



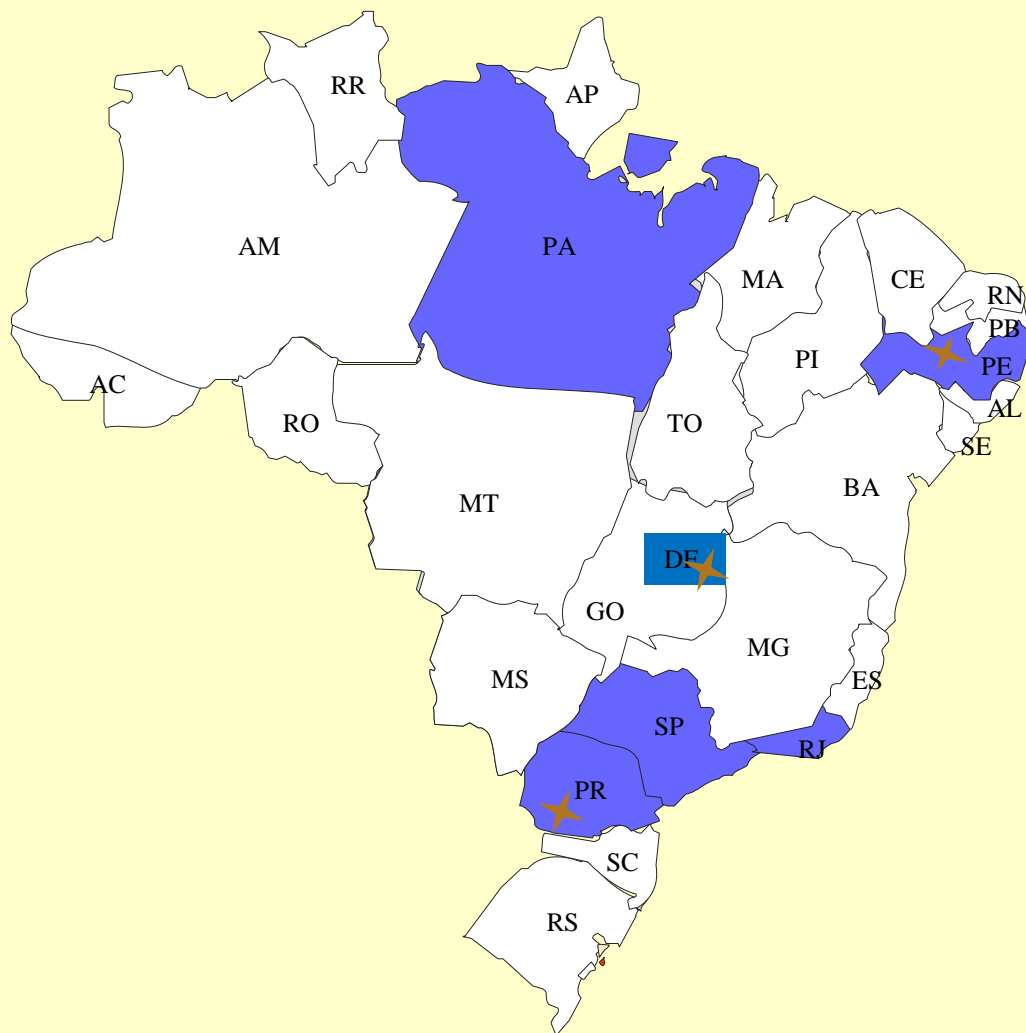
Zika

I SIMPÓSIO DE EMERGÊNCIAS EM SAÚDE PÚBLICA
NO ESTADO DE SÃO PAULO, 06 de Julho, 2016

ZIKA: O DESAFIO DO LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA

**Ana Maria Bispo de Filippis
Laboratório de Flavírus – Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz**

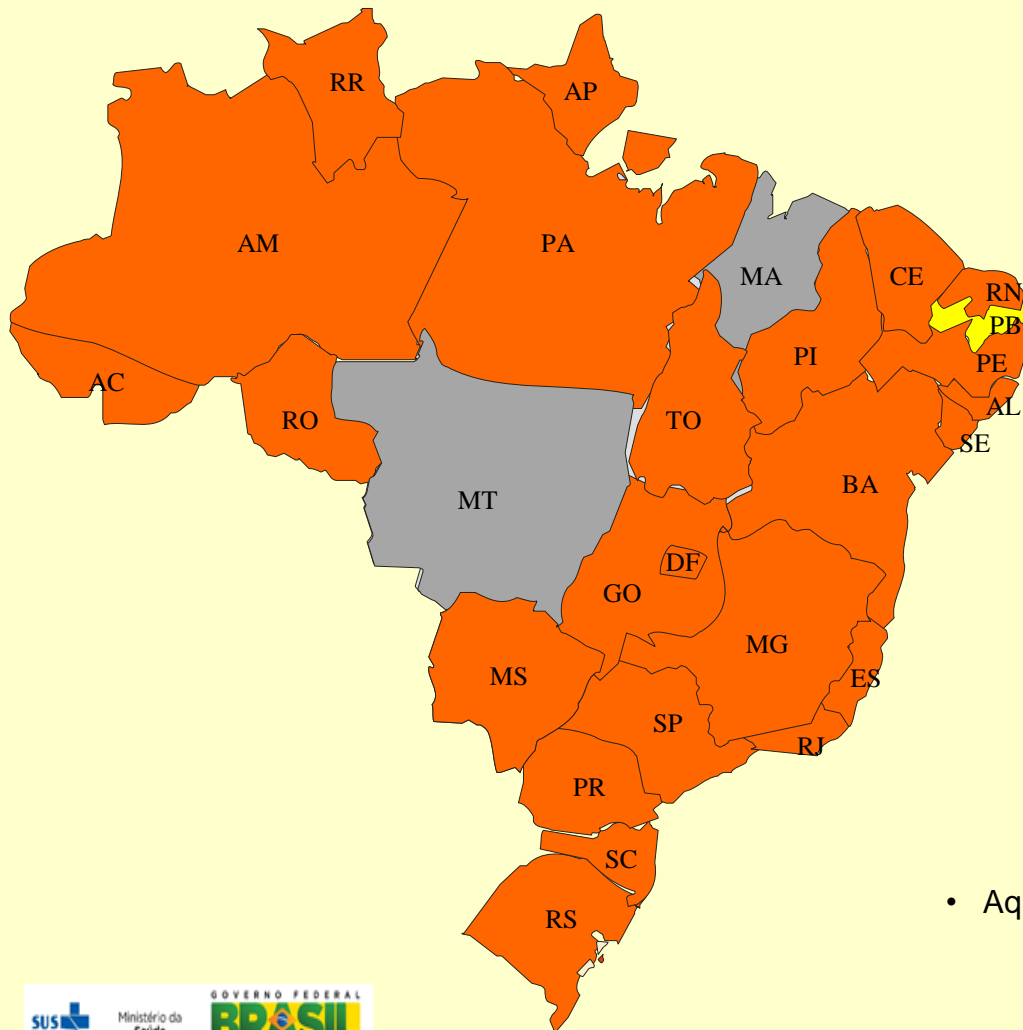
ZIKA: ESTRUTURA LABORATORIAL



Laboratórios Sentinela

- Instituto Evandro Chagas (IEC-PA)
- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - PE)
- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - PR)
- Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - RJ)
- Instituto Adolph Lutz (IAL-SP)
- ★ Lacen PE
- ★ Lacen DF
- ★ Lacen PR

LABORATÓRIOS CENTRAIS CAPACITADOS EM RT-PCR EM TEMPO REAL



23 LACENs

- | | |
|-------------|------------|
| ■ LACEN-AC | ■ LACEN-PA |
| ■ LACEN-AL | ■ LACEN-PR |
| ■ LACEN-AP | ■ LACEN-PE |
| ■ LACEN-AM | ■ LACEN-PI |
| ■ LACEN-BA | ■ LACEN-RJ |
| ■ LACEN-CE | ■ LACEN-RN |
| ■ LACEN-DF | ■ LACEN-RR |
| ■ LACEN-ES | ■ LACEN-RO |
| ■ LACEN- GO | ■ LACEN-SE |
| ■ LACEN-MS | ■ LACEN-SP |
| ■ LACEN-MG | ■ LACEN-TO |
| | ■ LACEN-RS |

OBS:

- 1) LACEN MT e MA: S/ equipamentos.
- 2) LACEN PB: Aguardando capacitação.

