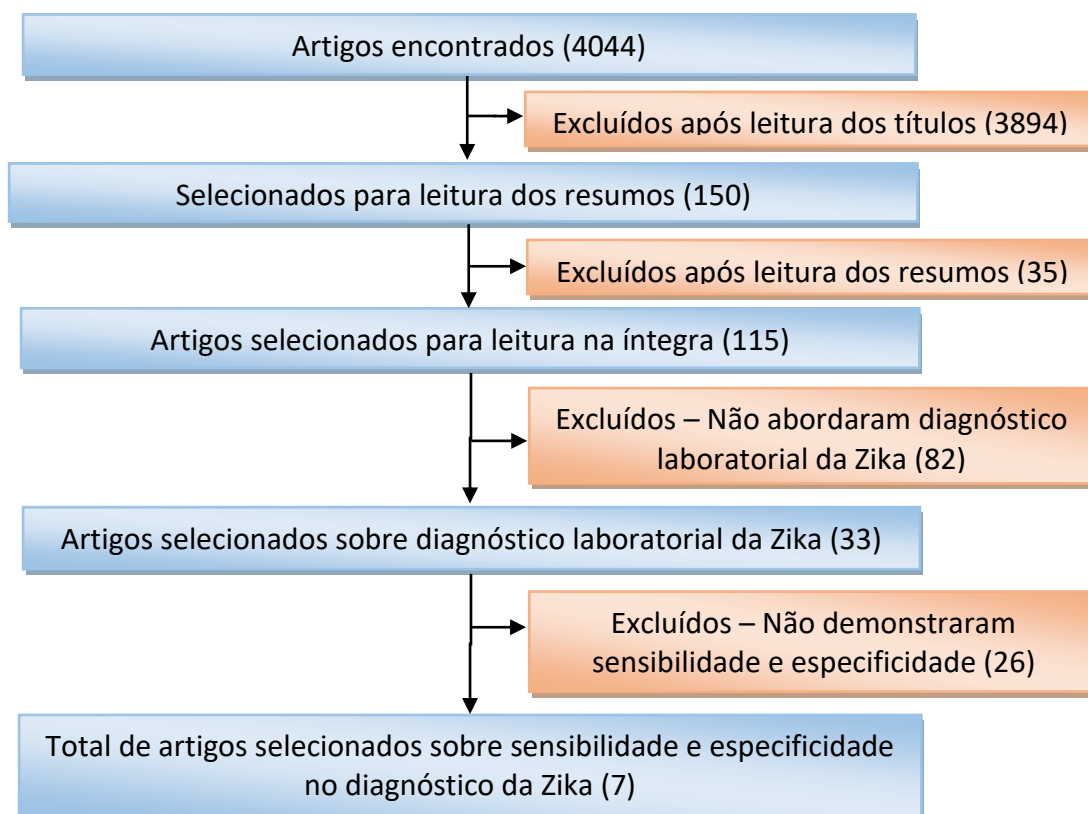
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Da seleção dos artigos

Através da busca nas bases de dados SciELO, PubMed, Scopus e Google Acadêmico foram identificados 4.044 artigos. Após a primeira seleção que abordou a leitura dos títulos, 3.894 artigos foram excluídos por não serem inerentes somente ao tema Zika, logo, restando 150 artigos. Uma segunda seleção foi feita com o objetivo de identificar o objeto do trabalho, porém, esta etapa envolveu a leitura dos resumos. Após a leitura dos resumos, 35 artigos foram excluídos pelo mesmo motivo da exclusão anterior, chegando à 115 artigos sobre Zika em geral. Após a leitura destes 115 artigos na íntegra, 82 foram excluídos por não abordarem diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV. Dos 33 artigos restantes, 26 foram excluídos por não apresentarem dados de sensibilidade e especificidade referentes aos kits para diagnóstico da Zika. Portanto, após a leitura e avaliação dos artigos, foram identificados sete artigos sobre a pergunta guia. O fluxograma da seleção e avaliação dos artigos está demonstrado na Figura 18.

