

Zika e Chikungunya

Diagnóstico



Carlos Augusto Fernandes

Mestre em Ciências – Medicina Tropical

Ênfase em Diagnóstico, Epidemiologia e Controle - Virologia

Gerente de Controle Epidemiológico – LACEN Noel Nutels

Gerente Estadual do Sistema GAL – CGLAB/SVS/MS



INTRODUÇÃO

Arbovírus

- **1942** → WHO (OMS)
- **Arthropod-borne vírus** → Vírus transmitidos por artrópodes (zoonoses)
- **Vetores** → Mosquitos – DENV, ZIKAV, CHIKV
Carrapatos – Hantavírus
Flebotomíneos – Itaporanga, Icoaraci, Bujaru.
- Transmissão: artrópodes hematófagos → vertebrados
artrópodes → artrópodes
- Maior grupo de vírus conhecidos → 537 membros no mundo
- No Brasil → ≈ 210 arbovírus – 196 na Amazônia (alguns nunca encontrados fora do Brasil) – 34 isolados no país e causadores de doença humana.
- Maioria são vírus RNA segmentados ou não, fita simples ou dupla

INTRODUÇÃO

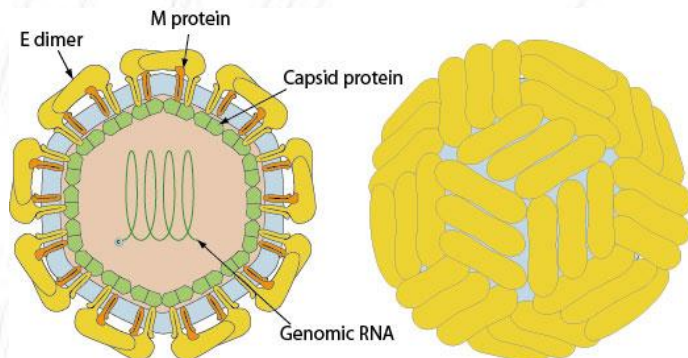
- Classificados por suas propriedades físico-químicas - Ordem > Famílias > Gêneros
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses
- 4 Famílias principais de arbovirus sem ordem específica:
 - *Bunyaviridae* → *Hantavirus*, *Nairovirus*, ***Orthobunyavirus***, ***Phlebovirus***, *Tospovirus*
 - *Flaviviridae* → ***Flavivirus***, *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus*
 - *Togaviridae* → ***Alphavirus***, *Rubivirus*
 - *Reoviridae* → Subfamília ***Sedoreovirinae***, Subfamília *Spinareovirinae* (os arbovírus desta família atacam somente animais. Na subfamília *Sedoreovirinae* encontramos o gênero *Rotavirus*)
- 1 Família da Ordem *Mononegavirales*:
 - *Rhabdoviridae* → *Cytorhabdovirus*, *Ephemerovirus*, *Lyssavirus*, *Novirhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus*, *Perhabdovirus*, *Sigmavirus*, *Sprivirus*, *Tibrovirus*, *Tupavirus*, ***Vesiculovirus***, + 4 vírus não classificados em gênero.
- Outras famílias com alguns arbovírus: *Asfaviridae*, *Iridoviridae*, *Arenaviridae*, *Herpesviridae*, *Coronaviridae*, *Poxviridae*, entre outras.