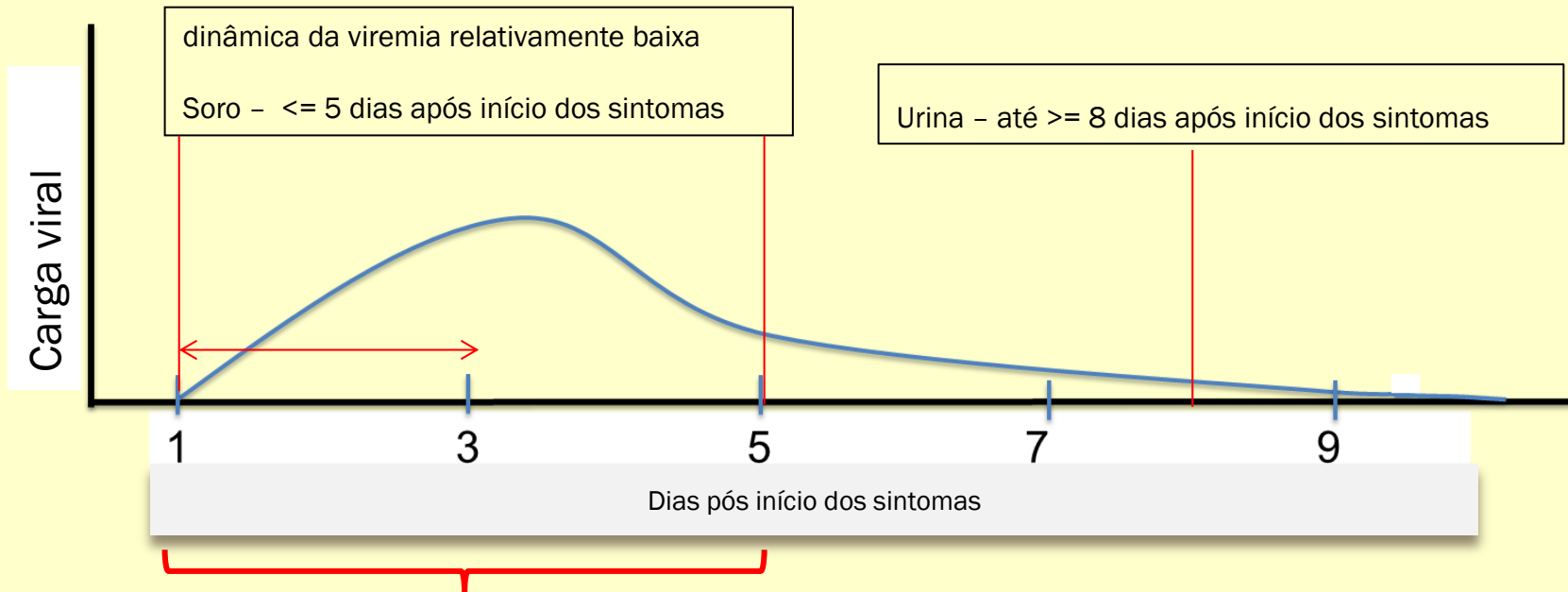
AÇÕES EM ANDAMENTO:

- Aquisição de equipamentos para estruturação da rede:
 - 02 termocicladores para os Lacen MT e MA;
 - 32 extratores automatizados de ácido nucleico (para 27 Lacen e 05 Laboratórios de Referência).

ZIKA: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Evidência Laboratorial de infecção pelo vírus Zika

✓ Primariamente pela detecção do RNA viral em soro e/ou urina



Nível de contenção: BSL2

Atenção: recomenda-se evitar que profissionais gestantes trabalhem diretamente ou em ambiente onde amostras de casos suspeitos de Zika são processadas

ZIKA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Desafio 1: Método *in house*

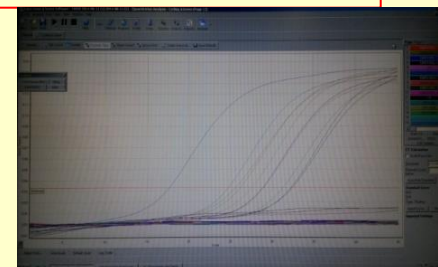
rRT-PCR protocolo “in house”

Todos os reagentes e kits de extração fornecidos pela CGLAB/MS

Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007

Robert S. Lanciotti,* Olga L. Kosoy,* Janeen J. Laven,* Jason O. Velez,* Amy J. Lambert,* Alison J. Johnson,* Stephanie M. Stanfield,* and Mark R. Duffy*

Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 8, August 2008



Primer	Genome position†	Sequence (5' → 3')	Sensitivity, no. copies	Specificity‡
ZIKV 835	835–857	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC		
ZIKV 911c	911–890	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	100	ZIKV
ZIKV 860-FAM	860–886	CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG		
ZIKV 1086	1086–1102	CCGCTGCCCAACACAAG		
ZIKV 1162c	1162–1139	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	25	ZIKV
ZIKV 1107-FAM	1107–1137	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA		