Houve grande dificuldade na pesquisa e seleção dos artigos abrangendo diagnóstico laboratorial do ZIKV identificando seus parâmetros de sensibilidade e especificidade, quando comparado frente ao número de artigos primariamente identificados para Zika. Muitos dos artigos abordavam os *kits* para diagnóstico, porém não apresentavam valores de especificidade e sensibilidade. Vale ressaltar também a grande quantidade de artigos no qual aborda os *kits* ainda em desenvolvimento, logo, não foram selecionados para esta revisão.

Figura 18 - Fluxograma de seleção de artigos na presente revisão integrativa.



Fonte:

4.2 Dos atributos de sensibilidade e especificidade

Para esta revisão foram selecionados artigos que apresentassem uma análise de eficiência de kits de diagnóstico de acordo com seus percentuais de sensibilidade e especificidade. A Sensibilidade de um ensaio é medida pela sua capacidade de detecção de indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar os indivíduos doentes. A Especificidade é medida pela capacidade de detecção de indivíduos verdadeiramente negativos, ou seja, de diagnosticar os indivíduos sadios.

A sensibilidade de um teste é calculada a partir da divisão dos resultados Verdadeiros Positivos (A) pelo Total de Reagentes (A+C), desta maneira a sensibilidade avalia a capacidade do teste analisado em reconhecer os resultados positivos do teste adotado como referência. Por outro lado, a Especificidade de um teste é calculada a partir da divisão dos resultados Verdadeiros Negativos (D) pelo Total de Não Reagentes (B+D), desta maneira a especificidade avalia a capacidade do teste analisado em reconhecer os resultados negativos do teste adotado como referência, Tabela 6. O desempenho de um ensaio está correto quando apresenta

resultado positivo na presença da doença (verdadeiro positivo), ou negativo na ausência da doença (verdadeiro negativo). Entretanto, um ensaio apresenta desempenho incorreto quando apresenta resultado positivo na ausência da doença (falso positivo), ou negativo com a presença da doença (falso negativo) (GREENHALGH, 1997; BOTELHO, 2017).

Tabela 6 - Desempenho de um teste diagnóstico.

Teste	Referência		Total
	Reagente	Não Reagente	
Positivo	Verdadeiro Positivo (A)	Falso Positivo (B)	Total de Positivos (A+B)
Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro Negativo (D)	Total de Negativos (C+D)
Total	Total de Reagentes (A + C)	Total de Não Reagentes (B + D)	Total (A+B+C+D)

Fonte: Adaptado de BOTELHO, 2017

Para definir as características de desempenho desejadas nos testes de diagnóstico para Zika, foram sugeridos os perfis alvos de produtos, em inglês *target product profile* (TPP). Seu desenvolvimento foi liderado pela OMS em consenso com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) entre outras organizações, abordando as lacunas e limitações dos testes diagnósticos atuais. Desta forma, foram elaboradas duas TPPs: a primeira TPP foca na detecção do ZIKV em uma infecção ativa tendo como sensibilidade e especificidade ideal >98% e >99,5%, e aceitável >95% e >99,5%, respectivamente. A segunda TPP foca na detecção do vírus em uma infecção prévia tendo como sensibilidade e especificidade ideal >98% e >98%, e aceitável >95% e >95%, respectivamente, Tabela 7 (CHUA et al, 2017).

Tabela 7 - Desempenho esperado para sensibilidade e especificidade na detecção de ZIKV

	Infecção ativa (IgM)	Infecção prévia (IgG)
Sensibilidade ideal	>98%	>98%
Especificidade ideal	>99,5%	>98%
Sensibilidade aceitável	>95%	>95%

Especificidade aceitável	>99,5%	>95%
--------------------------	--------	------

Fonte: Adaptado de Chua et al 2017

4.3 Dos artigos selecionados

Conforme demonstrado na Tabela 8 o sumário dos artigos que identificam e demonstram os valores dos atributos de sensibilidade e especificidade.

