



Ana Sofia Nascimento Gonçalves

A infecção pelo vírus Zika: O desafio do diagnóstico laboratorial

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Sofia Nascimento Gonçalves

A infecção pelo vírus Zika: O desafio do diagnóstico laboratorial

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Ana Miguel Duarte Matos Silva e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

tutor

(Professora Ana Miguel Duarte Matos Silva)

estudante

(Ana Sofia Nascimento Gonçalves)

Eu, Ana Sofia Nascimento Gonçalves, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2009107770, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de julho de 2016.

(Ana Sofia Nascimento Gonçalves)

*Agora que finalizo o meu percurso académico, não posso deixar de prestar o meu agradecimento:
À minha orientadora Professora Doutora Ana Miguel Silva, por sempre se mostrar disponível para
me ajudar, por todo o tempo que disponibilizou e conhecimentos que me transmitiu;*

*Aos meus pais, os meus grandes pilares, o meu enorme agradecimento por todos os ensinamentos e
valores que sempre me transmitiram e me tornaram a pessoa que sou hoje. Por sempre me terem
apoiado nas decisões que tive que tomar neste percurso e me fazerem acreditar que vale a pena
lutar pelos nossos sonhos. Devo-vos tudo!*

*Aos restantes familiares, por sempre terem uma palavra de incentivo e um gesto de carinho.
Aos verdadeiros amigos, por terem sido uma peça fundamental nesta caminhada, estando sempre
presentes nos momentos menos bons mas também em todas as vitórias e conquistas.*

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”*

Anatole France

RESUMO

O vírus Zika foi inicialmente descoberto no Uganda, África, e era considerado um vírus inofensivo, conhecido por uma prevalência relativamente baixa em regiões de África e Ásia. Raras complicações graves relacionadas com a infecção foram reportadas no passado. No entanto, o vírus Zika é atualmente um dos vírus emergentes mais importantes no mundo e recentemente, tem causado surtos e epidemias, tendo sido associado a graves malformações congênitas e manifestações clínicas, incluindo microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. O impacto global destas descobertas na saúde pública evidência a necessidade de um teste de diagnóstico rápido, mas específico, que possa ser desenvolvido rapidamente para distribuição e uso em regiões epidémicas.

Até agora, o diagnóstico da infecção pelo vírus Zika depende da técnica *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, um método rápido, sensível e específico para a deteção do vírus na fase inicial da infecção, e da serologia, que representa um desafio devido à ocorrência de reações cruzadas com outro flavivírus.

PALAVRAS-CHAVE: Vírus Zika; flavivírus; Diagnóstico Laboratorial; Anticorpos; Investigação.

ABSTRACT

Zika virus was initially discovered in Uganda, África, and was considered a harmless virus, known to exist at a relatively low prevalence in parts of Africa and Asia. Serious complications due to Zika virus infection was rarely reported in the past. However, is currently one of the most importante emerging viruses in the world and recently has caused outbreaks and epidemics, and has been associated with severe congenital malformations and clinical manifestations, including microcephaly and Guillain-Barré syndrome. The overall public health impact of these findings highlights the need for a rapid but specific diagnostic test that can be rapidly developed for distribution and use in epidemic regions.

Until now, Zika virus infection diagnosis relies on reverse transcription polymerase chain reaction, an rapid, sensitive and specific method for detection of virus in the early stage of infection, and serology, wich is challenging due to cross-reactions with other flaviviruses.

KEYWORDS: Zika virus; flaviviruses; Laboratory diagnosis; Antibodies; Investigation.

ABREVIATURAS

Ag-Ac – Antígeno – Anticorpo

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADNc – ADN complementar

ARN – Ácido Ribonucleico

CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

IFI – Imunofluorescência Indireta

Ig – Imunoglobulina

kb – Kilo-bases

MAC-ELISA – *IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

NASBA – *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PRNT – *Plaque-Reduction Neutralization Test*

RBS – *Ribosome Binding Site*

RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

VZIK – Vírus Zika

ÍNDICE

1. O vírus Zika	1
1.1. História e Epidemiologia	1
1.2. Classificação	1
1.3. Estrutura do vírus	1
1.4. Transmissão do vírus	2
1.5. Aspectos clínicos e laboratoriais associados à infecção pelo vírus Zika	4
1.6. Principais complicações que têm vindo a ser associados à infecção pelo vírus Zika ...	4
2. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus Zika	6
2.1. Cultura viral	6
2.2. RT-PCR	7
2.2.1. <i>Design</i> do primer e da sonda	8
2.2.2. Vantagens da utilização desta técnica no diagnóstico do vírus Zika	8
2.2.3. Resultados e precauções na sua interpretação	9
2.3. Serologia	9
2.3.1. IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA)	9
2.3.1.1. Fundamento da técnica	10
2.3.1.2. Limitações da técnica e interpretação dos resultados	10
2.3.2. PRNT	11
2.3.2.1. Fundamento da técnica	11
2.3.2.2. Limitações da técnica	12
2.4. Deteção do vírus em amostras sanguíneas vs. outras amostras biológicas	12
2.4.1. Deteção do vírus na saliva	12
2.4.2. Deteção do vírus na urina	13
2.4.3. Deteção do vírus no sémen	14
2.4.4. Deteção do vírus no leite materno	14
3. Desenvolvimentos recentes nas técnicas de diagnóstico	15
3.1. ELISA baseado num antígeno recombinante específico e Imunofluorescência Indireta (IFI) – <i>Arboviral Fever Mosaic 2 test</i>	15
3.2. Zika detection on filter paper	17
3.2.1. Deteção de sequências específicas do vírus Zika	17
3.2.2. Diferenciação da linhagem do vírus Zika	19
4. Conclusão	21
5. Referências	22

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma do VZIK	2
Figura 2 – Representação esquemática do ciclo silvático e do ciclo urbano que envolvem a transmissão do VZIK utilizando o mosquito como vetor	3
Figura 3 – Representação de uma cultura de células Vero não inoculada (A) e inoculada com amostras de urina e saliva contendo VZIK (B)	7
Figura 4 – Reação de PCR em tempo real com detecção dos produtos amplificados por sonda TaqMan	8
Figura 5 – Algoritmo de interpretação do teste MAC-ELISA	10
Figura 6 – Tecnologia Biochip e Mosaicos.....	16
Figura 7 – Técnica de IFI e respetivo diagnóstico diferencial dos vírus Dengue, Chikungunya e Zika.....	16
Figura 8 – Representação esquemática da plataforma de diagnóstico que utiliza sensores biomoleculares e tecnologia baseada no gene CRISPR.....	17
Figura 9 – Representação esquemática do modo de funcionamento dos sensores biomoleculares utilizados na plataforma de diagnóstico	18
Figura 10 – Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)	18
Figura 11 – Clivagem pelo método NASBA-CRISPR	19
Tabela 1 – Proteínas chave do vírus e as suas funções	2
Tabela 2 – Número de resultados positivos e negativos obtidos pela técnica de RT-PCR para amostras de saliva e sangue	13

I. O VÍRUS ZIKA

I.1. História e Epidemiologia

O vírus Zika (VZIK) foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra de sangue de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*) durante um estudo do vírus da Febre-Amarela, na floresta Zika, Uganda, em 1947. Em 1948 foi isolado a partir de mosquitos *Aedes africanus* também no mesmo local, sugerindo desde então que o vírus pudesse ser transmitido através de picada de mosquito. Em 1954, o VZIK foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra sanguínea humana na Nigéria, começando-se assim a implicar o seu envolvimento patogénico em humanos. A partir daqui foram reportados alguns casos em países Africanos e Asiáticos, estando a infeção restringida a estas áreas, com menos de 20 casos esporádicos reportados nos primeiros 60 anos após a sua descoberta. Foi em 2007 que houve a primeira grande epidemia, na ilha Yap do Estado Federal da Micronésia. A partir daqui, também na Polinésia Francesa se registou outro grande acontecimento epidémico em outubro de 2013. Desde então, o vírus rapidamente se espalhou para outros locais e foi em 2015 que se registou no Brasil a maior epidemia da América Latina com 500,000 a 1,500,000 casos estimados de infeção⁽¹⁾.