Detecta todos os genótipos de ZIKV

Zika4481
Zika4507cFAM
Zika4552c

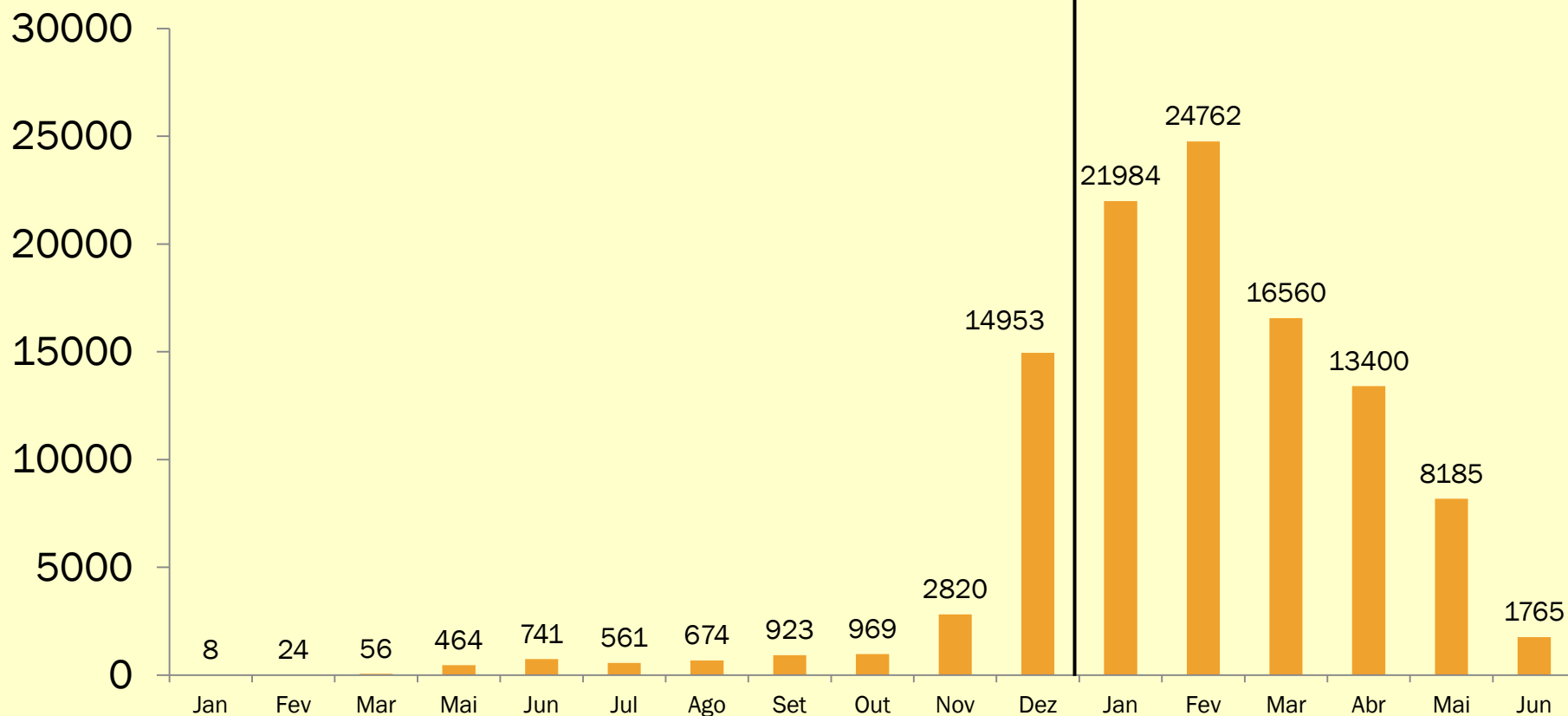
CTGTGGCATGAACCCAATAG
CCACGCTCCAGCTGCAAAGG
ATCCCATAGAGCACCCTCC

Detecta somente o genótipo Asiático circulante na Região (desenhado por Lanciotti, não publicado)