Tabela 8 - Apresentação da síntese de artigos incluídos na presente revisão integrativa.

Nome do artigo	Autores	Metodologia estudada	Sensibilidade	Especificidade	Limite de detecção	Nº de amostras	Ano
Evaluation of Aptima Zika Virus Assay	Ren et al.	TMA	94,70%	94,80%	11,5 cópias/reacção	134	2017
Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay	Pabbaraju et al.	RT-PCR	–	100%	7 cópias/reacção	79	2016
A Diagnostic Polymerase Chain Reaction Assay for Zika Virus	Balm et al.	RT-PCR	–	–	140 cópias/reacção	88	2012
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.	Steinhagen et al.	ELISA	IgM 58,8% IgG 88,2% IgM/IgG 100%	99,80%	–	112	2016
Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences	Granger et al.	MAC-ELISA ELISA IgM	MAC-ELISA 93,1% ELISA IgM 20,7%	MAC-ELISA 95,7% ELISA IgM 95,7%	–	54	2017
Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing	L'Huillier et al.	ELISA IgM ELISA IgG ELISA IgM/IgG	ELISA IgM 28,9% ELISA IgG 23,7% ELISA IgM/IgG 39,5%	ELISA IgM 96,6% ELISA IgG 95,2% ELISA IgM/IgG 92,5%	–	223	2017
Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays	Safronetz et al.	ELISA IgM ELISA IgG MAC-ELISA	ELISA IgM 37% ELISA IgG - ELISA IgM/ IgG 82% MAC-ELISA 1 100% MAC-ELISA 2 57% MAC-ELISA 3 65%	ELISA IgM 100% ELISA IgG 100% MAC-ELISA 1 - MAC-ELISA 2 100% MAC-ELISA 3 66%	–	75	2017

Fonte:

Os três primeiros artigos da tabela 8 abordam metodologia molecular, e demonstraram:

O ensaio analisado por Ren et al (2017) tem como alvo duas sequências altamente conservadas nas regiões NS2 e NS4/NS5 de ZIKV RNA utilizando uma

TMA. Todo o teste é realizado em um único tubo e envolve três etapas principais: preparação de amostras, amplificação do alvo de RNA do ZIKV por TMA e detecção dos produtos de amplificação por um teste de proteção de hibridação (HPA). Sondas hibridizadas produzem a quimioluminescência, que é medida em unidades de luz relativa e relatada como positivo ou negativo. A presença de um controle interno (IC) garante o monitoramento da captura de ácido nucleico, amplificação e detecção. A partir de 134 amostras testadas neste ensaio, comparado ao método de referência rRT-PCR, pôde-se obter sensibilidade de 94,7% (IC 95%, 73,5 a 99,9) e especificidade de 94,8% (IC 95%, 88,9 a 97,8), com limite de detecção equivalente à 11,5 cópias do genoma (GCE) / ml no soro.

Pabbaraju et al (2016), promoveram um ensaio para detecção simultânea de ZIKV, CHIKV e DENV 1-4 a partir de um multiplex RT-PCR em tempo real. No caso do ZIKV, foram utilizadas sondas de hidrólise visando a região não-estrutural 5 (NS5). A partir de 79 amostras testadas foi encontrado o limite de detecção de 7 cópias/reação, e o teste obteve 100% de especificidade não amplificando nenhum dos outros vírus testados.

Balm et al (2012) apresentaram um ensaio específico para detecção de ZIKV. Trata-se de um PCR que exhibe limite de detecção inferior a 140 cópias de RNA viral/reação quando testado em padrões de RNA sintéticos preparados usando plasma de grupos de pacientes negativos. De 88 amostras testadas, nenhuma foi positiva para ZIKV e não foi observada reatividade cruzada com outros flavivírus intimamente relacionados, tais como vírus da dengue, vírus da febre amarela e vírus da encefalite japonesa.

