

Diagnóstico laboratorial de casos de importação de infeções por vírus Zika

Laboratory diagnosis of Zika infection imported cases

Maria João Alves, Líbia Zé-Zé

m.joao.alves@insa.min-saude.pt

Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Águas de Moura, Portugal.

_Resumo

O vírus Zika (*Flavivirus*) é um arbovírus transmitido sobretudo por mosquitos, mas também, por transmissão materno-fetal e sexual. Existem evidências que as infeções por vírus Zika podem estar associadas à síndrome de Guillain-Barré e a casos congénitos de microcefalia e outras malformações do sistema nervoso central. As infeções por vírus Zika, Dengue e Chikungunya partilham, atualmente, os mosquitos vetores, a sintomatologia e a distribuição geográfica. O Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge no seu Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores tem desenvolvido o diagnóstico e estudos epidemiológicos de vírus transmitidos por artrópodes desde o princípio dos anos 90. O diagnóstico de Zika foi desenvolvido e padronizado em 2007. O laboratório desenvolveu testes de diagnóstico molecular e serológico tendo identificado vários casos de importação para o território português e feito o diagnóstico diferencial com Dengue e Chikungunya e o despiste de infeção em grávidas e em casos de transmissão sexual.

_Abstract

Zika virus (*Flavivirus*) is a mosquito borne arbovirus, but maternofetal and sexual transmission were also described. There is evidence that Zika virus infections may be associated with Guillain-Barré syndrome and congenital cases of microcephaly and other malformations of the central nervous system. Zika, Dengue and Chikungunya virus infections share currently the same mosquito vectors, the signs and symptoms of the illness and the same and geographical distribution. The Center for Vectors and Infectious Diseases Research from the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge in their National Reference Laboratory for Vector Borne Virus has developed diagnostic methods and epidemiological studies of arboviruses since the beginning of the 90s. The Zika diagnosis was developed and standardized in 2007. The Laboratory developed molecular and serological diagnostic tests and have identified several imported cases of Zika infections into Portuguese territory and performed the differential diagnosis with Dengue and Chikungunya and screening for infection in pregnant women and in suspected cases of sexual transmission.

_Introdução

O vírus Zika é um arbovírus (*arthropod borne virus*) do género flavivírus transmitido por mosquitos e isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika no Uganda (1).

De 1947 a 2006 foram identificadas várias espécies de mosquitos do género *Aedes* como vetores e estudos epidemiológicos demonstravam prevalências até 50% em populações africanas e do sudeste asiático. Nesse período foram descritos unicamente 14 casos clínicos e duas infeções no laboratório (2,3). A doença provocada por Zika era descrita como ligeira, auto-limitada, com febre, cefaleias, mal-estar e exantema maculopapular (4,5).

Em 2007 a distribuição e expansão geográfica do vírus Zika emergiu, primeiro na ilha de Yap, Micronésia, depois noutras regiões como na Polinésia Francesa, Nova Caledónia, Ilhas Cook em 2013/2014 e em outras regiões do Oceano Pacífico, incluindo Ilha de Páscoa (Chile) (6). Em 2015 as infeções por vírus Zika foram identificadas pela primeira vez no Brasil. Atualmente é conhecida a sua presença em 65 países, 62 dos quais reportaram pela primeira vez a evidência de transmissão vetorial após 2015, nomeadamente nas Américas e Cabo Verde (7).

A maioria (80%) das infeções por vírus Zika é assintomática. Quando há desenvolvimento de quadro clínico este caracteriza-se usualmente por, após um período de incubação de três a 12 dias, ocorrência de febre ligeira, exantema (predominantemente maculopapular), cefaleias, artralguas, mialgias, astenia e sufusão conjuntival.

As infeções por vírus Zika foram associadas a complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré na Polinésia Francesa em 2014, assim como a casos de microcefalia e outras malformações do sistema nervoso central

em infeções congénitas no Brasil em 2015 o que levou a Organização Mundial da Saúde a considerar, em fevereiro de 2016, os casos de microcefalia e de outros distúrbios neurológicos, provavelmente associados a Zika, como uma emergência internacional de saúde pública (8).