INTRODUÇÃO

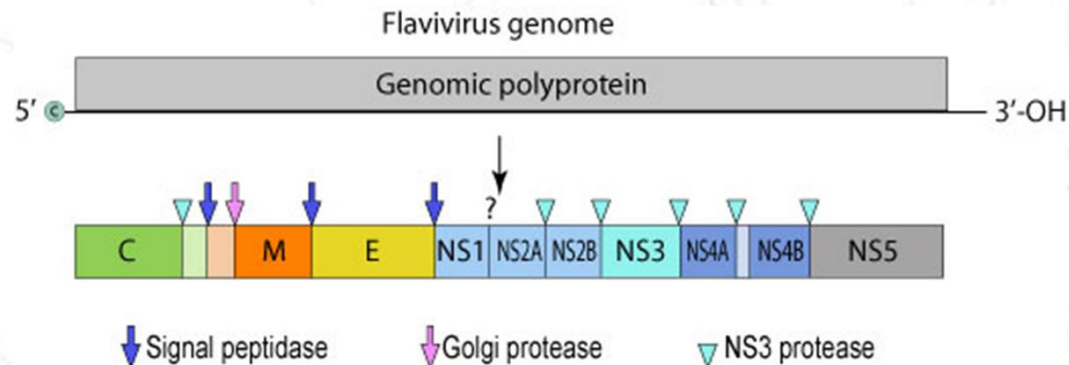
- Mais comuns no **Brasil**:
- Família ***Bunyaviridae***: *Oropouche, Bujaru, Guaroa, Maguari, Tacaiuma, Guama, Caraparu, Catu, Icoaraci, Itaporanga, Bujaru, Belem, Capim, Gamboa, Simbu, Utinga, Xingu, Kairi.*
- Família ***Flaviviridae***: *Dengue, Zika, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental, Ilheus, Rocio, Encefalite Saint Louis, Bussuquara, Cacipacore, Iguape.*
- Família ***Togaviridae***: ***Chikungunya***, *Encefalite Equina Oeste, Encefalite Equina Leste, Mayaro, Aura, Pixuna, Trocara, Una, Triniti.*
- Família ***Reoviridae***: arbovírus que atacam somente animais (a esta família também pertence o gênero Rotavírus, que não é um arbovírus)
- Família ***Rhabdoviridae***: *Cocal, Carajas, Maraba*

ZIKA VÍRUS - Genoma

- 1947 → Floresta Zika, Uganda → macacos Rhesus
- Família *Flaviviridae* – Gênero *Flavivirus*
- Diâmetro de 40 nm – icosaédrico – envelopado
- Envelope → Dímero E e Proteína M
- 10,8 kb – duas regiões não codificantes 5'NCR e 3'NCR.
- RNA fita simples – não segmentado – polaridade positiva
- Tropismo por células neurais

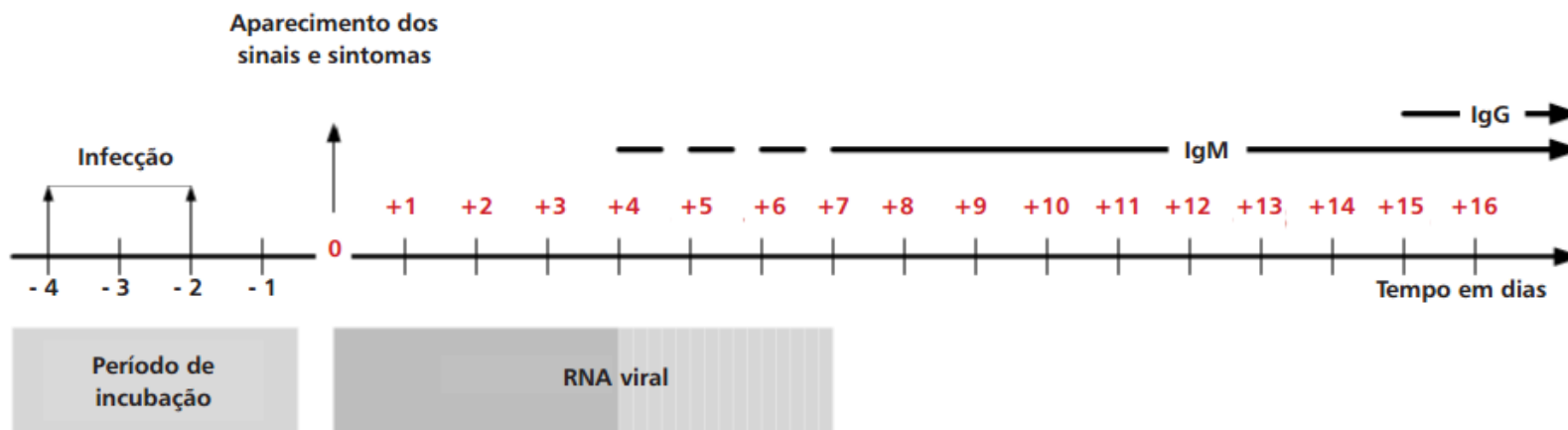


© ViralZone 2011
Swiss Institute of Bioinformatics
T=3-like organization
of surface dimers



ZIKA VÍRUS

Diagnóstico



Fonte: Adaptado de Sullivan Nicolaidis Pathology (2014).