I.2. Classificação

O VZIK pertence à família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*^(1,2). Esta família pertence a um grupo de vírus denominado arbovírus, que se caracterizam por serem vírus de ácido ribonucleico (ARN) em que na sua maioria dependem de artrópodes para a sua transmissão⁽²⁾. As duas maiores linhagens do VZIK são a Africana e a Asiática, distinguíveis através da análise detalhada da sua sequência genómica e são responsáveis por causar a maioria das infeções na África e Ásia, respetivamente⁽¹⁾. Devido à rápida propagação do vírus e à sua introdução no hemisfério ocidental, houve uma evolução e uma nova linhagem foi introduzida, a Americana, que inclui agora cadeias de vírus isoladas no Brasil, Porto Rico, Haiti, Guatemala e Suriname⁽³⁾.

I.3. Estrutura do vírus

O VZIK é um vírus envelopado, de cadeia simples de ARN de polaridade positiva^(1,2,4). Possui um genoma de cerca de 11 kilo-bases (kb) codificante de uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais, nomeadamente a proteína da cápside (C), pré-membrana (prM) e envelope (E) e sete proteínas não-estruturais, NS1, NS2, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e

NS5^(2,4,5)(Figura I). Estas proteínas têm funções importantes na replicação e organização viral (Tabela I).

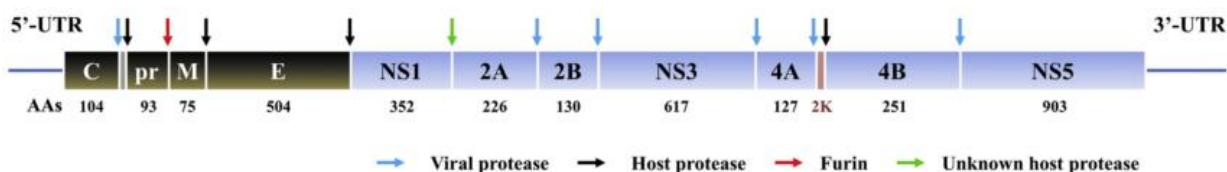


Figura I – Organização do genoma do VZIK. As proteínas estruturais e não estruturais estão aqui representadas a cinzento e azul, respetivamente. As setas azuis, pretas e vermelhas representam os locais de clivagem da protease viral NS2B/NS3, proteases do hospedeiro e da protease furina, respetivamente⁽⁵⁾.

Tabela I – Proteínas chave do vírus e as suas funções (Adaptado)⁽⁴⁾.

Proteínas	Funções
C	Ligação do ARN para formar a nucleocápside.
prM, M	Estabilização da partícula viral, secreção da proteína E.
E	Ligação do recetor, fusão membranar.
NS1	Replicação viral.
NS2A	Síntese de ARN e organização da partícula viral.
NS2B	Complexa com a NS3 e funciona como uma protease serina.
NS3	Complexa com a NS2B e funciona como uma protease serina.
NS4A	Replicação viral.
NS4B	Replicação viral.
NS5	Atividade Metiltransferase e Guaniltransferase; Revestimento e síntese de ARN; ARN polimerase ARN dependente.

I.4. Transmissão do vírus

Tal como outros flavivírus, o VZIK transmite-se maioritariamente através da picada de mosquitos⁽¹⁾, que funcionam aqui como vetor, e os primatas não-humanos e humanos são provavelmente os principais reservatórios do vírus⁽²⁾. Durante a picada do vetor é injetada saliva infetada para a corrente sanguínea do hospedeiro, constituindo esta a forma biológica

mais comum de transmissão do vírus⁽⁶⁾. Os principais vetores são do género *Aedes*, em particular *Ae. aegypti* originário de África e também *Ae. albopictus*, da região Asiática^(2,4).

O *Ae. aegypti*, principal transmissor do VZIK, tem a capacidade de se reproduzir em pequenas quantidades de água e é conhecido por ser ativo e agressivo durante o dia e muitas vezes no interior das habitações. O mosquito *Ae. aegypti* sobrevive durante 2-4 semanas, contrariamente aos seus ovos que podem sobreviver durante longos períodos de tempo, especialmente em locais secos, sendo responsáveis pela introdução de grandes quantidades de mosquitos no ambiente depois de um inverno frio e seco. Para além da transmissão do VZIK, o *Ae. aegypti* é também transmissor de outras infeções tais como Dengue, Febre-Amarela e Chikungunya⁽²⁾.

Acredita-se que em África o VZIK é mantido num ciclo silvático, envolvendo primatas não-humanos como reservatório. Em zonas onde não existem estes primatas não-humanos, como é o caso dos locais onde ocorreram as epidemias mais recentes, acredita-se que o vírus entra num ciclo urbano, ou seja, humano-mosquito-humano, sugerindo assim que o vírus conseguiu adaptar o seu ciclo a reservatórios humanos⁽⁶⁾(Figura 2).

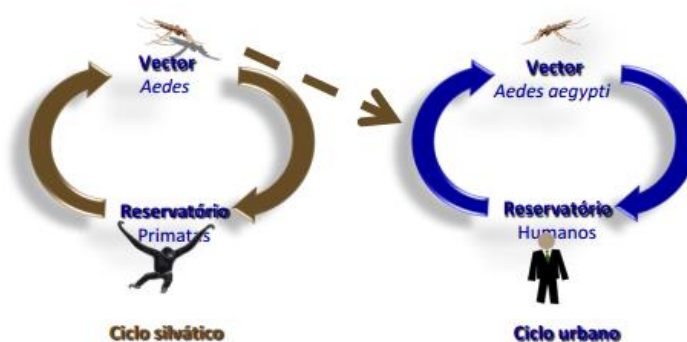


Figura 2 – Representação esquemática do ciclo silvático e do ciclo urbano que envolvem a transmissão do VZIK utilizando o mosquito como vetor⁽⁷⁾.

Para além desta via de transmissão, existem estudos que começam a dar suporte ao facto de que o vírus pode apresentar outros meios de transmissão sem utilizar o mosquito como vetor, nomeadamente, transmissão vertical, sexual e sanguínea⁽⁸⁾.

Relativamente à possível transmissão vertical, há evidências da presença de ARN viral no líquido amniótico de grávidas cujos fetos apresentavam anomalias cerebrais, detetadas na realização de ecografias e, para além disso, foram identificados antígenos virais e ARN no tecido cerebral de crianças que nasceram com microcefalia, e que vieram a morrer pouco tempo depois do nascimento⁽⁸⁾.

Uma possível transmissão sexual está também a ser estudada, devido à deteção de partículas virais replicativas e ARN viral em amostras de sémen⁽⁸⁾.

A hipótese da transmissão através de transfusão sanguínea surgiu da capacidade de outros arbovírus como o Dengue, serem transmitidos por essa forma. Assim sendo, a possibilidade de transmissão do VZIK por esta via deve ser tida em consideração e para prevenir uma potencial transmissão, é necessária a implementação de protocolos em áreas epidémicas que permitam testar amostras de doadores para a presença de ácido nucleico de VZIK^(6,8).

1.5. Aspectos clínicos e laboratoriais associados à infeção pelo vírus Zika

Depois de um período de incubação de 3 a 12 dias, os sinais e sintomas da infeção pelo VZIK iniciam-se pelo aparecimento de dor de cabeça, erupção maculopapular que envolve principalmente a planta dos pés e mãos, febre, mialgia, anorexia, conjuntivite, artralgia, e alguns sintomas abdominais⁽⁴⁾.

Relativamente a aspetos clínicos laboratoriais, algumas alterações a nível sanguíneo como, leucopenia, trombocitopenia, albuminémia e aumento dos níveis de transaminases têm sido reportadas, bem como a presença de pigmento bilar na urina⁽⁶⁾.