A transmissão de vírus Zika ocorre, sobretudo, através da picada de mosquitos do género *Aedes*. Em 2011 e em 2014 foi descrito, pela primeira vez, o facto, inédito entre arbovírus, da possibilidade de transmissão de Zika por via sexual e transmissão perinatal e congénita (9,10,11). Prováveis transmissões de origem sexual foram posteriormente reportadas em 11 países e a transmissão perinatal e congénita foi reportada em 13 países ou territórios (7).

Outros vírus emergiram no passado com a mesma expressão que o vírus Zika, nomeadamente o vírus Dengue (também um flavivírus), com origem asiática e distribuído atualmente por todo o hemisfério sul, e o vírus Chikungunya (alfavírus) com origem africana, já conhecido na Ásia e introduzido na América Central e do Sul, a partir das Caraíbas em dezembro de 2012, sendo actualmente identificados milhares de casos por ano nessas regiões (12,13).

As infeções por vírus Zika, Dengue e Chikungunya partilham o vetor (mosquitos do género *Aedes*) e os sinais e sintomas de doença, partilham agora também uma extensa distribuição geográfica, o que torna muito difícil diferenciar clinicamente os diferentes agentes etiológicos sem a disponibilização do diagnóstico laboratorial.

O facto de o vírus Zika estar associado à ocorrência de malformações congénitas, como a microcefalia, e a sintomas neurológicos, como Guillain-Barré, reforça a necessidade de diagnosticar laboratorialmente as infeções por este vírus.

O Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) no seu Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores tem desenvolvido o diagnóstico e estudos epidemiológicos de vírus transmitidos por artrópodes desde o princípio dos anos 90. O diagnóstico de Zika foi desenvolvido e padronizado em 2007. O laboratório desenvolveu testes de diag-

nóstico molecular e serológico tendo identificado vários casos de importação para o território português e feito o diagnóstico diferencial em grávidas e em casos de transmissão sexual (14).

_Objetivos

Os objetivos deste artigo são alertar para importância do diagnóstico e métodos utilizados no diagnóstico laboratorial de infeções por vírus Zika e apresentar a casuística de infeção por Zika identificados no CEVDI/INSA de junho de 2015 a junho de 2016.

_Material e métodos

O vírus Zika foi considerado, desde a sua descoberta até 2007, um vírus em que a maioria das infeções eram assintomáticas ou com capacidade para desenvolver doença ligeira e auto-limitada, não tendo sido, por isso, desenvolvidos métodos de diagnóstico comerciais. No entanto alguns laboratórios, como o CEVDI/INSA logo em 2007, desenvolveram métodos de diagnóstico *in house*.

Diagnóstico molecular

A deteção do RNA de vírus Zika pode ser realizada, até cinco dias após o início dos sintomas, por métodos de biologia molecular no sangue, plasma e soro e, do segundo até ao décimo dia após início dos sintomas, na urina.

No CEVDI/INSA o RNA do vírus Zika é detetado, após extração dos ácidos nucleicos da amostra clínica, por RT-PCR em tempo real (15). Nas amostras positivas é posteriormente aplicado um procedimento de RT-PCR convencional para que os produtos de amplificação sejam purificados e sequenciados (16). A análise das sequências obtidas permite confirmar de forma inequívoca o diagnóstico e identificar a linhagem da estirpe.

As amostras colhidas para análise por biologia molecular devem ser guardadas e transportadas em frio, por períodos de até dois dias, ou congeladas, por períodos de mais de dois dias, uma vez que o RNA viral se degrada facilmente.

Um resultado positivo por biologia molecular confirma a suspeita clínica.

Um resultado negativo, com suspeita clínica, deve ser avaliado, sobretudo para as condições de transporte da amostra e para

artigos breves_ n. 1

o número de dias após o início dos sintomas em que a colheita foi feita. Em ambos os casos o diagnóstico serológico, numa amostra colhida posteriormente (mais de três dias após início dos sintomas), pode contribuir para o esclarecimento do caso.

Diagnóstico serológico

Os anticorpos anti-Zika são detetáveis normalmente a partir do terceiro (IgM) e quarto (IgG) dia após início dos sintomas no soro. Os anticorpos IgM persistem pelo menos durante três meses e os IgG provavelmente para sempre. As reações serológicas cruzadas entre Zika e outros flavivírus, como, por exemplo, Dengue e Febre-amarela, são conhecidas.

