

# Testes de laboratório para a infecção pelo vírus Zika

## Orientações provisórias

23 de Março de 2016

WHO/ZIKV/LAB/16.1



## 1. Introdução

### 1.1 Antecedentes

O recente aumento dos casos de microcefalia e outras patologias neurológicas potencialmente associadas à infecção pelo vírus Zika provocou um aumento da procura de testes laboratoriais para detectar a infecção. Os grupos prioritários para os testes de diagnóstico devem ser indivíduos sintomáticos e mulheres grávidas assintomáticas com possível exposição ao vírus Zika. O presente documento fornece orientações sobre as actuais estratégias de testes da infecção pelo vírus Zika. Este documento será revisto e actualizado à medida que surgirem novas informações.

### 1.2 Público-alvo

Estas orientações provisórias destinam-se a ser usadas pelo pessoal dos laboratórios que façam testes da infecção pelo vírus Zika e por clínicos e profissionais de saúde pública que façam tratamentos clínicos ou vigilância.

## 2. Recomendações provisórias

### 2.1 Amostras

O vírus Zika foi detectado no sangue total (também no soro e no plasma), urina, líquido cefalorraquidiano, fluido amniótico, sêmen e saliva. Existem cada vez mais evidências de que o vírus Zika está presente na urina e no sêmen durante mais tempo do que no sangue total ou na saliva. [3]

Embora ainda estejam a ser recolhidos dados sobre a duração da persistência do vírus na saliva, líquido cefalorraquidiano, sêmen e produtos de concepção, para fins deste documento, recomenda-se que sejam colhidas amostras de sangue total, soro e urina nos doentes que se apresentem para os testes.

Contudo, sempre que possível, a OMS encoraja a colheita de outros tipos de amostras para testes de confirmação ou quando se investiga a associação entre a infecção pelo vírus Zika e casos de complicações neurológicas, microcefalia e potencial transmissão sexual.

- **Amostras** para testes de ácido nucleico (NAT): Sangue total, soro colhido num tubo seco e/ou urina colhida que se apresentem com início de sintomas  $\leq 7$  dias
- **Serologia (detecção IgM):** Sangue total colhido num

tubo seco e soro colhido em doentes que se apresentem com início de sintomas  $\geq 7$  dias. Sempre que possível, devem colher-se amostras emparelhadas de soro, pelo menos, com 2-3 semanas de diferença, de preferência, com a primeira amostra de soro colhida durante os primeiros 5 dias da doença.

Além da informação do doente, registada com uma amostra colhida (nome completo, data de nascimento, endereço, hora e data da colheita, etc.), deve recolher-se também a seguinte informação:

- **Sintomas, data de início, duração dos sintomas, contacto com casos conhecidos do vírus Zika (e tipo de contacto, e.g., amamentação, parceiro sexual);**
- **História completa de viagens (datas, locais, duração da visita); e**
- **História de vacinação, especialmente associada com a vacinação com flavivírus, incluindo o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa e, quando possível, os vírus da dengue.**

Durante um surto, especialmente em zonas com transmissão generalizada, não será comportável testar todos os casos suspeitos. Os seguintes grupos devem ter prioridade na colheita e testagem de amostras:

- doentes com contacto sexual com um caso confirmado ou provável;
- doentes que correspondam à definição de um caso suspeito com perturbações neurológicas;
- mulheres grávidas com história de viagens a zonas com transmissão corrente do vírus Zika e/ou contacto sexual com um caso confirmado ou provável;
- mulheres grávidas em zonas com transmissão corrente do vírus Zika, cujos fetos tenham ou se suspeite que tenham anomalias cerebrais congénitas;
- recém-nascidos com microcefalia ou anomalias neurológicas nascidos em zonas com transmissão corrente do vírus Zika ou nascidos de mulheres com história de viagens a zonas afectadas pelo Zika durante a gravidez
- bebés com mães diagnosticadas com o vírus Zika, especialmente se estiverem a amamentar; e
- nados-mortos ou abortos espontâneos de mulheres que viveram ou viajaram para zonas afectadas pelo Zika, durante a gravidez.

## 2.2 Estratégia de testagem

A estratégia de testagem adoptada pelos laboratórios deve ser determinada pelos recursos disponíveis e o fluxo de trabalho em cada laboratório. As abordagens de testes usando estas estratégias variam conforme a prevalência de vírus que circulam na zona onde os doentes estiveram expostos.