Das informações identificadas nos artigos avaliados é possível destacar os trabalhos de Ren et al. e Pabbaraju et al., que apresentam 2 pontos similares entre os *kits*: a sequência de RNA que utilizaram (Proteína NS5), e os limites de detecção de 11,5 e 7 cópias/reação. No entanto, o artigo de Balm et al, embora aborde a mesma metodologia não informa a sequência viral e com isto o limite de detecção foi bastante alto, 140 cópias/reação quando comparado com os artigos de Ren et al e Pabbaraju et al.

Na sequência, os 4 artigos que abordam a metodologia ELISA, tanto o MAC-ELISA, desenvolvido “*in house*” e reconhecido pelo CDC quanto o ELISA comercial, e foram assim demonstrados:

Steinhagen et al (2016) avaliaram um ELISA recém-desenvolvido com proteína recombinante NS1-ZIKV como antígeno em fase sólida e constatou que este ensaio é uma ferramenta sensível e altamente específica para o diagnóstico sorológico das infecções por ZIKV, pois não foram observadas reações cruzadas com anticorpos contra DENV e outros flavivírus. Os ensaios foram feitos em 112 amostras coletadas ≥ 6 dias após o início dos sintomas (ou seja, após a fase virêmica) e revelaram uma sensibilidade para IgM igual a 58,8% e para IgG 88,2%. A sensibilidade combinada (IgM / IgG) foi de 100% para casos confirmados por RT-PCR de infecção por ZIKV e 99,8% de especificidade. Entre os casos suspeitos de ZIKV, a sensibilidade combinada foi de 89,5%. Não foi observada reatividade cruzada com altos níveis de anticorpos do vírus da dengue.

Granger et al (2017) promoveram a comparação das características de desempenho de dois ELISAs para a detecção de anticorpos de classe IgM para ZIKV: Um MAC-ELISA e um ELISA. Foram testadas 54 amostras e ambos os *kits* foram comparados com MAC-ELISA e PRNT. Para o MAC-ELISA foi observado o seguinte desempenho: 93,1% de sensibilidade e 95,7% de especificidade. Entretanto, o ELISA apresentou 20,7% de sensibilidade e 95,7% de especificidade.

No estudo de L'Huillier et al (2017), outros ELISAs Anti-ZIKV IgM e IgG foram analisados em comparação a um MAC-ELISA e PRNT a partir de 223 amostras. A sensibilidade de IgM / IgG combinados contra o PRNT foi de 83% (coorte 1) e 92% (coorte 2), enquanto a especificidade foi de 81% (coorte 1) e 65% (coorte 2). A especificidade dos ensaios contra o MAC-ELISA foi alta, chegando a 96,6% para IgM, 95,2% para IgG e 92,5% para IgM / IgG combinados, porém, foi observada baixa sensibilidade: 28,9% para IgM, 23,7% para IgG e 39,5% para IgM / IgG combinados. Entre as 76 amostras positivas, equívocas ou inconclusivas de MAC-ELISA, 30 (39,5%) foram IgM e / ou IgG positivas ou equívocas; já entre as 147 amostras negativas de MAC-ELISA, 136 (92,5%) foram IgM e IgG negativas. Na instrução de uso do *kit*, a sensibilidade para IgM / IgG combinados foi de 100% entre as 29 amostras positivas testadas, e especificidade de 100% entre 100 amostras negativas testadas, porém, o ensaio contra o qual foi avaliado não foi mencionado.

Este mesmo ensaio também foi avaliado em outros estudos. Em um deles feito por Huzly et al (2016) foi comparado à uma sorologia não-referencial indireta de imunofluorescência (IFI), apresentando sensibilidade de 100% para IgM e 91,8% para IgM / IgG. Outro estudo (STEINHAGEN et al, 2016) com mais de 1.000

indivíduos saudáveis, apresentou bom desempenho na especificidade, visto que foram observados resultados positivos em apenas 2 amostras (0,2%) para IgM e 2 amostras (0,2%) para IgG.