Visto que os aspetos clínicos e laboratoriais acima referidos não são específicos da infeção pelo VZIK, não podem ser utilizados por si só para diferenciar a infeção pelo VZIK de infeções causadas por outros arbovírus, como o Dengue e Chikungunya. Aliado a este facto é comum haver uma co-circulação de diferentes arbovírus na mesma região geográfica, o que dificulta ainda mais um possível diagnóstico da infeção pelo VZIK por meios clínicos e laboratoriais⁽⁴⁾.

1.6. Principais complicações que têm vindo a ser associadas à infeção pelo vírus Zika

Uma situação que atualmente representa um grande problema de saúde pública é o facto de sérias complicações estarem a ser associadas à infeção pelo VZIK nomeadamente anomalias congénitas e problemas neurológicos. Até agora, esta infeção era considerada relativamente benigna, o que fez com que o estudo do vírus não estivesse desenvolvido o suficiente para se perceber os fatores que conduzem a estas complicações no ser humano⁽⁴⁾.

Esta situação teve início durante a epidemia ocorrida na Polinésia Francesa, onde se verificou um aumento da incidência de Síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma patologia auto imune normalmente desencadeada por infeções virais ou bacterianas que ocorrem

aproximadamente 2 a 8 semanas antes do início do SGB⁽³⁾. Essa incidência foi cerca de 20 vezes superior à verificada em períodos em que não ocorria um desenvolvimento epidêmico desta infecção. Uma associação com esta síndrome foi também reportada na epidemia ocorrida na América Latina desde 2015. No Brasil, durante a fase epidêmica de VZIK, 62% dos doentes com SGB apresentaram sintomas consistentes com a infecção pelo VZIK. Em relação à mortalidade associada, é raro haver casos reportados, no entanto ainda não está bem detalhada até ao momento. Os fatores subjacentes à associação entre o SGB e a infecção pelo VZIK não foram ainda determinados. Pensa-se que infecções sequenciais com arbovírus podem exacerbar a resposta imunitária e conduzir ao início de um processo imunopatogénico que tem como alvo principal os nervos periféricos, levando ao desenvolvimento desta neuropatia. Ainda assim, a maioria dos casos que surgiram associados ao VZIK apresentaram uma duração transitória e a maior parte dos doentes tiveram uma recuperação com resultados positivos⁽³⁾.

Outra das sequelas mais inesperadas da infecção pelo VZIK foi a associação com anomalias congénitas, em particular microcefalia fetal e em recém-nascidos. A microcefalia trata-se de uma condição onde a cabeça é caracteristicamente mais pequena comparativamente a bebés com o mesmo sexo e idade gestacional^(8,9). Isto pode resultar em graves sequelas neurológicas, problemas de movimento e equilíbrio e perturbações no desenvolvimento da fala e em caminhar⁽⁹⁾ podendo mesmo em alguns casos, levar a mortes intrauterinas ou durante o período neonatal. A primeira ligação entre a microcefalia e a infecção pelo VZIK foi observada em 2015 no Brasil, onde o número de crianças com esta anomalia congénita aumentou 20 vezes depois do início da epidemia, com mais de 1200 casos reportados em 2015. A somar a esta ocorrência, foi também registada calcificação cerebral em fetos e crianças⁽⁴⁾. Estes acontecimentos realçam a importância da implementação de algumas medidas: diagnósticos precoces, através da monitorização de mulheres grávidas com historial recente de viagens a áreas endémicas; uma apertada vigilância pré e pós natal; a exclusão de infecções causadas por outros vírus (como toxoplasmose, citomegalovírus e rubéola) e amniocentese para investigação virológica se houver suspeita da ocorrência de anomalias⁽⁴⁾.

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA

Para um diagnóstico definitivo da infecção pelo VZIK, é necessária uma confirmação virológica uma vez que este não apresenta características patognomônicas ou bioquímicas que permitam distinguir com segurança uma infecção pelo VZIK de uma infecção provocada por outros arbovírus. Para além disso, as anomalias congénitas que têm vindo a ser associadas à infecção também não permitem a distinção de outras causas infecciosas, tóxicas ou genéticas⁽¹⁾.

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado recorrendo a vários métodos: deteção do vírus, ácido nucleico viral, antigénios virais e ainda anticorpos anti-VZIK, podendo também efetuar-se uma combinação destas formas de diagnóstico. A escolha do método a utilizar vai depender de alguns aspetos, tais como a finalidade para a qual é efetuado o teste (clínica, estudos epidemiológicos ou desenvolvimento de vacinas), o tipo de instalações laboratoriais, o pessoal especializado disponível e a altura de colheita da amostra. Quando a amostra é colhida durante os primeiros dias após o início dos sintomas, a deteção viral ou deteção do ácido nucleico podem ser efetuados, por meio de cultura viral ou recorrendo ao método de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), respetivamente. Para além disto, a deteção de antigénios virais também pode ser efetuada por imunohistoquímica. No caso de a amostra ser colhida alguns dias após o início dos sintomas, ou seja, após a fase de virémia, pode recorrer-se ao diagnóstico da infecção pelo VZIK por meio de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) e G (IgG). Estes podem ser detetados com testes serológicos, sendo o método *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) o mais utilizado⁽¹⁰⁾.

2.1. Cultura Viral

A deteção do VZIK por meio de cultura viral foi já realizada recorrendo à inoculação de amostras de soro possivelmente contaminadas pelo VZIK numa cultura celular, utilizando para este fim linhagens de células de mosquitos ou de mamíferos^(4,6,10), ou por inoculação intracerebral em ratos recém-nascidos^(4,10). O isolamento viral é restrito a laboratórios especializados e muitas vezes a sua taxa de sucesso é baixa, podendo os baixos níveis de virémia explicar essa dificuldade no isolamento⁽¹⁰⁾.

Relativamente às linhas celulares para cultura, mostraram-se mais sensíveis as células Vero, células de rim de macaco rhesus (LLC-MK2) e de rim de porco (PS-C1), tendo igualmente sucesso as células C6/C36 de mosquito⁽⁶⁾. Estas são utilizadas para fins de investigação e não como um método rotineiro para a deteção do VZIK⁽⁴⁾.

As amostras de soro foram as primeiras a ser testadas na detecção do vírus por meio de cultura viral⁽⁶⁾ mas um estudo desenvolvido pelo Instituto Oswaldo Cruz detetou a presença de VZIK ativo em amostras de saliva e urina, através da observação de efeito citopático numa cultura de células Vero⁽¹²⁾ (Figura 3).

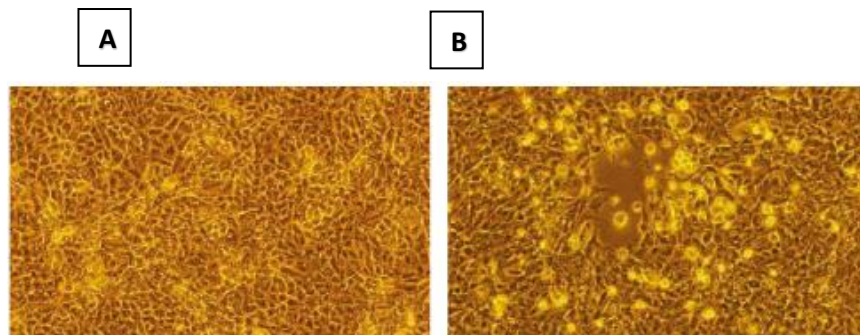


Figura 3 – Representação de uma cultura de células Vero não inoculada (A) e inoculada com amostras de urina e saliva contendo VZIK (B)⁽¹²⁾.

2.2. RT-PCR

A técnica de RT-PCR é bastante útil para detecção de ácido nucleico viral. Para a sua realização há que ter em atenção que na grande maioria dos casos de infeção pelo VZIK a virémia é transitória e portanto o diagnóstico por este método tem mais sucesso se for feito dentro de uma semana após o início dos sintomas clínicos⁽⁸⁾.