A OMS recomenda as seguintes estratégias:

- **NAT** em doentes que se apresentem com sintomas iniciais < 7 dias.
- **Serologia e/ou NAT** em doentes que se apresentam com sintomas iniciais  $\geq$  7 dias. A serologia é o método preferido em amostras de doentes com início dos sintomas >7 dias. Quando se usa NAT, os resultados negativos devem ser interpretados com cautela. Este teste não exclui a infecção, pois a viremia baixa rapidamente 7 dias depois do início dos sintomas, não podendo ser detectada por testes no extremo inferior da sensibilidade.

### a. Algoritmo de teste proposto para casos suspeitos de infecção por arbovírus identificada sete dias depois do início dos sintomas (Anexo 1, Figura 1)

A presença do vírus Zika pode ser confirmada, usando NAT, tais como a RT-PCR, para detectar metas no genoma do vírus específicas do vírus Zika. Os laboratórios que usem um ensaio de pan-flavivírus, em combinação com a sequência genética ou outras metodologias moleculares convencionais, como os ensaios multiplex para a detecção de flavivírus, devem garantir que as sequências iniciadoras internas foram actualizadas, para detectar as recentes estirpes do vírus. Foram publicados conjuntos de iniciadores e sondas para ensaios específicos do vírus Zika [5].

O vírus Zika deve ser testado para além da dengue e da chikungunya, quer sequencialmente quer em paralelo, reconhecendo que a co-infecção pelo vírus Zika e outros arbovírus foi documentada e tendo em consideração a circulação endémica de flavivírus.

### b. Algoritmo de teste proposto para casos suspeitos de infecção por arbovírus mais de uma semana após o início dos sintomas (Anexo 1, Figura 2)

Os testes serológicos do vírus Zika apenas devem ser feitos por laboratórios com experiência na execução de serologia dos flavivírus. Os ensaios serológicos recomendados incluem imunoensaios enzimáticos (EIA) e ensaios de imunofluorescência (IFA) detectando anticorpos IgM através do lisado viral, proteínas sobrenadantes ou recombinantes em cultura de células, assim como ensaios de neutralização, tais como testes de neutralização por redução de placas (PRNT). Embora o PRNT, normalmente, apresente a maior especificidade, os ensaios serológicos estão sujeitos a reactividade cruzada, especialmente em doentes com infecção anterior por

flavivírus ou história de imunização. A estratégia adequada de testagem em doentes que se apresentem  $\geq$  7 dias após o início dos sintomas centra-se na serologia, devido à disponibilidade de reagentes. A detecção de IgM deve ser feita em mulheres grávidas nas zonas de transmissão endémica ou em mulheres grávidas que possam ter tido contacto com o vírus Zika transmitido por vectores ou por via sexual. Se for necessário fazer mais testes, o uso de testes comparativos de neutralização poderá fornecer maior especificidade.

Em geral, um resultado reactivo para o Igm do vírus Zika, na ausência de IgM da dengue ou outros flavivírus, sugere exposição recente ao vírus Zika (Figura 2). Para os laboratórios que executem PRNT, um aumento de quatro vezes nos títulos de anticorpos neutralizadores, na ausência de um aumento no título de anticorpos para outros flavivírus, constitui uma forte evidência de infecção recente pelo vírus Zika. Outras orientações sobre testes serológicos serão fornecidas, à medida que surgirem mais informações.

### c. Diagnóstico in vitro para o vírus Zika que pode ser usado no ponto de cuidados ou nas suas imediações

Existe um forte interesse e necessidade de diagnósticos in vitro rápidos e simples de usar (DIV) para a infecção pelo vírus Zika, nos pontos de cuidados ou nas suas imediações. Deve dar-se especial atenção à avaliação reguladora da qualidade, segurança ou desempenho dos pontos de cuidados, quando se decide usar DIV.

## 2.3 Processamento e armazenamento das amostras

Quando se usam testes comerciais, as amostras devem ser colhidas, transportadas e armazenadas de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as outras circunstâncias, recomenda-se que as amostras sejam guardadas em refrigeração de 2-8°C e analisadas dentro de 48 horas. Se houver uma demora superior a 48 horas antes do teste, o soro deve ser separado e armazenado à parte. Todos os tipos de amostras podem ser congeladas a -20°C, até 7 dias. Para armazenamento superior a 7 dias, as amostras devem ser congeladas a -70°C. Deve evitar-se a congelação repetida e a descongelação das amostras.