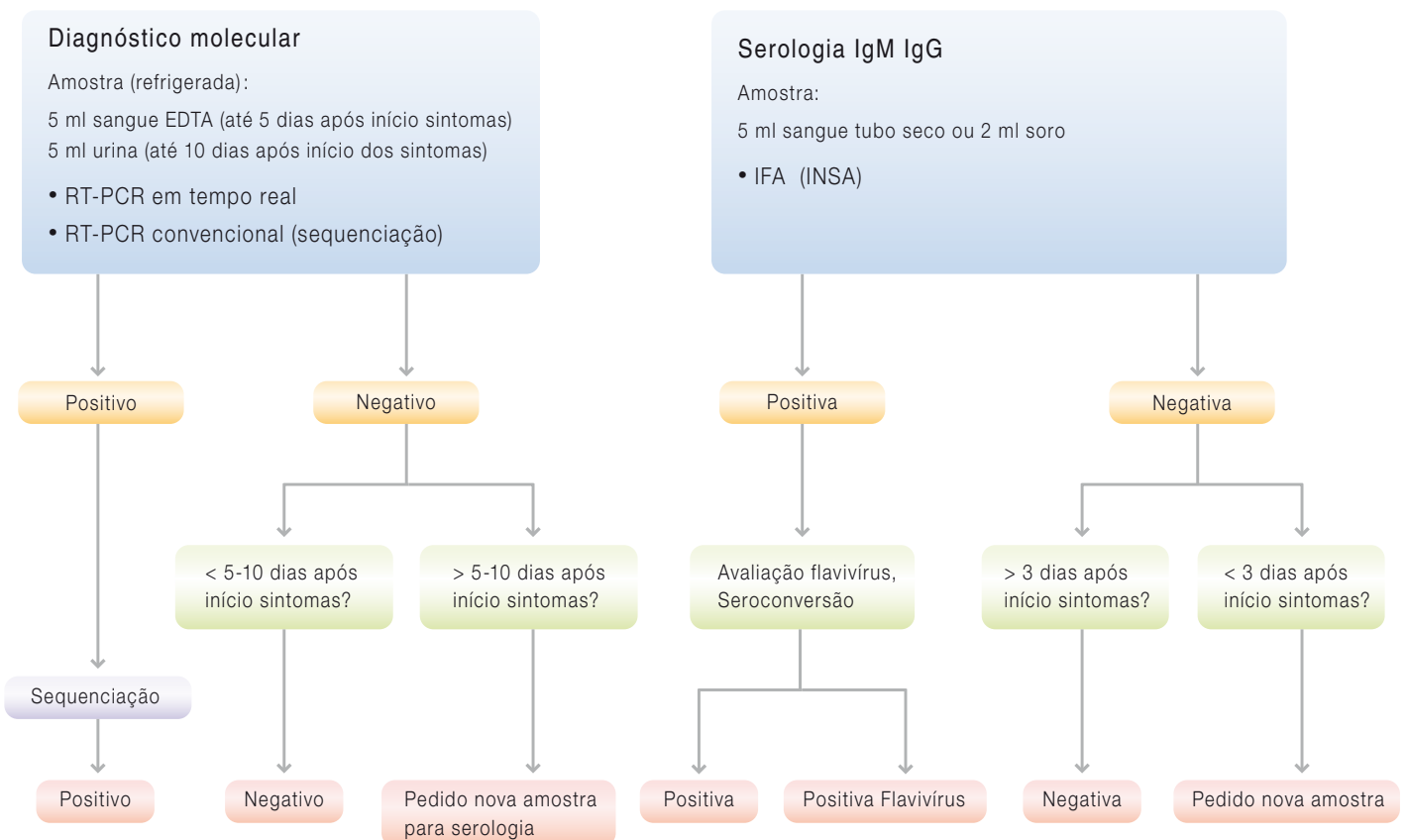
No CEVDI/INSA as amostras de soro são testadas por IFA *in-house* (IgM e IgG).

Um resultado negativo por serologia exclui o contacto com Zika ou outro flavivírus.