Solicitações de exames para vírus Zika mensal, 2015/2016



Desafio 2: Quantitativo de amostras

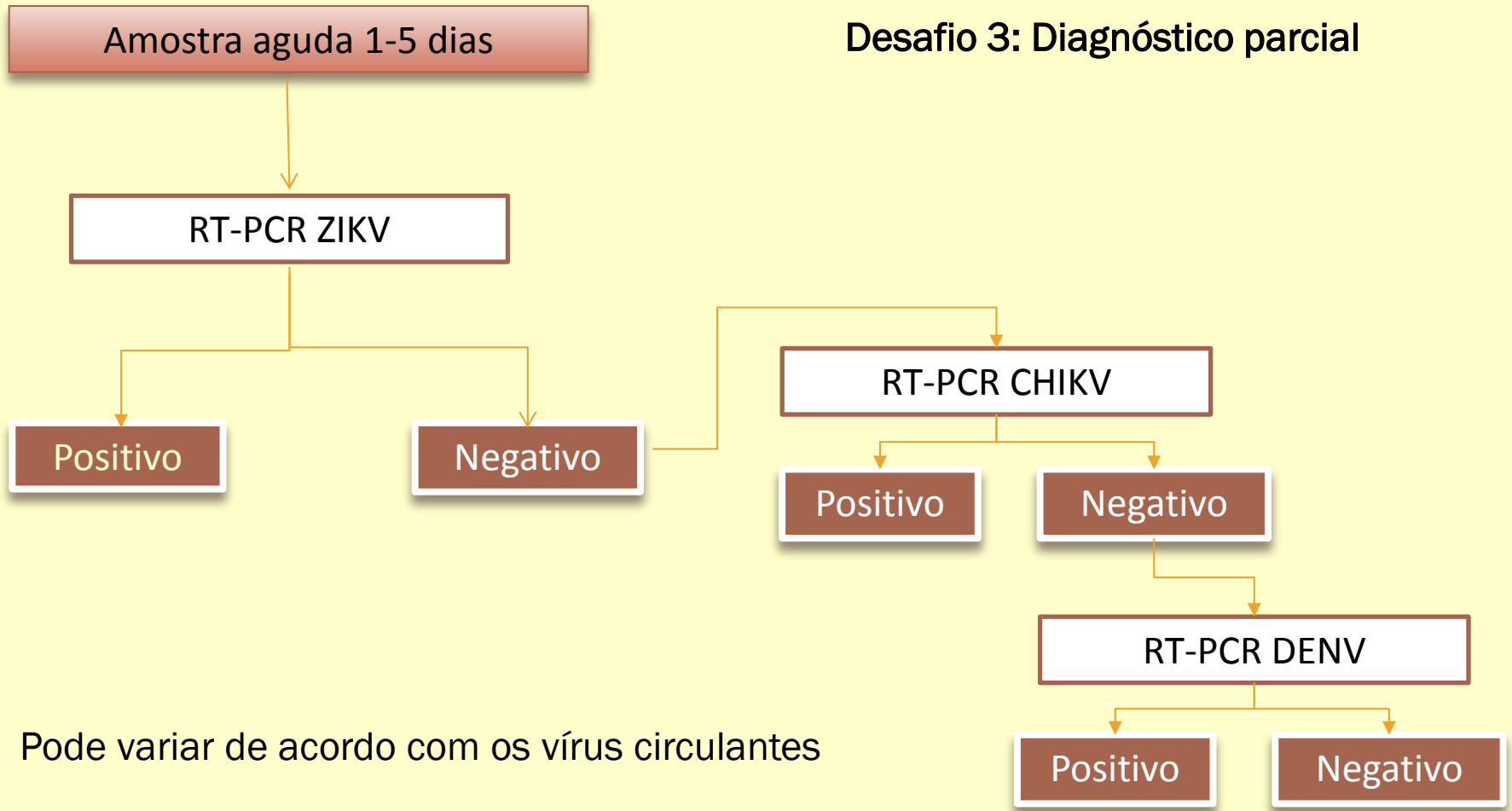


Falta de informações nas fichas: gestante? caso grave com comprometimento neurológico?

DETECÇÃO E ISOLAMENTO DE ZIKV EM AMOSTRAS ALTERNATIVAS

Espécime	# período de detecção após início dos sintomas	Result ado rRT-PCR (Cts)	Isolamento
Urina	0 a 34 d	+(Cts 22-38,8)	+
Saliva	4 a 9 d	+ (Cts 26-38)	+
Fluido Amniótico	20 semanas	+ (Cts 22-38)	+
Leite materno	3 a 20 d	+ (Cts 21,6-29)	-
Sêmen	4 a 20 d	+ (Cts 22-32,2)	+
Secreção Vaginal	3 e 6 d	+ (Cts 27-38)	-
LCR	4 a 9 d	+ (Cts 27-36)	-
Placenta	-----	+ (Cts 32-37)	+

ZIKA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR



ZIKA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Solução a caminho...