A necessidade de haver uma reação de transcrição reversa antes da amplificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) prende-se com o facto de o VZIK apresentar como genoma uma cadeia simples de ARN, e assim poder haver uma conversão de ARN em ácido desoxirribonucleico complementar (ADNc), seguindo-se a reação de PCR para amplificação das sequências alvo específicas de ADNc que se pretendem detetar⁽⁶⁾.

Recorre-se mais frequentemente à realização de um PCR em tempo real utilizando uma sonda fluorescente do tipo TaqMan^(15,16). Este tipo de técnica permite uma detecção fiável dos produtos gerados durante cada ciclo de PCR, onde sabemos em tempo real que a amostra está a amplificar e que estamos perante um resultado positivo. Isto devido à introdução de um conjunto primer/sonda (fragmentos de ADN usados para hibridar com uma outra molécula de ADN)⁽¹³⁾ cujo *design* é baseado na sequência alvo que se pretende detetar⁽¹⁴⁾(Figura 4).

Para que a técnica de PCR se revele eficaz é necessário avaliar alguns parâmetros essenciais, tais como: método de extração do ARN, escolha da transcriptase reversa, escolha da ADN polimerase e o programa termocíclico⁽¹⁷⁾, sendo que a temperatura tem que ser adaptada às diferentes reações que ocorrem durante a técnica.

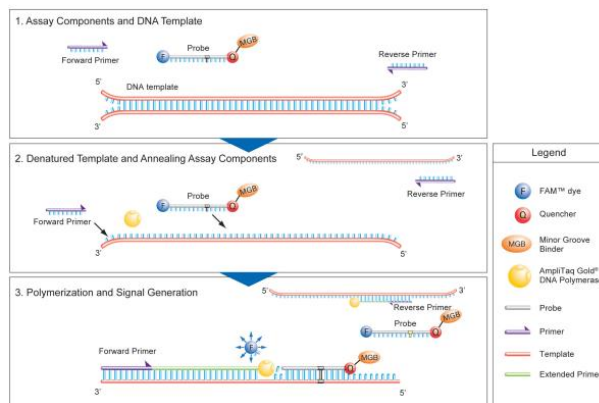


Figura 4 – Reação de PCR em tempo real com detecção dos produtos amplificados por sonda TaqMan⁽¹⁸⁾.

2.2.1. Design do primer e da sonda

Este representa um dos passos mais importantes e que se vai refletir na eficácia da técnica no diagnóstico laboratorial.

Devem ser escolhidos primers e sondas com base em regiões do genoma viral com elevado grau de conservação e especificidade⁽¹⁶⁾ e que em contrapartida apresentem um elevado grau de divergência de outros flavivírus⁽²⁾.

Os protocolos que têm vindo a ser desenvolvidos que usam primers e sondas específicas para o VZIK têm como principais alvos o gene E, M, prM/E e NS5⁽¹⁶⁾. No entanto, o gene NS5 é o mais escolhido para o *design* dos primers visto ser uma região que apresenta um elevado grau de conservação no VZIK enquanto que por exemplo, os genes correspondentes às proteínas do envelope podem variar dentro do mesmo vírus e poder originar falsos negativos⁽²⁾.

2.2.2. Vantagens da utilização desta técnica no diagnóstico do vírus Zika

Esta técnica representa uma opção apelativa para o diagnóstico da infeção pelo VZIK tendo em conta que é rápida, sensível e um método específico numa fase aguda da infeção⁽¹⁶⁾. É assim uma técnica muito útil para a deteção em regiões onde há a co-circulação de outros arbovírus indistinguíveis do ponto de vista clínico, permitindo um diagnóstico diferencial^(4,16). Um aspeto também bastante importante é o facto de se realizar num tubo fechado, o que reduz o risco de contaminação⁽¹⁶⁾.

Atualmente existe uma técnica, o Triplex RT-PCR, que permite detetar qualitativamente e em simultâneo ARN de três vírus diferentes (Dengue, Chikungunya e Zika),

utilizando como amostras clínicas o soro, líquido cefalorraquidiano, urina ou líquido amniótico⁽¹⁹⁾.

2.2.3. Resultados e precauções na sua interpretação

A execução deste teste de diagnóstico molecular permite-nos a identificação do ARN do vírus, que geralmente é detetável no soro do doente infetado no decorrer da fase aguda da doença, durante aproximadamente 7 dias após o início dos sintomas⁽²⁰⁾.

Resultados positivos deste teste significam que a infeção está presente na sua fase aguda.

Resultados negativos que daqui possam advir não podem excluir imediatamente a possibilidade de infeção. Estes devem ser sempre combinados com observações clínicas, história do doente e informação epidemiológica⁽²⁰⁾. A ocorrência de falsos negativos nesta técnica pode resultar de uma má colheita da amostra, degradação do ARN viral durante a sua extração ou o seu armazenamento, colheita da amostra antes ou depois da fase de virémia, falha no procedimento da técnica, presença de inibidores da RT-PCR ou potenciais mutações nas regiões alvo do genoma viral⁽²⁰⁾.

2.3. Serologia

O diagnóstico serológico do VZIK é também um dos pilares para o diagnóstico desta infeção⁽⁸⁾. Normalmente é efetuado pelo teste de ELISA⁽⁶⁾, onde podem obter-se os títulos de IgM e IgG⁽²⁾, utilizando o *Plaque-Reduction Neutralization Test (PRNT)* como teste de confirmação (seguindo protocolos *standard*)⁽⁶⁾.

O maior desafio deste tipo de diagnóstico prende-se com o facto de doentes que tenham sido previamente expostos a um flavivírus heterólogo, quer por infeção natural quer por meio de vacinação, tenham uma resposta serológica mais vigorosa para a infeção prévia do que para a infeção corrente⁽⁸⁾, levantando questões de reatividade cruzada e portanto problemas a nível de diagnóstico.

2.3.1. IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MAC-ELISA)

O teste MAC-ELISA é utilizado para deteção qualitativa de anticorpos do tipo IgM no soro humano e deve ser utilizado em amostras colhidas de indivíduos que, tal como no caso do RT-PCR, reúnam critérios clínicos e/ou critérios epidemiológicos para o VZIK⁽²⁵⁾.

Os níveis de IgM são variáveis mas geralmente são positivos a partir do 4º dia após o início dos sintomas e permanecem por 12 ou mais semanas⁽²⁵⁾.

2.3.1.1. Fundamento da técnica

Em primeiro lugar é utilizado um anticorpo de captura, Anti-IgM para revestir os poços da microplaca, tendo como objetivo a reação com os anticorpos presentes no soro do doente. Este passo é seguido, sequencialmente, pela adição da amostra, a adição de antígeno viral específico do VZIK (cultivado em células Vero) e por fim um anticorpo anti-viral conjugado com uma enzima, que se vai ligar ao antígeno viral adicionado anteriormente (caso este esteja presente).

O resultado colorimétrico é gerado pela interação da enzima com um substrato cromogénico adicionado à mistura e medido utilizando um aparelho espectrofotométrico.

Para além disto, deve ser incorporado um controlo positivo e um controlo negativo, sendo eles um anticorpo monoclonal específico para o VZIK e uma amostra de soro de um individuo não infetado, respetivamente⁽²⁵⁾. Os resultados são interpretados segundo um algoritmo de deteção (Figura 5).