Safronetz et al (2017) avaliaram o desempenho de 5 ELISAs comparando-os com os testes MAC-ELISA e PRNT a partir de 75 amostras de pacientes. Os ensaios testados foram ELISA IgM, ELISA IgG, MAC-ELISAs 1, 2 e 3. Dos antígenos utilizados podemos citar a proteína não estrutural do vírus Zika recombinante 1 (NS1) para ELISA IgM e ELISA IgG; MAC-ELISA 1 usa uma Glicoproteína recombinante do envelope do ZIKV como antígeno positivo, um controle não-especificado de reação cruzada e antígenos celulares de referência; e os MAC-ELISA 2 e 3 utilizam um antígeno do ZIKV não especificado. ELISA IgM, ELISA IgG e MAC-ELISA 2 mostraram uma especificidade de 100%. O MAC-ELISA 3 mostrou uma especificidade de 66% para amostras negativas e 70% para amostras positivas para DENV. Embora o MAC-ELISA 1 tenha mostrado resultados de especificidade semelhantes para amostras negativas de flavivírus, mostrou diminuição na especificidade para amostras positivas para DENV. Desta forma, identificou 40% dessas amostras como positivas para Zika IgM e 40% quando possível, positivas para Zika. Quanto à sensibilidade foi observado: ELISA IgM, MAC-ELISA 2 e MAC-ELISA 3 demonstraram 37%, 57% e 65%, respectivamente. Quando ELISA IgM e ELISA IgG são combinados, a sensibilidade aumenta para 82%. O MAC-ELISA 1 resultou em uma sensibilidade de 100% e também detectou IgM em 50% de amostras que foram positivas para ZIKV por RT-PCR, enquanto os outros ensaios não detectaram IgM na maioria destas amostras.

Dos artigos avaliados, o estudo de Steinhagen et al foi o único que apresentou o desempenho do *kit* em questão sem compará-lo ao MAC-ELISA, e chegou à conclusão de que o ELISA analisado é uma ferramenta altamente específica para o diagnóstico das infecções por ZIKV, porém, somente apresenta bons valores de sensibilidade quando IgM/IgG são combinados. Safronetz et al apresentaram resultados de especificidade independentes, porém a sensibilidade foi comparada a um MAC-ELISA *in house*, chegando à mesma conclusão de Steinhagen et al em relação à sensibilidade de IgM/IgG combinados.

Os estudos de Granger et al e L'Huillier et al basearam todos os seus resultados de desempenho em comparação a um MAC-ELISA *in house*. Granger et

al sugeriram que as diferenças de desempenho entre os ELISAs podem, em parte, serem explicadas pelos diferentes tipos de antígenos e formatos de ensaio utilizados. O ELISA avaliado em seu artigo é um ELISA indireto com base no antígeno NS1 do ZIKV, enquanto o MAC-ELISA citado usa uma Glicoproteína recombinante E do ZIKV. O baixo valor de sensibilidade para o ELISA, quando comparado aos valores sugeridos pela OMS, são explicados pelo autor devido à alta especificidade do kit. Por fim, nos ensaios de L'Huillier et al foram observados valores muito baixos de sensibilidade, e tanto a especificidade de IgM/IgG combinados quanto separados mostraram valores razoáveis, porém, ainda abaixo dos valores sugeridos pela OMS.

5 CONCLUSÃO

Dentre os testes moleculares e sorológicos aprovados e disponíveis no mercado nacional e internacional, o ZIKV pode ser detectado pelo ensaio molecular RT-PCR enquanto a presença de anticorpos pode ser evidenciada através de ensaios sorológicos como ensaio imunoenzimático– ELISA e Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT). Tanto o ZIKV como a presença de anticorpos podem ser detectados pela técnica de Imunofluorescência, Imunohistoquímica e Teste Rápido (Imunocromatográfico).