A temperatura deve ser controlada e registada regularmente, para identificar eventuais flutuações. Os frigoríficos/congeladores domésticos, com grandes oscilações de temperaturas, não são adequados para o armazenamento de amostras congeladas.

## 2.4 Biossegurança

O trabalho laboratorial de diagnóstico, incluindo a análise da reacção em cadeia da transcriptase reversa (RT-PCR) e os testes serológicos em amostras clínicas de doentes com suspeitas ou confirmação de infecção pelo vírus Zika, deve ser realizado em condições do Nível 2 de Biossegurança (BSL-2), como se descreve no *Manual de Biossegurança Laboratorial*, 3.ª ed., da OMS [4].

Todos os testes destinados a detectar a presença do vírus Zika devem ser executados em laboratórios devidamente equipados, por pessoal treinado nos procedimentos técnicos e de segurança relevantes. Em qualquer circunstância, devem ser seguidas as orientações nacionais sobre biossegurança laboratorial.

## 2.5 Transporte de amostras

As amostras que contenham ou sejam suspeitas de conter o vírus Zika podem ser transportadas em gelo seco, como substâncias biológicas da categoria B, UN3373.

Os regulamentos internacionais, tal como descritos nas *Orientações para Regulamentos sobre o Transporte de Substâncias Infecciosas de 2015-2016, da OMS*, devem ser cumpridos. [6]

## 2.6 Escolha do diagnóstico in vitro (DIV)

Para assegurar testes seguros e eficazes, é preciso ter em conta a concepção e o desempenho dos produtos de diagnóstico. Até à data, poucos dos DIV comercialmente disponíveis para o vírus Zika foram submetidos a uma avaliação reguladora da qualidade, segurança e desempenho.

Algumas instituições desenvolveram ensaios internos para os testes do vírus Zika. A OMS recomenda que os laboratórios, que pretendam desenvolver e executar RT-PCR internamente, encomendem ao seu fornecedor habitual os conjuntos publicados de iniciadores/sondas, que são capazes de detectar todas as estirpes circulantes do vírus Zika, e se assegurem de que o ensaio é devidamente validado para uso em cada tipo de amostra. Do mesmo modo, para ensaios comerciais, os laboratórios devem seguir as instruções do fabricante sobre o tipo de amostra e, se necessário, validar os seus ensaios para os tipos de amostras e incluir controlos apropriados do processo (interno) e o controlo externo da qualidade. O material de controlo da qualidade está disponível no arquivo mundial vírus europeus (<http://global.european-virus-archive.com/>) e, em breve, estará disponível através de um programa da OMS sobre preparações internacionais de referência biológica. Os Escritórios Regionais da OMS poderão ajudar neste processo.

Em resposta à necessidade de DIV de qualidade garantida para o vírus Zika, a OMS criou um procedimento de avaliação e listagem para uso em situações de emergência (EUAL) [7]. O procedimento EUAL avalia se existem evidências suficientes que mostrem que os benefícios de usar os DIV para o vírus Zika superam os riscos previsíveis no actual contexto. A listagem da OMS também obriga o fabricante a comunicar questões de desempenho e qualidade. Dadas as consequências de um diagnóstico errado, a OMS recomenda vivamente que apenas se devam usar DIV que tenham sido submetidos a uma avaliação abrangente e independente da qualidade, desempenho e segurança, para o diagnóstico da infecção pelo vírus Zika.