TESTE NACIONAL

- Está em fase de desenvolvimento por Bio-Manguinhos um **teste molecular multiplex** para detecção dos três agentes (**dengue, chikungunya e zika**)
- **Chamado de Kit Molecular Triplex:** Dengue, Zika e Chikungunya, que permitirá a identificação simultânea do material genético dos três vírus

AJUSTES e ETAPA FINAL:

- Na última fase de desenvolvimento do teste a CGLAB relatou a inviabilidade da temperatura de armazenagem ser a -80°C . Dessa forma, Bio-Manguinhos fez adequação na temperatura de armazenagem para -20°C e o **lote de consistência** já está em produção.
- O IEC/PA já validou o teste e Bio-Manguinhos preparou o **dossiê de registro** para ser encaminhado à **Anvisa**

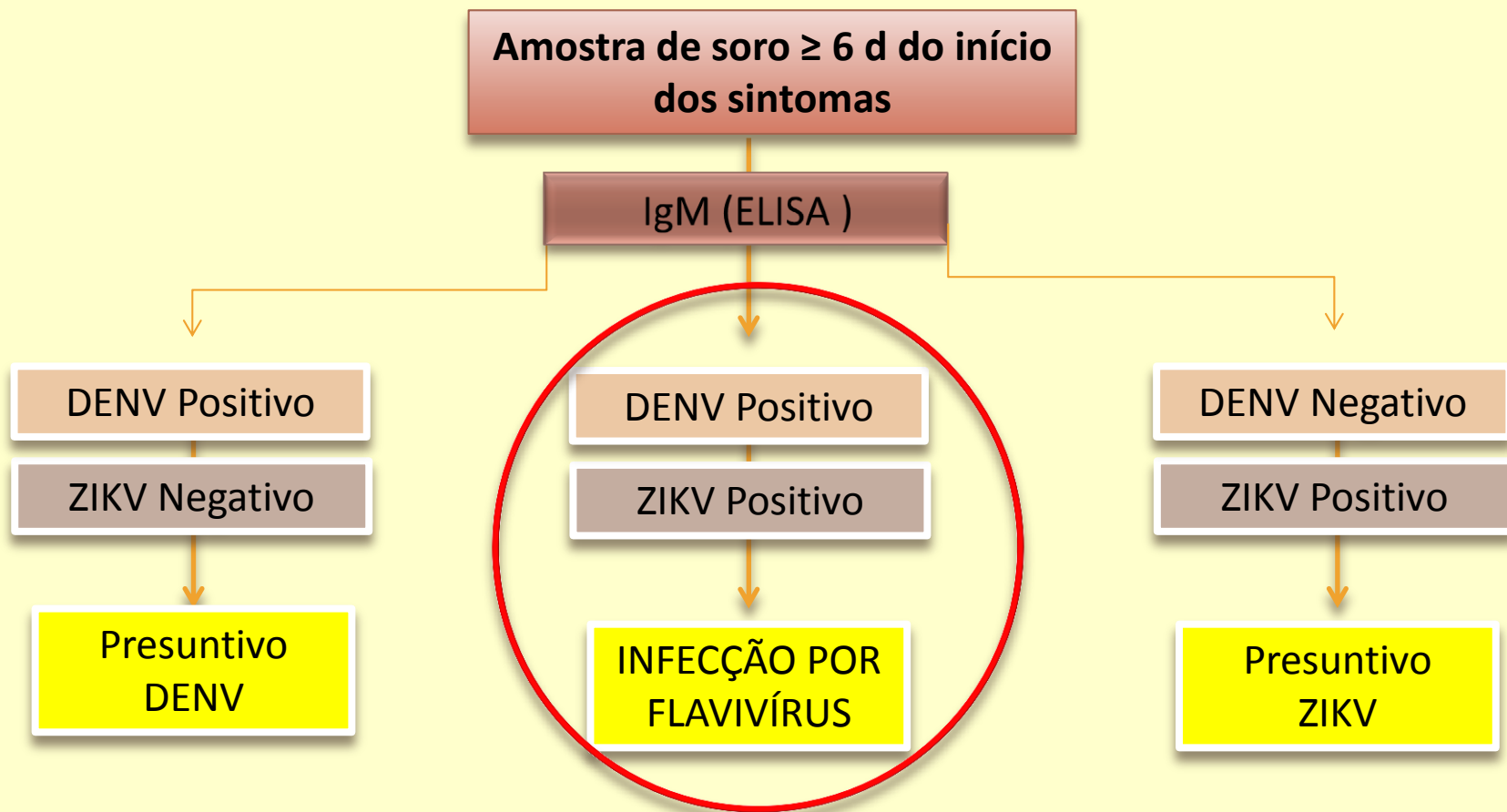
ZIKA: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Desafio 4:

- ✓ Inexistência de kits comerciais validados para detecção de IgM, IgG e NS1
- ✓ Insumos para ELISA “*in house*” insuficientes e pouco específicos (antígenos produzidos em culturas de célula ou cérebro de camindongo)
- ✓ Extensa reação cruzada com outros flavivírus (DENV e FA)
- ✓ Possibilidade de reação cruzada também no PRNT

Em países com co-circulação de DENV e ZIKV, os resultados de sorologia para ambos devem ser interpretados com cuidado devido o risco de reação cruzada!