Esta revisão mostrou valores de sensibilidade e especificidade dos kits analisados no limite do aceitável ou até mesmo abaixo do limite quando comparados aos parâmetros sugeridos pela OMS, o que pode levar a um diagnóstico incorreto colocando a saúde da população em risco.

Ao observar mais detalhadamente o desempenho dos *kits* analisados, pôde ser notada uma baixa uniformidade nos resultados obtidos, além de um melhor desempenho de sensibilidade quando trata-se de ensaio combinado para IgM/IgG.

Finalmente, vale ressaltar o baixo número de artigos que abordam os valores dos atributos de sensibilidade e especificidade em relação ao vasto número de artigos sobre a infecção pelo vírus Zika e seu diagnóstico.

REFERÊNCIAS

AYRES, C. F. Identification of Zika virus vectors and implications for control. **Lancet Infectious Diseases**, Recife, v. 16, p.278-279, mar. 2016.

BALM, M. et al. A Diagnostic Chain Reaction Assay for Zika Virus. **Journal of Medical Virology**. Singapore, v. 84, n.9, p. 1501-1505, set. 2012.

BARONTI, C. et al. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. **Genome Announcements**, Marselha, v. 2, n. 3, p.1-2, maio/junho 2014.

BARBAN, G. B. **Importância do Teste do Ácido Nucleico - NAT - nos bancos de sangue do Brasil**. 2010. 12 f. Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto, SP, 2010. Artigo apresentado para obter certificação do curso de pós-graduação Lato-Sensu.

BARZON, L. et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. **The Journal of Infectious Diseases**. Vêneto, v. 208, n. 7, p. 1086-1092, out. 2013.

BARZON, L. et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Euro Surveillance**, Padova, v. 21, n. 10, p. 1-5, mar. 2016.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February. **Euro Surveillance**, Tahiti, v. 19, n. 13, p. 1-4, abr. 2014.

BONALDO, M. C. et al. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 6, p. 1 – 17, Jun. 2016.

BOTELHO, P. H. D. **Aplicação de um algoritmo para avaliação do desempenho de testes diagnósticos para dengue durante epidemia no Centro-Oeste, Brasil (2012-2013)**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Assistência e Avaliação em Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 5, p. 1-9, 2017.

CAO-LORMEAU, V. M., MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. **Lancet**, Italia, v. 324, n. 9954, p. 1571-1572, nov. 2014.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, Trento, Italia, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, jun. 2014.

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

CAMPOS, G. S., BANDEIRA, A. C., SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. Salvador, v. 21, n. 5, p. 1885-1886, out. 2015.

CAMPOS, R. M. et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. **Journal of Clinical Virology**, Rio de Janeiro, v. 77, p. 69-70, fev. 2016.

CASSEB, A. R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária & Zoonose**, Pará, v. 20, n. 3, p. 9-21, set. 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Diagnostic Tests for Zika Virus**. 2016. Disponível em: <www.cdc.gov>. Acesso em: 27 ago. 2017.

_____. **Zika MAC Elisa Instructions for use**. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/pdfs/zika-mac-elisa-instructions-for-use.pdf>>. Acesso em 28 fev. 2018.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, Estados Unidos, v. 68, p. 1-13, abr. 2016.

CHARREL, R. N. et al. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin World Health Organization**, Marseille, França, v. 94, n. 8, p. 574-584, ago. 2016.

CHUA, A. et al. Update on Zika diagnostic tests and WHO's Related Activities. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Chapel Hill, Estados Unidos, v. 11, n. 2, p. 1-8, fev. 2017.

DIAGNE, C. T. et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culidae) to transmit Zika virus. **BMC Infectious Diseases**, Senegal, v. 15, n. 492, p. 1-6, abr. 2015.

DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLOS One Tenth Anniversary**, Senegal, v. 9, n. 10, e 109442, p. 1-8, out. 2014.

DICK, G. W., KITCHEN, S. F., HADDOW, A. J. Zika virus Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952.