Um resultado positivo tem que ser avaliado para outros flavivírus, com titulação da amostra, e/ou analisada uma segunda amostra, colhida pelo menos com dez dias de intervalo da primeira, para identificação de seroconversão. É também essencial que seja conhecido o histórico de vacinas do doente, sobretudo de vacinas de flavivírus, como Febre-amarela, Encefalite Japonesa e Encefalite Transmitida por Carraças (TBE), que podem interferir com a interpretação do resultado serológico.

As amostras com pedido de diagnóstico molecular e serológico devem chegar ao laboratório acompanhadas de inquérito que permite ao laboratório fazer a avaliação dos casos e interpretação do algoritmo do CEVDI/INSA (figura 1).

Figura 1: Algoritmo utilizado no diagnóstico de Zika no Laboratório Nacional de Referência de Vírus Transmitidos por Vetores (CEVDI/INSA).



_Resultados

O diagnóstico laboratorial de Zika pode ser solicitado ao CEVDI/INSA como Zika -diagnóstico molecular- e como -diagnóstico serológico- Zika, ou incluído em painel Flavivírus (em que são também testados os anticorpos anti-Dengue, Febre-amarela, *West Nile* e TBE), ou incluído em painel Arbovírus (em que, para além dos Flavivírus, são analisados anticorpos anti-Chikungunya, Toscana, Dhori e Thogoto).

De junho de 2015 a junho 2016 foram enviadas ao laboratório 388 amostras com pedido específico de diagnóstico de Zika. A maior parte dos pedidos de diagnóstico coincidem temporalmente com a confirmação da ocorrência de infeções congénitas assim como da transmissão por via sexual realizada pela Organização Mundial da Saúde (fevereiro) não se tratando provavelmente de casos de suspeita de doença mas de diagnóstico diferencial ou exclusão de infeção nas grávidas (gráfico 1).

De junho de 2015 a junho 2016 foram confirmados 17 casos positivos de infeção por Zika.

Oito casos positivos (47%) foram confirmados por biologia molecular, sobretudo na urina. Em três casos (18%) foi identificada virúria e anticorpos IgM específicos e, também em três casos

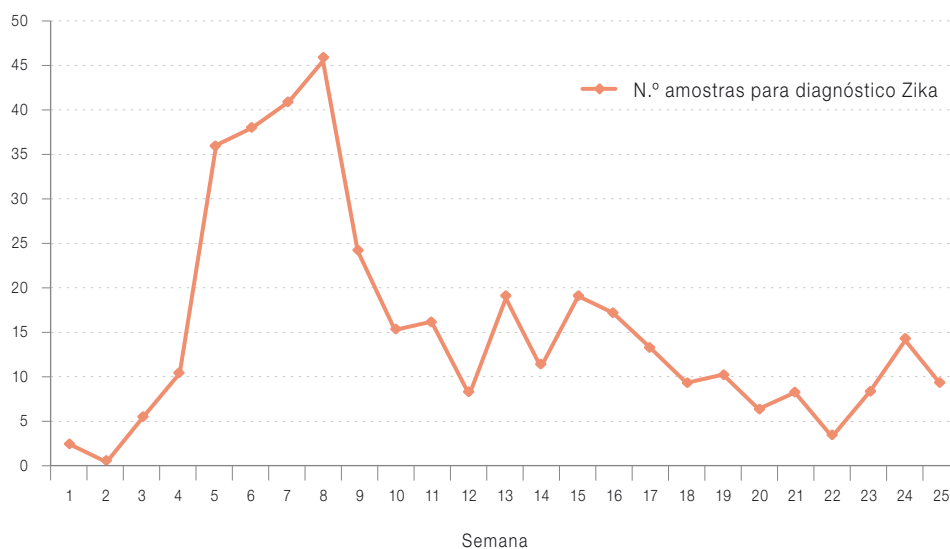
Quadro 1: Descrição do número de casos confirmados por método e amostra.

Método	Amostra Sangue (virémia), Urina (virúria), Soro (Ac IgM)	N.º casos confirmados
Biologia molecular	Virémia	0
	Virémia e Virúria	2
	Virúria	6
Biologia molecular e Serologia	Virémia e Ac IgM	0
	Virúria e Ac IgM	3
	Virémia e Ac IgM/IgG Flavivírus	0
	Virúria e Ac IgM/IgG Flavivírus	3
Serologia	Ac IgM com seroconversão	3
Total		17

(18%), foi confirmada virúria e anticorpos anti-flavivírus evidenciando infeção anterior, ou coinfeção, por outro flavivírus (quadro 1).