## 3. Elaboração das orientações

### 3.1 Agradecimentos

A elaboração destas orientações provisórias: contou com os seguintes contributos: Dr.<sup>a</sup> Emma Aarons, Public Health England; Professor John Aaskov, Queensland University of Technology, Australia; Dr. Daniel Bailey, Public Health England; Dr.<sup>a</sup> Cristina Domingo Carrasco, Centre for Biological Threats and Special Pathogens, Germany; Dr. Sebastien Cognat, Global Capacities, Alert and Response, WHO/Lyon; Kara Durski, Emerging and Epidemic Zoonotic Diseases, WHO/HQ; Dr. Pierre Formenty, Emerging and Epidemic Zoonotic Diseases, WHO/HQ; Dr.<sup>a</sup> María Guadalupe Guzman, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba; Dr.<sup>a</sup> Pamela Hepple, WHO/EURO; Professor Marion Koopmans, National Institute for Public Health and Environment, Netherlands; Dr.<sup>a</sup> Isabelle Leparç-Goffart, French National Reference Centre for Arboviruses; Dr Jairo Mendez Rico, WHO/AMRO; Robyn Meurant, Prequalification, WHO/HQ; Dr. Jorge Munoz, United States Centers for Disease Prevention and Control; Dhamari Naidoo, Emerging and Epidemic Zoonotic Diseases, WHO/HQ; Dr.<sup>a</sup> Karen Nahapetyan, WHO/EMRO; Dr. Lee Ching Ng, National Environment Agency, Singapore; Dr. Claudius Nuebling, Technologies, Standards and Norms, WHO/HQ; Dr Christopher Oxenford, Department of Global Capacities, Alert and Response, WHO/Lyon; Ms Irena Prat, Essential Medicines and Health Products, WHO/HQ; Dr Chantal Ruesken, Erasmus Medical Centre, Netherlands; Ms Anita Sands, Prequalification, WHO/HQ; Dr. Jonas Schmidt-Chansit, Bernhardt Nocht Institute, Germany; Dr. Willy Urassa, Prequalification, WHO/HQ; Dr. Herve Zeller, European Centre for Disease Prevention and Control.

### 3.2 Métodos de elaboração das orientações

Através das redes existentes dos Centros de Colaboração da OMS, foram identificados peritos em testes e virologia laboratoriais, incluindo peritos das Regiões das Américas, Europa e Pacífico Ocidental. O grupo de peritos reuniu-se por videoconferência, em 18 de Fevereiro de 2016, para analisar o projecto de orientações. Posteriormente, os participantes forneceram *feedback* escrito, que foi incorporado no documento revisto. Uma segunda ronda de estudo do documento realizou-se em Março de 2016, após uma consulta da OMS sobre requisitos da EUAL para a avaliação de dossiês e laboratórios, com vista ao diagnóstico do vírus Zika e realizada de 14 a 15 de Março de 2015, em Genebra, na Suíça.

### 3.3 Declaração de interesses

Não foram identificados quaisquer conflitos de interesses, a partir das declarações apresentadas. Não foram usados quaisquer fundos específicos para elaborar as presentes orientações provisórias.

## 4. Referências

1. Garcia E, Yactayo S et al. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. *Weekly Epidemiological Record* 2016; 91: 73-81. <http://www.who.int/wer/en>
2. Hill S, Russell K, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report ePub*: 26 February 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2er>
3. Gourinat AC, O'Connor O et al. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis*. [Internet]. 2015 Jan. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140894>
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, 3rd edition. Geneva, 2004. Available online at [http://www.who.int/ihr/publications/WHO\\_CDS\\_CSR\\_LYO\\_2004\\_11/en/](http://www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/)
5. Charrel RN, Leparac-Goffart I et al. State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response [Submitted]. *Bull World Health Organ E-pub*: 10 Feb 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.16.171207>
6. World Health Organization. *Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2015-2016*. Geneva, 2015. Available online at [http://www.who.int/ihr/publications/who\\_hse\\_ihr\\_2015.2/en/](http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ihr_2015.2/en/)
7. World Health Organization. *Emergency Use Assessment and Listing (EUAL) Procedure for Zika Virus Disease (IVDs)* [Webpage]. Accessed 20 Feb 2016. Available online at [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/eual-zika-virus/zika/en/](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/eual-zika-virus/zika/en/)

© Organização Mundial da Saúde 2016

Todos os direitos reservados. As publicações da Organização Mundial da Saúde estão disponíveis no *website* da OMS ([www.who.int](http://www.who.int)) ou podem ser compradas na WHO Press, World Health Organization, 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland (tel.: +41 22 791 3264; fax: + 41 22 791 4857; correio electrónico: [bookorders@who.int](mailto:bookorders@who.int)).

Os pedidos de autorização para reproduzir ou traduzir publicações da OMS, quer seja para venda ou para distribuição não comercial, devem ser enviados para WHO Press pelo *website* da OMS ([www.who.int/about/licensing/copyright\\_form/en/index.html](http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html)).