ZIKA: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO



Importante coletar amostras pareadas, mas existe a possibilidade de não resolver o impasse

REAÇÕES CRUZADAS ZIKV X OUTROS FLAVIVÍRUS

Estudo soropidemiológico (por PRNT) conduzido na Nigéria entre 1971-1975 durante surtos de ZIKV demonstrou que:

- ✓ 50% dos indivíduos apresentaram resposta monotípica para ZIKV;
- ✓ 40% foram ZIKV positivo e responderam para mais outros dois flavivírus;
- ✓ 10% foram ZIKV positivo e mais outros três flavivírus

REAÇÕES CRUZADAS ZIKV X OUTROS FLAVIVÍRUS

Infecção primária por flavivírus

Table 1. IgG and IgM testing with heterologous flaviviruses of patients infected with ZIKV, Yap State, Micronesia, 2007*

Patient	Days after onset	IgG		IgM				
		ZIKV	ZIKV	DENV	YFV	JEV	MVEV	WNV
Primary flavivirus ZIKV								
822a	5	1.5	23.2	1.3	1.4	1.7	1.1	–
822b	10	1.2	39.5	1.2	1.0	2.4	1.2	–
822c	24	3.3	13.1	2.7	0.63	1.8	1.3	–
830a	2	1.1	1.3	4.4	0.48	4.4	2.9	–
830b	21	1.8	16.3	1.9	0.63	1.3	1.6	–
849a	3	1.5	4.5	0.92	0.95	1.2	0.66	–
849b	18	3.0	18.2	2.2	1.0	2.7	1.5	–
862a	6	1.9	25.4	1.7	1.1	1.8	1.0	–
862b	20	2.6	15.4	2	1.1	2.3	1.1	Eq

Table 2. Neutralization testing with heterologous flaviviruses of patients infected with ZIKV, Yap State, Micronesia, 2007*

Patient	Days after onset	PRNT ₉₀ titer									
		ZIKV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	JEV	YFV	WNV	SLEV	MVEV
Primary flavivirus ZIKV											
822a	5	320	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
822b	10	2,560	10	10	10	10	<10	<10	<10	<10	<10
822c	24	5,120	10	10	10	10	<10	<10	<10	<10	<10
830a	2	<10	<10	NT‡	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
830b	21	2,560	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
849a	3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
849b	18	10,240	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10
862a	6	320	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
862b	20	2,560	10	10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10

REAÇÕES CRUZADAS ZIKV X OUTROS FLAVIVÍRUS

Infecção secundária por flavivírus

Table 1. IgG and IgM testing with heterologous flaviviruses of patients infected with ZIKV, Yap State, Micronesia, 2007*

Patient	Days after onset	IgG		IgM				
		ZIKV	ZIKV	DENV	YFV	JEV	MVEV	WNV
Secondary flavivirus ZIKV (probable)								
817a	1	5.9	1.4	1.7	0.8	1.7	0.7	–
817b	19	5.7	8.1	5.1	2.1	1.7	1.0	–
833a	1	3.4	1.7	3.7	1.0	2.8	1.3	–
833b	19	8.2	3.1	2.3	0.9	2.5	1.3	–
844a	2	3.8	3.8	6.8	2.0	21.5	0.7	–
844b	16	8.5	12.7	14.9	7.0	42.9	1.6	–
955a	1	5.0	1.8	3.7	1.0	3.4	2.4	Eq
955b	14	26.6	10.9	3.4	0.8	1.7	4.0	Eq
968a	1	4.0	1.7	1.3	0.6	1.2	1.2	–
968b	3	12.3	20.4	2.9	0.8	0.9	2.0	–
839a	3	1	0.92	3.4	0.7	2.7	2.1	–
839b	20	4.9	17.2	2.2	2.1	1.9	1.8	–
847a	5	0.9	0.94	4.1	4.1	2.3	1.3	–
847b	8	14.1	21.5	1.4	3.3	1.1	2.6	–

Table 2. Neutralization testing with heterologous flaviviruses of patients infected with ZIKV, Yap State, Micronesia, 2007*