- Detecção direta do vírus por RT-PCR de 4-7 dias do início dos sintomas, melhor até o 5º dia



ZIKA VÍRUS

Diagnóstico

- PCR (Reação em Cadeia da Polimerase);
- Sorologia: Não recomendada pelo Ministério da Saúde – fase de testes – reação cruzada com outros flavivírus principalmente Dengue, mas também Febre Amarela e Febre do Nilo;
- Considerando o exposto acima o quadro da página 33 do Protocolo MS não se aplica, pois está relacionado apenas com a sorologia para Zika;

Fonte: Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia. Versão 1.3, 2016.

ZIKA VÍRUS

Diagnóstico

	GESTANTE SEM RASH COM FILHO MICROCEFÁLICO	GESTANTE COM RASH COM OU SEM FILHO MICROCEFÁLICO	RECÉM-NASCIDO COM MICROCEFALIA
Biologia Molecular (PCR real time)			
PROCEDIMENTO	1 Coleta	1 Coleta	1 Coleta
AMOSTRA	Soro	Soro* e Urina	Sangue* (soro), Cordão Umbilical, Líquor e Placenta
VOLUME	2-3 ml Soro	2-3 ml Soro e 10 ml Urina	3 ml Sangue, Cordão Umbilical e 1 ml Líquor e Placenta
TEMPO	Momento da confirmação da microcefalia do feto	SORO: 0 a 5 dias após início dos sintomas URINA: até 8 dias após início dos sintomas	Momento do nascimento

ABORTO OU NATIMORTO

Coletar 1cm³ de cérebro, fígado, coração, pulmão, rim e baço para realização de RT-PCR e Imuno-histoquímico.