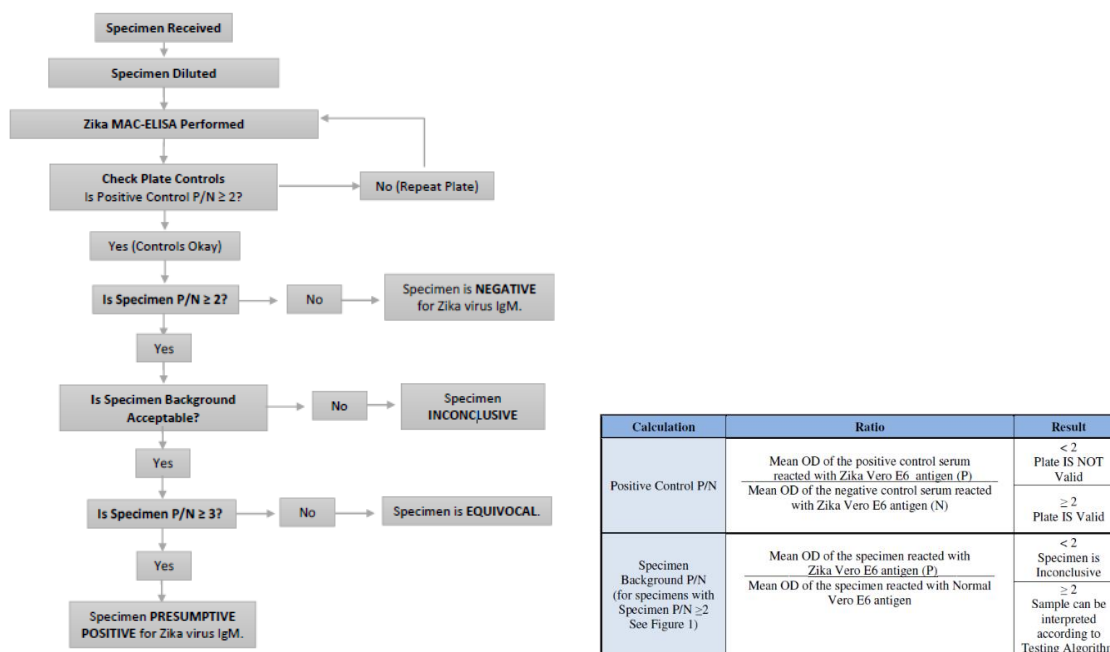


Figura 5 – Algoritmo de interpretação do teste MAC-ELISA⁽²⁵⁾.

2.3.1.2. Limitações da técnica e interpretação dos resultados

A maior limitação desta técnica prende-se com a reatividade cruzada que pode ocorrer entre anticorpos de diferentes flavivírus, sendo que esta ocorrência é mais frequente em

situações em que houve um contacto prévio com outros flavivírus. Os testes serológicos para diagnóstico do VZIK tornam-se então mais difíceis de interpretar em regiões endémicas para outros flavivírus, tendo como exemplo o caso da epidemia na Polinésia Francesa, onde o diagnóstico serológico não foi implementado devido à co-circulação do serotipo 1 e 3 do vírus Dengue, onde mais de 80% da população apresentava anticorpos para este último serotipo⁽⁶⁾.

Falsos positivos podem resultar de um historial de infeção por outros flavivírus⁽²⁵⁾. Posto isto é fundamental que os resultados sejam sempre combinados com observações clínicas, história do doente, informação epidemiológica e outras evidências laboratoriais⁽²⁵⁾ uma vez que, por exemplo, o risco de reatividade cruzada é menor em emigrantes recentes de zonas não endémicas, turistas e crianças, comparativamente a adultos que vivem em zonas endémicas ou epidémicas⁽⁶⁾.

Falsos negativos podem ter como causas a colheita da amostra ter sido feita antes da IgM ter atingido níveis detetáveis (tipicamente cerca de 4 dias após o início dos sintomas) ou pelo contrário já não se apresentar no sangue em níveis que possam ser detetáveis (acontece cerca de 12 semanas após o início dos sintomas)⁽²⁵⁾.

2.3.2. PRNT

O objetivo do PRNT é identificar anticorpos que têm como função neutralizar as partículas virais e assim prevenir que estas infetem células de uma cultura celular, apresentando uma resposta protetora⁽²⁶⁾ perante a infeção pelo vírus.

O que se pretende com a aplicação deste método no diagnóstico do VZIK é confirmar o diagnóstico positivo obtido anteriormente pela técnica de ELISA⁽⁸⁾, uma vez que os resultados aqui obtidos são mais específicos que os obtidos pelo método de ELISA^(1,9).

2.3.2.1. Fundamento da técnica

Numa primeira etapa há uma interação Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac) pela mistura da amostra em análise com uma suspensão viral⁽²⁷⁾, para que assim possa ser avaliada a efetividade que o sangue tem em neutralizar o vírus (pela ação dos anticorpos neutralizantes presentes)⁽²⁸⁾. Para ser avaliada a infetividade viral, o próximo passo é a incubação desta mistura com linhas celulares, células essas que são revestidas por um meio semissólido cuja função é restringir a propagação do vírus. Cada virião que inicia uma infeção celular produz uma área de infeção localizada, denominada placa. É o estudo destas placas virais que vai permitir a obtenção de resultados⁽²⁷⁾.

Paralelamente a esta reação, são introduzidos na técnica controlos positivos e negativos: a inoculação do vírus na ausência da amostra de soro representa o controlo positivo e a utilização de soro de indivíduos não infetados na ausência de suspensão viral o controlo negativo⁽²⁹⁾.

A percentagem de redução da infecciosidade do vírus⁽²⁷⁾ é avaliada comparando a quantidade de placas formadas nos poços que continham a amostra de soro com a quantidade de placas formadas nos poços onde apenas foi incorporado o vírus (controlo positivo). Para as amostras serem consideradas positivas, tem que haver uma redução de pelo menos 50% do número de placas (PRNT50)⁽²⁹⁾.

2.3.2.2. Limitações da técnica

A aplicação deste meio de diagnóstico laboratorial representa um trabalho intensivo e moroso o que faz com que não seja utilizado em ensaios de vigilância⁽²⁷⁾. Para além disso é uma técnica relativamente cara e que requer a sua aplicação em laboratórios especializados devido à manipulação de vírus vivos⁽⁶⁾.

2.4. Detecção do vírus em amostras sanguíneas vs. outras amostras biológicas

Devido ao facto do VZIK ter sido responsável por várias epidemias ao longo destes últimos anos, o desenvolvimento de novas formas de diagnóstico tornou-se cada vez mais importante e necessário, não só ao nível do desenvolvimento de novas técnicas como também ao nível da utilização de outras amostras biológicas alternativas como forma de diagnóstico. Com o estudo da utilização de outras amostras para além do soro dos doentes infetados pretende-se avaliar a possibilidade de uma deteção quando o indivíduo já não está numa fase de virémia ou quando a baixa quantidade de ARN presente⁽⁴⁾ não permite o diagnóstico, para além de que são amostras cuja colheita é feita de forma menos invasiva.

Segundo a determinação das concentrações de ácido nucleico viral pelo método de RT-PCR em 17 amostras de soro positivas para VZIK durante a epidemia no estado Yap, Micronésia em 2007, obtiveram-se resultados que variam entre 930 a 728,800 cópias/ml⁽¹⁵⁾.

2.4.1. Deteção do vírus na saliva

O objetivo da avaliação do diagnóstico do VZIK na saliva foi o facto de durante a epidemia ocorrida de outubro de 2013 a março de 2014 na Polinésia Francesa, terem sido

observados bastantes doentes que apresentavam sintomas que encaixavam com a fase aguda da infeção pelo vírus mas que no entanto apresentavam resultados negativos no teste de RT-PCR. Posto isto foi investigada a utilização de saliva como uma amostra alternativa de deteção e foram desenvolvidos estudos onde foram testados sangue e saliva e analisados os resultados⁽²¹⁾ (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de resultados positivos e negativos obtidos pela técnica de RT-PCR para amostras de saliva e sangue (Adaptado)⁽²¹⁾.