Em todas as amostras em que o resultado de biologia molecular foi positivo foi confirmada a linhagem asiática do vírus Zika como a causa de infeção.

Gráfico 1: Evolução do número de pedidos de diagnóstico específico de Zika em 2016.



Na folha de inquérito, que deve acompanhar a amostra, foi referido pelos clínicos, nos sinais e sintomas, a febre em 12 casos (71%) e o exantema em 14 (82%). As mialgias e artralguas foram referidas em nove casos (53%) e a conjuntivite em dois casos (12%).

A origem geográfica dos casos de importação foi, sobretudo, Brasil com 13 casos (76%) identificados. Foram também diagnosticados três casos com origem na Colômbia, Martinica e Venezuela e um caso autóctone com provável infeção por via sexual.

_Conclusões

Depois de um período de 60 anos em que o vírus Zika não foi considerado importante clinicamente, não tendo sido desenvolvidas nem aplicadas técnicas de diagnóstico laboratorial pela maior parte dos laboratórios, tornou-se evidente a necessidade de diagnosticar com certezas a infeção por vírus Zika, seja pela gravidade da sintomatologia (casos neurológicos), pela infeção perinatal e congénita (casos de microcefalia), pelo diagnóstico diferencial com Dengue e Chikungunya ou para despiste de transmissão sexual e infeção na grávida.

No diagnóstico laboratorial tornou-se evidente que um diagnóstico molecular positivo confirma um caso. No entanto um resultado negativo deve ser avaliado ou sujeito a confirmação por serologia posteriormente.

Na natureza da amostra a enviar ao laboratório, a urina confirma-se como uma amostra importante, uma vez que a virúria prolonga o período de deteção do vírus até pelo menos ao décimo dia após início dos sintomas, devendo ser sempre enviado ao laboratório amostra de sangue em EDTA e urina.

O diagnóstico serológico é importante na confirmação de ausência de anticorpos anti-flavivírus (resultado negativo). No entanto um resultado positivo tem que ser avaliado com nova amostra e titulação para outros flavivírus o que, no fim, até pode não levar ao um resultado conclusivo.

A colaboração entre clínicos e o laboratório de referência é essencial para a identificação de novos casos e para o esclarecimento de diagnóstico diferencial e em despiste de infeções congénitas por Zika.

Referências bibliográficas:

- (1) Dick GWA, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.
- (2) Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014;44(7):302-7.
- (3) Filipe AR, Martins CM, Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1973;43(4):315-9.
- (4) Simpson DIH. Zika virus infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; 58:335-8.
- (5) Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serological properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- (6) Petersen LR, Denise JJ, Powers AM, et al. Zika virus. *N Engl J Med.* 2016;374(16):1552-63. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
- (7) World Health Organization. Zika situation report, 7 July 2016. www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/7-july-2016/en/
- (8) World Health Organization. Zika situation report, 5 February 2016. www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/5-february-2016/en/
- (9) Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, et al. Probable non-Vector transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):880-2. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- (10) Besnard M, Lastère S, Teissier A, et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(13):pii=20751. www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20751
- (11) Pan American Health Organization/World Health Organization. Epidemiological Alert: Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas, 1 December 2015. www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32396&lang=en
- (12) Pan American Health Organization/World Health Organization. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country, July 7 2016 (EW25). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3273&Itemid=40734&lang=en
- (13) Pan American Health Organization/World Health Organization. Number of reported cases of Chikungunya Fever in the Americas - Cumulative cases, May 13, 2016 (EW 20). www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en
- (14) Zé-Zé L, Prata MB, Teixeira T, et al. Zika virus infections imported from Brazil to Portugal, 2015. *IDCases* 2016; 4: 46-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2016.03.004>
- (15) Faye O, Faye O, Diallo D, et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Virology* 2013;22;10(1):311. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-311>
- (16) Balm MN, Lee CK, Lee HK, et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *J Med Virol.* 2012;84(9):1501-5. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.23241>