ZIKA VÍRUS

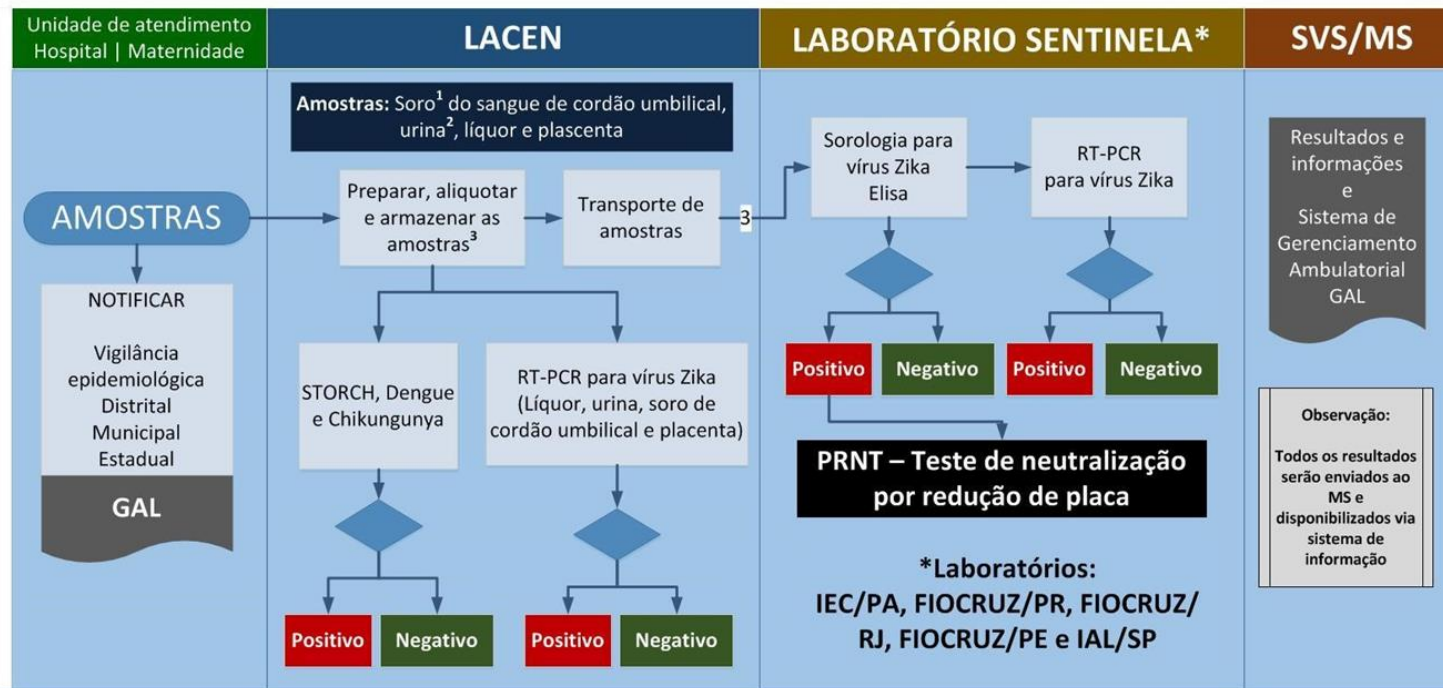
Diagnóstico

- Pacientes com Meningoencefalites e Síndrome de Guillain-Barré (SGB) com suspeita de evolução por Zika pode ser solicitado RT-PCR em amostras de Soro, Urina e Líquor;
- Coletar o sangue, centrifugar e separar o soro para um tubo estéril. Não congelar sangue total (hemólise). As amostras devem ser armazenadas congeladas preferencialmente em freezer a -20°C . Caso não seja possível, armazenar em geladeira de $2-8^{\circ}\text{C}$ por até 3 dias. As amostras devem ser transportadas refrigeradas;
- Todas as amostras devem ser cadastradas no Sistema GAL. As amostras devem ser identificadas com nome e número e vir acompanhadas das requisições e, no caso de gestantes com exantemas, também do formulário FormSus. Colocar as amostras na mesma ordem das fichas para agilizar o atendimento;
- O LACEN não realiza sorologias STORCH de gestantes, mesmo com suspeita de Zika. Estes exames devem ser realizados no pré-natal da Atenção Básica;
- Horário de atendimento do LACEN: Segunda-Sexta de 8h às 18h. Sábados, Domingos e Feriados de 8h às 17h.

ZIKA VÍRUS

Página 34 do Protocolo MS

Algoritmo laboratorial para amostras suspeitas de microcefalia relacionada ao vírus Zika



1. As amostras de soro devem ser submetidas às análises para Dengue, Chikungunya e STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes)
2. As amostras de urina serão coletadas apenas em gestantes para realização de diagnóstico por RT-PCR
3. Lacen que não realizar RT-PCR para vírus Zika, encaminhar ao Laboratório Sentinela de sua área.

Observação: em caso de aborto ou natimorto, coletar 1cm³ de cérebro e fígado e coração e pulmão e rim e baço para realização de RT-PCR e Imuno-histoquímico.

ZIKA

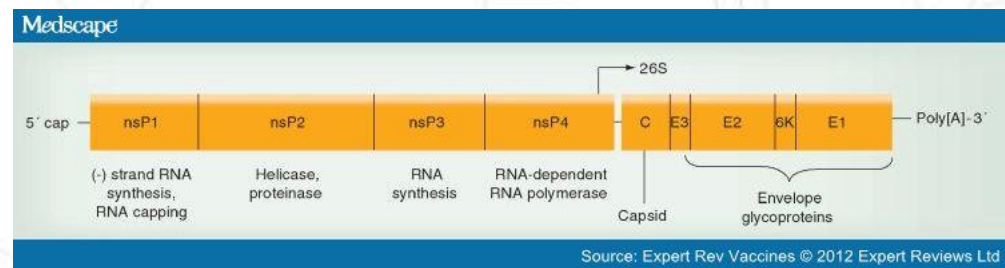
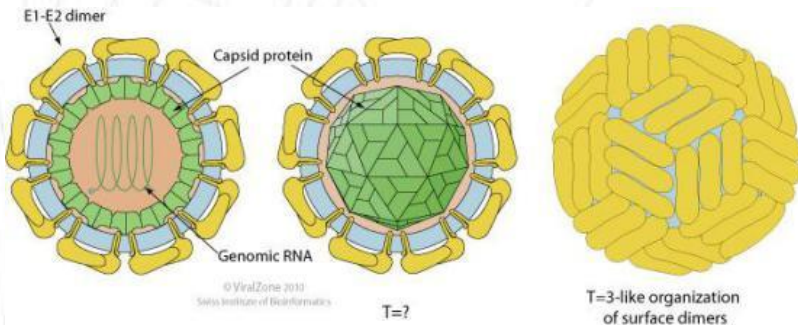
Situação em 15/05/2016