		SALIVA	
		Positivo	Negativo
SANGUE	Positivo	52 (28.6%)	16 (8.8%)
	Negativo	35 (19.2%)	79 (43.4%)

Perante estes resultados, chegou-se à conclusão de que o uso de amostras de saliva aumentou a taxa de deteção molecular do VZIK durante a fase aguda da doença mas não alargou a janela de deteção do ARN^(6,21). Isto porque o vírus foi detetado mais frequentemente na saliva do que no sangue^(4,21) e a nível clínico não foram registadas diferenças significativas quer ao nível do tempo médio de início dos sintomas quer ao nível de ocorrência dos sintomas nos doentes com resultados positivos na saliva e no sangue⁽⁶⁾.

A saliva torna-se assim uma amostra de particular interesse quando é difícil a colheita de sangue, especialmente em crianças e recém-nascidos^(6,21).

Apesar destas conclusões que podem melhorar as alternativas de diagnóstico, há que ter a ressalva de que a deteção do VZIK pode ser negativa utilizando a saliva como amostra e ao mesmo tempo ser positiva para a amostra sanguínea, e como esta última é necessária para outros testes laboratoriais, a saliva não se torna propriamente uma amostra substituta do sangue. Para aumentar a sensibilidade da deteção molecular pode ser feita a colheita destas duas amostras biológicas em simultâneo⁽²¹⁾.

2.4.2. Deteção do vírus na urina

As amostras de urina mostraram resultados fortemente positivos, uma vez que os resultados obtidos no método RT-PCR variaram entre $0.7 - 220 \times 10^6$ cópias/ml⁽²²⁾.

As amostras testadas mostraram ser possível detetar o vírus numa fase mais tardia comparativamente ao sangue (acima do 10º dia após o início dos sintomas). Este aspeto torna amostras de urina muito úteis para diagnosticar o VZIK quando só se procede à recolha da

amostra para análise numa fase mais tardia, o que pode ocorrer quando os sinais e sintomas apresentados pelo doente não são associados de imediato à infeção por este vírus devido ao facto de não serem específicos⁽²²⁾.

2.4.3. Deteção do vírus no sémen

Para avaliar a presença de vírus no sémen, foram feitas duas colheitas (com uma diferença de 3 dias entre cada colheita) de amostras de sémen, urina e sangue, de um doente referenciado para o diagnóstico do VZIK. Este doente apresentou dois períodos com sintomas que podem ser associados a uma infeção pelo VZIK no entanto as amostras só foram colhidas duas semanas após o último período sintomático, pois só aqui é o que o doente procurou tratamento devido a sinais de hematospermia⁽²³⁾.

Procedeu-se então à análise das amostras pela quantificação do ARN: as amostras de sangue revelaram um resultado negativo em ambas as colheitas; para a amostra de sémen os resultados obtidos foram de 2.9×10^7 cópias/ml e 1.1×10^7 cópias/ml na primeira e segunda amostras, respetivamente; relativamente à amostra de urina, só foi feita a sua colheita uma única vez e o resultado obtido foi de 3.8×10^3 cópias/ml^(6,23).

Apesar de estes resultados serem referentes a apenas um doente, mostram que é possível detetar o ARN do VZIK em amostras de sémen e numa fase mais tardia comparativamente ao sangue. Assim sendo, a utilização desta amostra biológica para deteção do vírus e a hipótese da transmissão da infeção por via sexual devem ser alvo de mais investigação⁽²³⁾.

2.4.4. Deteção do vírus no leite materno

Foram efetuados testes em leite materno, nomeadamente cultura viral, através da inoculação de células Vero, e RT-PCR. As amostras deram resultados positivos no teste de RT-PCR, com valores entre $2.9 - 205 \times 10^4$ cópias/ml, mas não houve sinais de replicação na cultura celular⁽²⁴⁾.

O primeiro caso suspeito de transmissão perinatal de VZIK ocorreu em novembro de 2013 na Polinésia Francesa onde o recém-nascido terá apresentado uma erupção maculopapular e a mãe terá reportado a ocorrência de um quadro clínico semelhante ao originado pelo VZIK duas semanas antes. A ausência de replicação nas amostras de leite materno torna a contaminação por esta via um pouco improvável mas em contrapartida a deteção de ARN de VZIK nesta amostra biológica levanta a questão da possível transmissão durante a amamentação pelo que é um aspeto que deve ser alvo de mais estudos⁽²⁴⁾.

3. DESENVOLVIMENTOS RECENTES NAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

A situação epidémica de VZIK que se verificou nas várias regiões da América, levou este agente patogénico até agora “obscuro” para a vanguarda dos cuidados globais de saúde. O facto de haver correlações entre a infeção por este vírus e o desenvolvimento de microcefalia fetal e em recém-nascidos aliado a graves problemas neurológicos, nomeadamente SGB, resultou numa declaração de emergência pela Organização Mundial de Saúde e uma chamada para o desenvolvimento de meios de diagnóstico mais rápidos e passíveis de serem utilizados em campo, uma vez que os métodos já existentes muitas vezes são incompatíveis com aplicação em locais remotos e de baixos recursos, onde são extremamente necessários⁽³⁰⁾.

3.1. ELISA baseado num antigénio recombinante específico e Imunofluorescência Indireta (IFI) – *Arboviral Fever Mosaic 2 test*

A técnica de ELISA com base num antigénio recombinante específico e a técnica IFI baseada num biochip são sistemas desenvolvidos recentemente e representam uma evolução na especificidade do diagnóstico do VZIK. A utilização de um antigénio recombinante específico do VZIK no método de ELISA elimina possíveis problemas de reatividade cruzada entre anticorpos de diferentes flavivírus e a técnica de IFI permite a diferenciação entre diferentes flavivírus, nomeadamente os vírus Zika, Chikungunya e Dengue^(4,31).

Como estes dois testes se baseiam em diagnóstico serológico, proporcionam uma janela de deteção mais longa comparativamente às técnicas que envolvem RT-PCR, tornando-as particularmente úteis para a vigilância da doença. Podem ser utilizados para diagnosticar doentes sintomáticos que se encontram numa fase aguda da infeção e para gerir casos assintomáticos que se enquadram em perfis de risco, particularmente mulheres grávidas⁽³¹⁾.

ELISA

Utiliza microplacas com vários poços onde é adsorvida a proteína recombinante do VZIK, que funciona como antigénio viral. Pelo facto de ser altamente específica para o vírus, a sua utilização elimina o risco de reação cruzada com anticorpos de outros flavivírus⁽³¹⁾. Os kits totalmente automatizados são adequados para triagens rápidas de um grande número de

doentes, tendo assim a capacidade de fornecer uma resposta eficaz perante a rápida propagação do vírus⁽³¹⁾.

IFI – Arboviral Fever Mosaic 2 test

Esta técnica de IFI baseia-se numa tecnologia que recorre a um biochip em forma de mosaico e que permite a incorporação, num mesmo campo de reação, de todos os substratos antigénicos que se pretendem analisar, proporcionando que anticorpos contra vários agentes infecciosos possam ser testados^(31,32) (Figura 6).

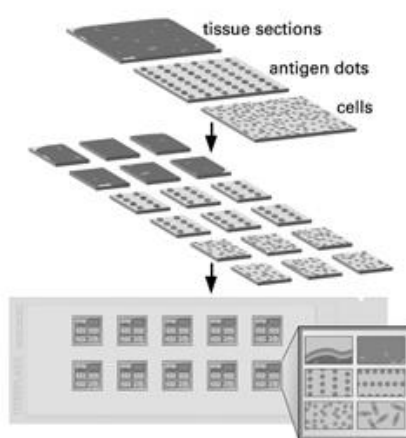


Figura 6 – Tecnologia Biochip e Mosaicos⁽³²⁾.

Esses substratos antigénicos são células infetadas pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue (serotipos 1 a 4) e os resultados (positivos ou negativos) são avaliados por microscopia de fluorescência (tendo em conta o princípio da técnica, há emissão de fluorescência se a amostra de soro do doente possuir anticorpos contra o vírus). Isto permite uma diferenciação entre estes três vírus transmitidos pela mesma espécie de mosquitos⁽³¹⁾(Figura 7).