DI FILLIPIS, A. B. Brazil's scientistsscrable to solve the Zika puzzle. **Bulletim World Health Organization**, Geneva, v. 94, n. 3, p. 165–166, mar. 2016.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, n. 30, p. 1 – 6, dez. 2017.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island. Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**. Junho, 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa0805715>>. Acesso em: dia mês ano.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Nova Caledonia, v. 21, n. 2, p. 381-382, fev. 2015.

FAYE, O. et al. Alpha sall a one-step RT-PCR for detection of zika virus. **Journal of Clinical Virology**, Polinésia Francesa, v. 43, n. 1, p. 96-101, set. 2008.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with fi eld-caught mosquitoes. **Virology Journal**, Senegal, v. 10, n. 311, p. 1-8, out. 2013.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika Virus during lIts emergence in the 20th century. **Plos Neglected Tropical Diseases**, São Paulo, v. 8, n. 1, e 2636, p. 1-10, jan. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Zika Virus emergency use authorization**. 2016. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm#zika>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Colorado, Estados Unidos, v. 17, n. 5, p. 880-882, maio 2011.

FRANK, C. et al. Sexual transmission of Zika virus in Germany. **Euro Surveillance**, Germany, v. 21, n. 23, p. 1-4, abr. 2016.

FRÉOUR, T. et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France. **Euro Surveillance**, France, v. 21, n. 23, p. 1-3, abr. 2016.

GABAGLIA, C. R. Zika virus and diagnostics. **Wolters Kluwer Health Inc**, California v. 29, n. 1, p. 107-113, fev. 2017.

GOURINAT, A. C. et al. Detection of Zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, Nova Caledonia, v. 21, n. 1, p. 84-86, jan. 2015.

GRANGER, D. et al. Serologic testing for Zika Virus: comparison of three Zika Virus IgM screening enzyme-linked immunosorbent assays and initial laboratory experiences. **Journal of Clinical Microbiology**, Estados Unidos v. 55, n. 7, p. 2127-2136, jul. 2017.

GREENHALGH, T. How to read a paper. **BMJ**. v. 315, ago. 1997.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLOS- Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 2, e1477, p. 1-7, fev. 2012.

HUZLY, D. et al. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Euro Surveillance**, Alemanha, v. 21, n. 16, p. 1-4, abr. 2016.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Polinésia Francesa, v. 44, n. 7, p. 302-307, jul. 2014.

KILPATRICK, A. M.; RANDOLPH, S. E. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. **Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1946-1955, dez. 2012.

KORHONEN, E. M. et al. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. **Euro Surveillance**, Helsinki, Finlândia, v. 21, n. 2, p. 1-4, jan. 2016.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Occurrence. **Scientific Data** 2:150035, p. 1-8, 2015. Disponível em <<https://www.nature.com/articles/sdata201535>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, Colorado, Estados Unidos, v. 152, n. 4, p. 687-696, jan. 2007.

KUROSAKI, Y. et al. Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for Zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Scientific Reports**, Nagasaki, Japão, v. 7, n. 1, p. 1-10, out. 2017.

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

L'HUILLIER, A. G. et al. 2017. Evaluation of Euroimmun anti-Zika virus IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays for Zika virus serologic testing. **Journal of Clinical Microbiology**. Toronto, Canada, v. 55, n. 8, p. 2462-2471, maio 2017.

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

LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V. D.; VIEIRA, R. D. M. Zika Virus Fever. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Natal-RN, Brasil, v. 24, n. 4, p. 785-788, out./ dez. 2015.

MAGUIÑA, C.; GALÁN-RODAS, E. El vírus Zika: una revisión de literatura. **Acta Medica Peruana**, Lima, Peru, v. 33, n. 1, p. 35-41, maio 2016.

MOTA, M. T. O. et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge, **Brazilian Journal Microbiology**, São José do Rio Preto, São Paulo, v. 47S, p. 38-50, out. 2016.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MUSSO, D.; NILLES, E. J; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, Polinésia Francesa, v. 20, n. 10, p. 1-2, ago. 2014.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, Polinésia Francesa, v. 68, p. 53-55, abr. 2015.