- Amostras cadastradas: 21378
- Amostras liberadas: 7534
 - Soro: 4351 (+ 1053 – 24,2%)
 - Urina: 2845 (+ 434 – 15,2%)
 - Outros materiais: 323 (+ 3 – 0,92%)
- Amostras em análise: 8927
- Amostras aguardando triagem: 3602
- Exames não realizados por não conformidades: 1315
- Amostras enviadas a Fiocruz: 7306
- Amostras liberadas pela Fioruz: 4964
- Amostras em análise: 1846
- Amostras não realizadas: 152
- Amostras liberadas pelo LACEN a partir de março/2016: 2570

Fonte: Sistema GAL

CHIKUNGUNYA - Genoma

- 1952 → Tanzânia, África → “aqueles que se dobram” (em *swahili*)
- Família *Togaviridae* – Gênero *Alphavirus*
- Diâmetro de 70 nm – icosaédrico – envelopado
- Envelope → Glicoproteínas E1 e E2
- 11,8 kb – duas regiões não codificantes 5'NCR e 3'NCR.
- RNA fita simples – não segmentado – polaridade positiva
- Tropismo articular



CHIKUNGUNYA

Diagnóstico

- Sorologia: ELISA IgM e IgG. Os testes comerciais foram retirados de circulação pelo MS por apresentarem reação cruzada com outros alfavírus, principalmente Mayaro. Os testes *"in house"* (MAC/GAG-ELISA) levam 3 dias para executar apenas 14 amostras por placa, motivo pelo qual se torna ineficiente com demanda elevada;
- Detecção direta do vírus por RT-PCR;
- Fase aguda (1ª amostra) → até o 8º dia (melhor até o 5º dia) do início dos sintomas.
- Fase coalescente (2ª amostra) → entre 10 a 14 dias do início dos sintomas. Coletar a 2ª amostra somente em caso de resultados negativos na 1ª amostra, a fim de excluir definitivamente o diagnóstico;

CHIKUNGUNYA

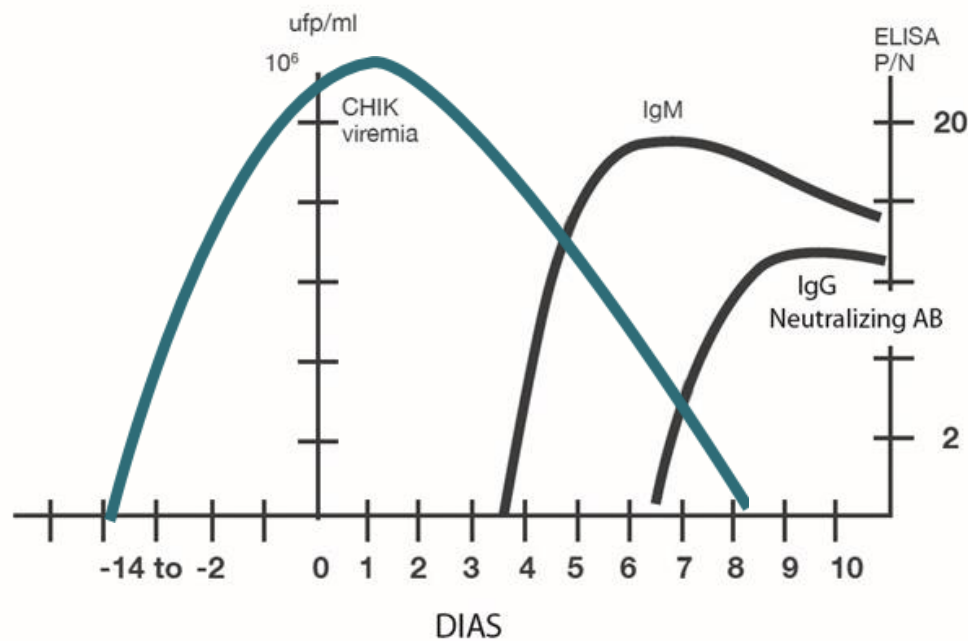
Diagnóstico

- Não se realiza testes para Chikungunya em urina;
- Pacientes com Meningoencefalite e Síndrome de Guillain-Barré (SGB) com suspeita de evolução por Chikungunya pode ser solicitado RT-PCR em amostras de Soro e Líquor;
- Coletar o sangue, centrifugar e separar o soro para um tubo estéril. Não congelar sangue total (hemólise). As amostras devem ser armazenadas congeladas preferencialmente em freezer a -20°C . Caso não seja possível, armazenar em geladeira de $2-8^{\circ}\text{C}$ por até 3 dias. As amostras devem ser transportadas refrigeradas;
- Todas as amostras devem ser cadastradas no Sistema GAL. As amostras devem ser identificadas com nome e número e vir acompanhadas das requisições. Colocar as amostras na mesma ordem das fichas para agilizar o atendimento;
- Outros tipos de amostras para investigação laboratorial: Líquor, em casos de meningoencefalite. Líquido Sinovial, na artrite com derrame. Material “*pos-mortem*” – soro ou tecidos disponíveis.
- Horário de atendimento do LACEN: Segunda-Sexta de 8h às 18h. Sábados, Domingos e Feriados de 8h às 17h.