Figura 7 – Técnica de IFI e respetivo diagnóstico diferencial dos vírus Dengue, Chikungunya e Zika⁽³¹⁾.

Também esta técnica pode conduzir a uma reatividade cruzada entre anticorpos de diferentes flavivírus, uma vez que há proteínas virais comuns aos vírus aqui utilizados⁽³¹⁾.

3.2. Zika detection on filter paper

Um dos métodos de diagnóstico em investigação possibilita um diagnóstico de baixo custo, rápido e específico para o VZIK, cuja ligação de ARN viral amplificado a sensores sintéticos de ARN permite detetar a presença de sequências de VZIK na amostra. Para além disto, quando acoplados a um complexo que envolve o gene *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) e a *CRISPR associated protein 9* (Cas9), os sensores permitem também uma discriminação entre cadeias de vírus que diferem apenas num único nucleótido⁽³⁰⁾ (Figura 8).

Outro aspeto bastante importante é a possibilidade de rastrear amostras de sangue, urina e saliva em campo. Isto deve-se à utilização de sistemas liofilizados e à ausência de qualquer cultura celular, o que proporciona um ambiente na plataforma de diagnóstico que permite a sua utilização fora do laboratório sem preocupações de biossegurança. A liofilização faz também com que os componentes biomoleculares se mantenham estáveis à temperatura ambiente, conduzindo a um fácil armazenamento e distribuição a nível global⁽³⁰⁾.

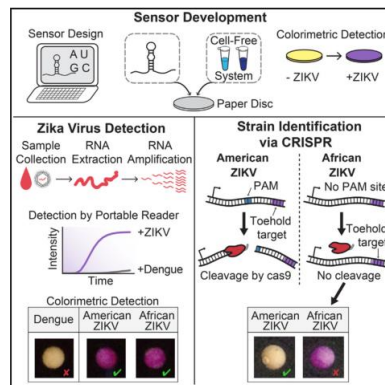


Figura 8 – Representação esquemática da plataforma de diagnóstico que utiliza sensores biomoleculares e tecnologia baseada no gene CRISPR⁽³⁰⁾.

3.2.1. Detecção de sequências específicas do vírus Zika

Os sensores biológicos utilizados são sensores de ARN desenhados de forma a permitir a deteção de sequências específicas de VZIK através de uma reação colorimétrica.

Este sistema envolve a incorporação do gene *LacZ*, e adjacente a ele uma sequência de ARN que vai hibridar com um *trigger* de ARN (sequência específica do VZIK). Antes de o sensor ser ativado, a presença de uma estrutura *hairpin* funciona como repressora do gene, uma vez que está a sequestrar o *Ribosome Binding Site* (RBS) e o codão *start*. A ligação do *trigger* ao sensor vai desencadear uma alteração conformacional no *hairpin*, conduzindo à ativação do

gene e à produção da enzima LacZ. Esta vai desencadear uma reação colorimétrica através da reação com um substrato presente no meio⁽³⁰⁾(Figura 9).

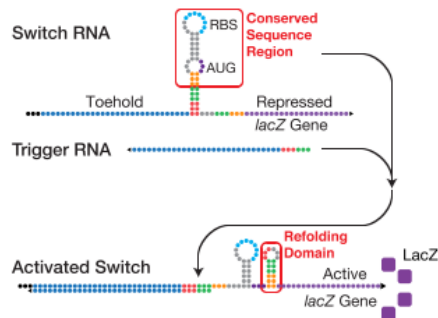


Figura 9 – Representação esquemática do modo de funcionamento dos sensores biomoleculares utilizados na plataforma de diagnóstico⁽³⁰⁾.

O resultado cromogénico pode ser observado a olho nu mas para a obtenção de resultados mais rápidos (o que é útil numa situação epidémica) pode ainda ser desenvolvido um leitor eletrónico para poder quantificar o vírus presente na amostra⁽³⁰⁾.

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método, foi incorporado um passo de amplificação isotérmica do ARN do VZIK antes da reação com o sensor (Figura 10). Os reagentes necessários para esta técnica são compatíveis com o processo de liofilização e podem ser facilmente utilizados em conjunto com o sensor⁽³⁰⁾.

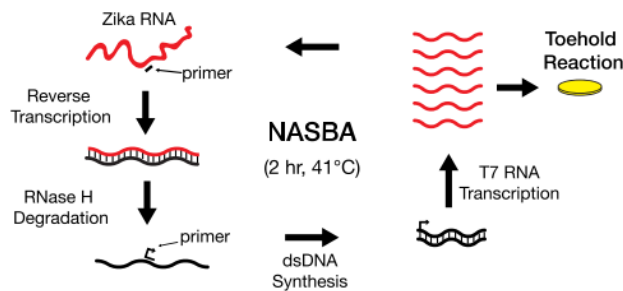


Figura 10 – *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA). Inicialmente é utilizado um reverse primer para sintetizar uma cadeia de ADN complementar à cadeia de ARN do vírus. Após a degradação da cadeia de ARN por uma ribonuclease H, um forward primer contendo o promotor T7 liga-se à cadeia de ADN, formando assim uma dupla cadeia de ADN. Segue-se um processo de transcrição mediado por uma T7 ARN polimerase ADN dependente para formar cadeias de RNA complementares⁽³⁰⁾.

3.2.2. Diferenciação da linhagem do vírus Zika

Para além da deteção de cadeias específicas do VZIK, foi também desenvolvido um sistema que permite diferenciar a linhagem do vírus. A equipa de investigação utilizou um gene essencial no sistema imunitário bacteriano, *CRISPR-cas9*^(30,34), que possibilita a discriminação entre perfis genéticos que diferem em apenas um nucleótido⁽³⁰⁾ (Figura II).

O gene CRISPR é constituído por sequências de nucleótidos repetidas e interespaçadas por sequências variáveis. Estas últimas são adquiridas quando a bactéria entra em contacto com ADN exógeno, de modo a que num posterior contacto haja o seu reconhecimento e a bactéria possa impedir a replicação do agente invasor⁽³³⁾.

A Cas9 funciona como uma endonuclease^(30,34) e pode ser guiada até locais de reconhecimento específicos⁽³⁴⁾, *Protospacer Adjacent Motif* (PAM)^(30,34), quando está complexada a uma pequena cadeia de ARN, cadeia essa que resulta da transcrição do gene CRISPR⁽³³⁾.

Isto pode ser aplicado ao diagnóstico diferencial uma vez que apenas as estruturas que não são clivadas por este sistema e permanecem com o *trigger* de ARN vão ser detetadas pelo sensor anteriormente descrito⁽³⁰⁾.

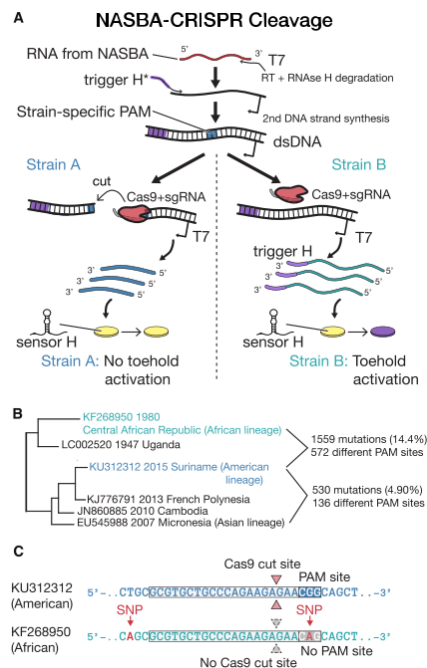


Figura II – Clivagem pelo método NASBA-CRISPR que permite a diferenciação de cadeias com diferença em um único nucleótido.

(A) Representação esquemática da genotipagem após um diagnóstico positivo do VZIK. Um “trigger” de ARN está acoplado à porção de ARN amplificado pelo método NASBA. A presença ou não de um PAM leva à formação de fragmentos de ARN truncados ou completos, que permitem assim o diagnóstico diferencial.