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

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillace**, Polinésia Francesa, v. 19, n. 14, p. 1-3, fev. 2014.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zikavirus. **Emerging Infectious Diseases**, Polinésia Francesa, v. 21, n. 2, p. 359-361, fev. 2015.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barres syndromecase report, **Euro Surveillace**, Polinésia Francesa, p. 1-3, dez. 2014.

OLIVEIRA, M.A.S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet Gynecol**, Brasil, v. 47, n. 1, p. 6-7, jan. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Doenças infecciosas emergentes e re-emergentes e resistência aos antimicrobianos. **124^o Sessão do Comitê Executivo**, Tema 5.11 da Agenda Provisória, p. 1-14, jun. 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Zika virus outbreaks in the Americas. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, n. 45, p 609-616, nov. 2015.

_____. Prevention of sexual transmission of Zika virus. Interim guidance update. **WHO/ZIKV/MOC/16.1 Rev.2**. Geneva, p 1-5, 7 jun. 2016.

PABBARAJU, K., et al. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal Clinical Virology**. Alberta, Canada, v. 83, p. 66-71, out. 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. **Epidemiological Alert**, Washington, DC, p. 1-11, 2015.

PENNA, M.L.F. Um desafio para a saúde pública brasileira: o controle do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n 1, p. 305-309, jan. 2003.

PORTAL BRASIL/MS. **Ministério da Saúde declara fim da emergência nacional para Zika**. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/05/ministerio-da-saude-declara-fim-da-emergencia-nacional-para-zika>>. Acesso em: 24 jan. 2018.

REN, P. et al. Evaluation of Aptima Zika Virus Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2198-2203, jul. 2017.

ROCKSTROH, A. et al. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. **Emerging Microbes & Infections**, v.6, n. 11, p. 1-9, nov. 2017.

ROZÉ, B. et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barré syndrome on Martinique, **Euro Surveillance**, v. 21, n. 9, p. 1-4, jan. 2016.

SAFRONETZ, D. et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. **Emerging Infectious Diseases**, Canada, v. 23, n. 9, p. 1577-1580, set. 2017.

SANG, C. T et al. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic test for the diagnosis of Dengue virus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 3, p. 407-409, maio 1998.

SANTOS, N.O.S.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. Introdução à virologia humana. **Guanabara Koogan**. 2. ed., p. 1-532, Rio de Janeiro, 2008.

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

SENGVILAIPASEUTH, O. et al. Temperature of a dengue rapid diagnostic test under tropical climatic conditions: a follow up study. **PLoS ONE**, v.12, n. 1, p. 1-7, fev. 2017.

SHINOHARA, K. et al. Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines. **Journal of Travel Medicine**, Tokyo, Japão, p. 1-3, jan. 2016.

SIMPSON, D. I. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Entebbe, Uganda South Africa, v. 58, n. 4, p. 335-338, 1964.

SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, Basel, Suíça, v. 3, n. 2, p. 160-171, fev. 2011.

SOUZA, M. T. S.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**, São Paulo, v. 8, n. 1, pt. 1, p. 102-106, 2010.

STEINHAGEN, K. 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**, v.21, n. 50, p. 1-16, dez. 2016.

TEIXEIRA, M.G; BARRETO, L.M. Porque devemos de novo erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, Bahia, v. 1, n. 1, p. 122-131, 1996.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **Lancet**, v. 387, p. 2501, jun. 2016.

VASCONCELOS, P.F.C et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergente and reemergence of arboviruses. **Cad. Saúde Pública**, n. 17, p. 155-64, 2001.

WHITTEMORE, R., KNAFL, K. The integrative review: update methodology. **Journal of Advanced Nursing**. Oregon, v. 52, n. 5, p. 546-553, fev. 2005.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 11, p 569-572, jun. 2015.