CHIKUNGUNYA

Diagnóstico

Viremia e resposta imune seguida de infecção
por vírus Chikungunya



Fonte: Centres for Disease Control and Prevention/CDC e Organização Pan-Americana da Saúde.

CHIKUNGUNYA

Diagnóstico

Resultados típicos das amostras testadas em vários intervalos de tempo após infecção

Dias após o início da doença	Teste de vírus	Teste de anticorpos
Dia 1-3	RT-PCR = Positivo Isolamento = Positivo	IgM = Negativo PRNT = Negativo
Dia 4-8	RT-PCR = Positivo Isolamento = Negativo	IgM = Positivo PRNT = Negativo
>Dia 8	RT-PCR = Negativo Isolamento = Negativo	IgM = Positivo PRNT = Positivo

Fonte: Adaptado de Centres for Disease Control and Prevention/CDC e Organização Pan-Americana da Saúde.

CHIKUNGUNYA

Diagnóstico

Vigilância laboratorial de vírus Chikungunya em diversos cenários epidemiológicos

Cenário Epidemiológico	Testes a serem realizados	Amostras para testar
Nenhum sinal de transmissão	IgM ELISA, IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> Todas as amostras de pacientes apresentando doença clinicamente compatível. Protocolo Unidades Sentinelas que utilizam o teste Ns1 para dengue.
Doença CHIKV suspeita	IgM ELISA, IgG ELISA, RT-PCR em tempo real, isolamento de vírus, PRNT	<ul style="list-style-type: none"> Todas as amostras de pacientes apresentando doença clinicamente compatível. Protocolo Unidades Sentinelas que utilizam o teste Ns1 para dengue.
Transmissão continuada	IgM ELISA, IgG ELISA, RT-PCR em tempo real; isolamento de vírus limitada	<ul style="list-style-type: none"> 10% de amostras de casos clássicos de CHIKV. Amostras de todos os casos atípicos e/ou graves. Grupos de risco: maiores de 65 anos, menores de 15 anos, gestantes e pacientes com comorbidades.
Epidemias periódicas (uma vez que CHIKV foi detectado em uma área) ou vigilância ativa em áreas próximas a transmissão de CHIKV	IgM ELISA, IgG ELISA, RT-PCR em tempo real; isolamento limitado de vírus	<ul style="list-style-type: none"> 10% de amostras de casos clássicos de CHIKV. Amostras de todos os casos atípicos e/ou graves. Grupos de risco: maiores de 65 anos, menores de 15 anos, gestantes e pacientes com comorbidades.

Fonte: Adaptado de Centres for Disease Control and Prevention/CDC e Organização Pan-Americana da Saúde.

CHIKUNGUNYA

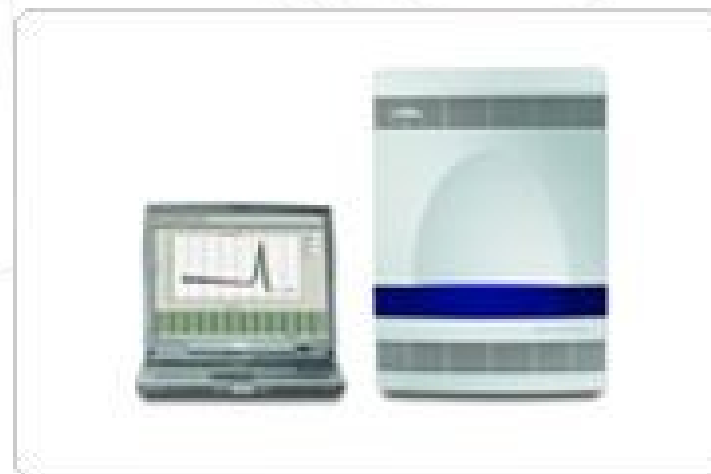
Situação em 15/05/2016

- Todas as amostras vão para o LABFLA/Fiocruz/RJ
- Amostras cadastradas: 7554
- Amostras liberadas: 1434
 - Soro: 1416 (+ 587 – 41,4%)
 - Urina: 1 (+ 0 – 0%)
 - Outros materiais: 17 (+ 3 – 17,6%)
- Amostras em análise: 5598
- Amostras aguardando triagem: 20
- Exames não realizados por não conformidades: 502