(B) A ocorrência de um *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) nas cadeias de ARN do vírus, leva a que esta diferença genética entre as linhagens, embora relativamente pequena, tenha criado muitos locais PAM específicos de cada estirpe.

(C) Ocorrência de um SNP entre a linhagem Africana (GenBank KF268950) e Americana (GenBank KU312312), leva a que deixe de existir um local PAM na primeira linhagem permitindo a clivagem mediada pela cas-9⁽³⁰⁾.

4. CONCLUSÃO

A infecção pelo VZIK é uma doença que está atualmente envolvida numa grande investigação para poder haver um combate eficaz face às epidemias que se têm registado. O facto de não ter sido registada a ocorrência de graves epidemias no passado, fez com que este vírus não tenha sido alvo de um estudo muito profundo de modo que pudesse haver uma resposta rápida quer a nível de diagnóstico quer a nível de tratamento ou prevenção.

Esta grande expansão do vírus, que se verificou desde 2007, deixa algumas questões em aberto que precisam de ser esclarecidas tais como: possíveis formas de transmissão para além do mosquito; as consequências de complicações mais graves que têm vindo a ser associadas ao vírus; a invasão de mosquitos *Aedes* a regiões geográficas para além de alguns locais Africanos e Asiáticos e consequentes perspectivas de controlo; e haver uma possível vacina, são alguns dos exemplos.

Um dos aspetos que se destaca relativamente à investigação do VZIK é a urgente necessidade de desenvolvimento de novas formas de diagnóstico, rápidas e passíveis de serem utilizadas em campo. As mais utilizadas até então são a deteção de ácido nucleico viral pelo método de RT-PCR e o diagnóstico serológico, tendo este último problemas a nível de reatividade cruzada com outros flavivírus. São realizadas em amostras de doentes referenciados e apenas em laboratórios também referenciados, o que é uma situação que tem que ser contornada em locais onde ocorrem epidemias e o rápido diagnóstico é requerido. Estão assim a surgir novos métodos que terão um papel extremamente importante no possível controlo da doença e na identificação mais precoce de complicações que podem advir da infecção pelo VZIK.

5. REFERÊNCIAS

1. Chan JFW, Choi GKY, Yip CCY, Cheng VCC, Yuen K. **Zika fever and congenital Zika syndrome : An unexpected emerging arboviral disease.** J Infect [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;72(5):507–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.011>
2. Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. **The Zika outbreak of the 21st century.** J Autoimmun [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;68:1–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841116300087>
3. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, et al. **Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control.** Antiviral Res [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;130:69–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354216301206>
4. Wong SS, Poon RW, Wong SC. **Zika virus infection - the next wave after dengue?** J Formos Med Assoc [Internet]. Published by Elsevier Taiwan LLC; 2016;115(4):226–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2016.02.002>
5. Ye Q, Liu Z-Y, Han J-F, Jiang T, Li X-F, Qin C-F. **Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas.** Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;43:43–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156653>
6. Musso D, Gubler DJ. **Zika Virus.** Nature. 2016;11(1):10–20. Available from: <http://cmr.asm.org/content/29/3/487.full.pdf+html>
7. **Flavivirus transmitidos por mosquitos : um risco potencial para Portugal.** Available from: http://www.prize.gulbenkian.pt/images/mediaRep/institucional/FTP_files/pdfs/ambiente09/13-MariaJoaoAlves_07-04-09.pdf [Accessed on June 03th, 2016]
8. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. **Zika Virus.** N Eng J Med [Internet]. 2016;374:1552-63. Available from: <http://www.cdc.gov/zika/index.html>
9. Chen H-L, Tang R-B. **Why Zika virus infection has become a public health concern?** J Chinese Med Assoc [Internet]. the Chinese Medical Association. Published by Elsevier Taiwan LLC; 2016;79(4):174–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1726490116300065>
10. Zanluca C, Duarte dos Santos CN. **Zika virus – an overview.** Microbes Infect [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2016;18(5):295–301. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457916000496>

11. **Serological differential diagnosis in suspected cases of dengue, chikungunya or Zika virus infections (DENV, CHIKV, VZIK).** Available from: https://www.euroimmun.com/fileadmin/zika/pdf/Zika-Serological_differential_diagnosis_ELISA-EUROIMMUN.pdf [Accessed on May 05th, 2016]
12. **Zika: potencial de infecção em saliva e urina.** Available from: <https://agencia.fiocruz.br/fiocruz-detecta-presenca-de-virus-zika-com-potencial-de-infeccao-em-saliva-e-urina> [Accessed on May 28th, 2016]
13. **PCR em tempo real.** Available from: <http://www.bioteecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf> [Accessed on May 28th, 2016]
14. **Real-Time qRT-PCR.** Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/> [Accessed on May 28th, 2016]
15. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2008;14(8):1232–9. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article
16. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. **Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes.** *Virology J* [Internet]. Virology JouARNI; 2013;10(1):311. Available from: <http://www.virologyj.com/content/10/1/311>
17. Kuno G. **Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses.** *J Virol Methods* [Internet]; 1998;72(1):27-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9672130>
18. **TaqMan Gene expression Assay.** Available from: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_085696.pdf?ICID=mp-taqman-gex-0910 [Accessed on June 03th, 2016]
19. **Triplex Real-time RT-PCR Assay - Centers for Disease Control and Prevention.** Available from: <http://www.fda.gov/medicaldevices/safety/emergencysituations/ucm161496.htm> [Accessed on May 10th, 2016]
20. **RealStar Zika Virus RT-PCR Kit U.S. Instructions for use.** Available from: <http://www.fda.gov/medicaldevices/safety/emergencysituations/ucm161496.htm> [Accessed on May 10th, 2016]
21. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. **Detection of**

- Zika virus in saliva.** J Clin Virol [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;68:53–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665321500133X>
22. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. **Detection of zika virus in urine.** Emerg Infect Dis [Internet]. 2015;21(1):84–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530324>
 23. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. **Potential sexual transmission of zika virus.** Emerg Infect Dis [Internet]. 2015;21(2):359–61. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1363_article
 24. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. **Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014.** Eurosurveillance[Internet]. 2014;19(13):8–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24721538>
 25. **Zika MAC-ELISA - Centers for Disease Control and Prevention.** Available from: <http://www.fda.gov/medicaldevices/safety/emergencysituations/ucm161496.htm> [Accessed on May 10th, 2016]
 26. Rainwater-Lovett K, Rodriguez-Barraquer I, Cummings D a T, Lessler J. **Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis.** BMC Infect Dis [Internet]. BMC Infectious Diseases; 2012;12(1):233. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3519720&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. **Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses.** Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69687/1/who_ivb_07.07_eng.pdf [Accessed on May 18th, 2016]
 28. **Quick Guide for Clinicians: How to Interpret Zika Test Results.** Available from: <http://www.health.pa.gov/My%20Health/Diseases%20and%20Conditions/U-Z/Documents/Zika%20test%20interpretation%20for%20clinicians160323.pdf> [Accessed on June 02th, 2016]
 29. **Anticorpos antidengue sorotipo específico em um estudo de base populacional realizado em Recife, PeARNmbuco.** Available from: <http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13608> [Accessed on May 28th, 2016]
 30. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, et al. **Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular**

- Components.** Cell [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;165(5):1255–66. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416305050>
31. **The growing global threat of zika, dengue and chikungunya viruses.** Available from: https://www.euroimmun.com/fileadmin/euroimmun/pdf/news/article/Hi_2668_L_UK_A.pdf [Accessed on May 20th, 2016]
32. **Indirect immunofluorescence: na easy and modern method.** Available from: <https://www.euroimmun.com/produkte/techniken/indirekte-immunfluoreszenz/iift-beschreibung.html> [Accessed on May 20th, 2016]
33. **CRISPR / Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology.** Available from: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology> [Accessed on May 28th, 2016]
34. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. **Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering.** Cell [Internet]. Elsevier; 2014;157(6):1262–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>