Patient	Days after onset	PRNT ₉₀ titer									
		ZIKV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	JEV	YFV	WNV	SLEV	MVEV
Secondary flavivirus ZIKV (probable)											
817a	1	80	80	160	320	160	<10	<10	<10	40	40
817b	19	10,240	2,560	20,480	5,120	5,120	20	320	160	1,280	640
833a	1	160	320	80	40	20	<10	<10	<10	<10	<10
833b	19	81,920	20,480	5,120	5,120	1,280	<10	<10	80	320	320
844a	2	20	1,280	640	320	160	<10	<10	5	20	20
844b	16	10,240	40,980	10,240	5,120	1,280	5	<10	160	640	640
955a	1	40	1,280	640	160	320	<10	<10	<10	20	20
955b	14	163,840	81,920	20,480	10,240	5,120	10	<10	640	2,560	1,280
968a	1	80	320	320	80	40	<10	<10	<10	40	20
968b	3	10,240	640	640	160	160	<10	<10	10	40	20
839a	3	<10	<10	10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10
839b	20	10,240	40	320	80	80	<10	640	40	80	80
847a	5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	640	<10	<10	<10
847b	8	2,560	40	320	160	40	<10	1,280	80	320	320

ZIKA: DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Solução em curso....

AÇÕES CGLAB:

➤ Aquisição de teste rápido (sorologia IgM e IgG)

- Aguardando resultado da validação dos testes de Bio-Manguinhos e da BahiaFarma pelo INCQS.

➤ Aquisição de ELISA (sorologia IgM e IgG)

- Aguardando resultado da validação dos testes da Euroimmun pelo INCQS.

- O TR para aquisição está em fase de elaboração.

PRODUTOS REGISTRADOS ANVISA

Registrados mas não validados

Ministério da Saúde

Agência Nacional de Vigilância Sanitária
www.anvisa.gov.br

Institucional Anvisa Divulga Serviços Áreas de Atuação Legislação Espaço Cidadão Profissional de Saúde Setor Regulado

Resultados 1 - 7 de 7 produtos encontrados

[Próxima](#)

NOVA CONSULTA

Produto	Registro	Situação
Empresa : QUIBASA QUÍMICA BÁSICA LTDA CNPJ : 19.400.787/0001-07 Bio Gene Zika Vírus PCR	10269360300	Publicado deferimento
Empresa : ARGOSLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA CNPJ : 09.377.976/0001-52 Tell Me Fast Zika Virus IqG/IqM Antibody Test	80464810490	Publicado deferimento
Empresa : MOBIUS LIFE SCIENCE INDÚSTRIA E COMERCIO DE PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA CNPJ : 04.645.160/0001-49 KIT XGEN MASTER ZV – Kit MASTER para Detecção do Vírus Zika	80502070033	Publicado deferimento
Empresa : ORANGELIFE COMÉRCIO E INDÚSTRIA LTDA CNPJ : 09.449.181/0001-02 OL Zika IqG/IqM	80535240048	Publicado deferimento
Empresa : EUROIMMUN Brasil Importação e Distribuição Ltda CNPJ : 93.741.726/0002-47 Zika virus IqG	81148560018	Publicado deferimento
Zika virus IqM	81148560019	Publicado deferimento
Empresa : FUNDAÇÃO BAIANA DE PESQ. CIENTIFICA E DESENV. TECNOLOGICO, FORNECIMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE MEDICAMENTOS-BAHIAFARMA CNPJ : 13.078.518/0001-90 Teste Rápido Zika IqG / IqM Combo Bahiafarma	81285200001	Publicado deferimento

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Setor de Indústria e Abastecimento (SIA) – Trecho 5 – Área Especial 57 - Brasília (DF) - CEP 71205-050 - Tel: (61) 3462-6000 - Disque Saúde: 0 800 61 1997

Copyright © 2003 Anvisa

Sorologia: 2 ELISA e 3 Imunocromatografia (TR)

Molecular: 2 RT-PCR

PRINCIPAIS DESAFIOS

- Teste sorológicos validados para diagnóstico, específicos, sensíveis, baixo custo e disponível no mercado nacional;
- Teste molecular multiplex sensível validado capaz de discriminar DENV, CHIKV e ZIKV;
- NS1 para ZIKV
- Amostras de soros pareados;
- Recursos humanos;
- Falta de informações nas fichas de acompanhamento de amostras como: início de sintomas, data coleta, idade, idade gestacional, sinais e sintomas;
- Quantitativo de amostras que chegam aos laboratórios em períodos epidêmicos. Existe a necessidade de coletar amostras de TODOS os casos suspeitos? A que custo? Que critérios deverão ser adotados?

DESAFIO FUTURO

BVDV = MICROCEFALIA e ARTROGRIPOSE??

BVDV + ZIKV = MICROCEFALIA e ARTROGRIPOSE??

ZIKV= MICROCEFALIA

OBRIGADA!!!