Fonte: Sistema GAL

DIFICULDADES NO PROCESSAMENTO

- Apenas um equipamento de detecção para RT-PCR em Tempo Real: Applied Biosystems ® 7500 Real-Time PCR Systems
- Infraestrutura precária: ar condicionado, freezers, geladeiras
- Extração manual: 24 amostras em 3 horas



DIFICULDADES NO PROCESSAMENTO

- Apenas um equipamento de detecção para RT-PCR em Tempo Real: Applied Biosystems ® 7500 Real-Time PCR Systems
- Infraestrutura precária: ar condicionado, freezers, geladeiras, impressoras, digitadores
- Extração manual: 24 amostras em 3 horas
- Grande quantidade de amostras diariamente, algumas com problemas de cadastro e identificação (hoje somente Zika ≈ 80 amostras/dia)



PROPOSTAS DE MELHORIAS

- Criação, por sugestão da SVS/SES de uma rede de laboratórios colaboradores em Biologia Molecular, principalmente para realização de RT-PCR de Zika:
 - a) Hospital Universitário Gaffrée e Guinle – Unirio;
 - b) Hemorio;
 - c) Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Investimentos na infraestrutura do LACEN Noel Nutels.
- Abertura do software do equipamento RT-PCR da Abbott Molecular m2000rt de Biologia Molecular das Hepatites para detecção de Zika, Dengue, Influenza, Meningite e Chikungunya a partir de proposta da SVS/SES/RJ ao Min. da Saúde. O LACEN/RJ será piloto no país → já realizada, porém se encontra em fase de testes.



REFERÊNCIAS

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>. Acesso em 15/05/2016.
- <http://www.microbiologyinfo.com/zika-virus-structure-genome-symptoms-transmission-pathogenesis-diagnosis/>. Acesso em 15/05/2016.
- <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/perguntas-e-respostas-zika>. Acesso em 15/05/2016.
- <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em 15/05/2016.
- <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/links-de-interesse/1073-chikungunya/14716-o-que-e-a-febre-chikungunya>. Acesso em 15/05/2016.
- <https://netnature.wordpress.com/2016/03/10/xxx-aedes-aegypti-e-a-epidemiologia-do-chikungunya/>. Acesso em 15/05/2016.
- <http://combateaedes.saude.gov.br/index.php/tira-duvidas#chikungunya>. Acesso em 15/05/2016.
- Casseb AR. et al. Abovírus: Importante zoonose na Amazônia Brasileira. Vet. e Zootec. 2013 set.; 20(3)
- *Biológico*, São Paulo, v.70, n.2, p.45-46, jul./dez., 2008
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2014. — Acesso em 15/05/2016: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/preparacao_resposta_virus_chikungunya_brasil.pdf
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia. Versão 1.3, 2016. Acesso em 15/05/2016: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/22/microcefalia-protocolo-de-vigilancia-e-resposta-v1-3-22jan2016.pdf>
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de chikungunya: manejo clínico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. 2015. Acesso em 15/05/2016: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/febre_chikungunya_manejo_clinico.pdf



CONTATOS

Subsecretário de Vigilância em Saúde / Diretor Geral:

Dr. Alexandre Chieppe

E-mail: dgnnutels@saude.rj.gov.br / noelnutels@gmail.com

Tel: 2332-8597 / 2332-8606

Diretora Técnica:

Maracy Marques

E-mail: dtnnutels@saude.rj.gov.br / maracy.pereira@saude.rj.gov.br

Tel: 2332-8597 / 2332-8606

Diretor Administrativo: André Miranda

Gerências operacionais:

Gerente de Controle Epidemiológico:

Dr. Carlos Augusto Fernandes

E-mail: gcennutels@saude.rj.gov.br / gce.lacen@gmail.com

Tel: 2332-8598 / 2332-8603 ramal 216 ou 238

Gerente de Controle Sanitário e Ambiental: Maria Pureza Duarte

Gerente de Pesquisas em Antropozoonoses: José Luiz