As designações utilizadas e a apresentação dos dados nesta publicação não implicam, da parte do Secretariado da Organização Mundial da Saúde, qualquer tomada de posição quanto ao estatuto jurídico dos países, territórios, cidades ou zonas, ou das suas autoridades, nem quanto à demarcação das suas fronteiras ou limites. As linhas pontilhadas nos mapas representam fronteiras aproximadas, sobre as quais é possível que ainda não exista total acordo.

A menção de determinadas empresas e de certos produtos comerciais não implica que essas empresas e produtos sejam aprovados ou recomendados pela Organização Mundial da Saúde, preferencialmente a outros, de natureza semelhante, que não sejam mencionados. Salvo erro ou omissão, as marcas registadas são indicadas por uma letra maiúscula inicial.

A Organização Mundial da Saúde tomou as devidas precauções para verificar a informação contida nesta publicação. Todavia, o material publicado é distribuído sem qualquer tipo de garantia, nem explícita nem implícita. A responsabilidade pela interpretação e uso do referido material cabe exclusivamente ao leitor. Em caso algum, poderá a Organização Mundial da Saúde ser considerada responsável por prejuízos que decorram da sua utilização.

Anexo 1. Algoritmos de análise

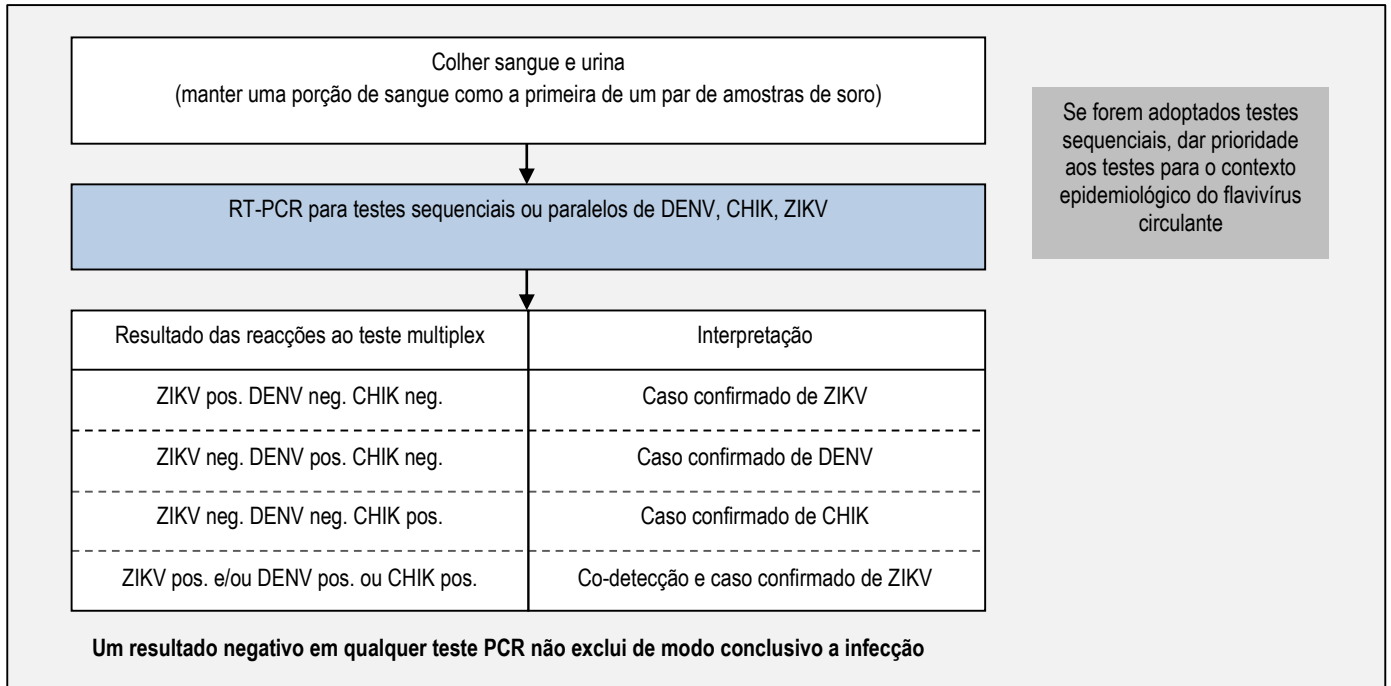


Figura 1. Algoritmo de análise proposto para casos suspeitos de infecção por arbovírus identificados sete dias seguintes ao início dos sintomas

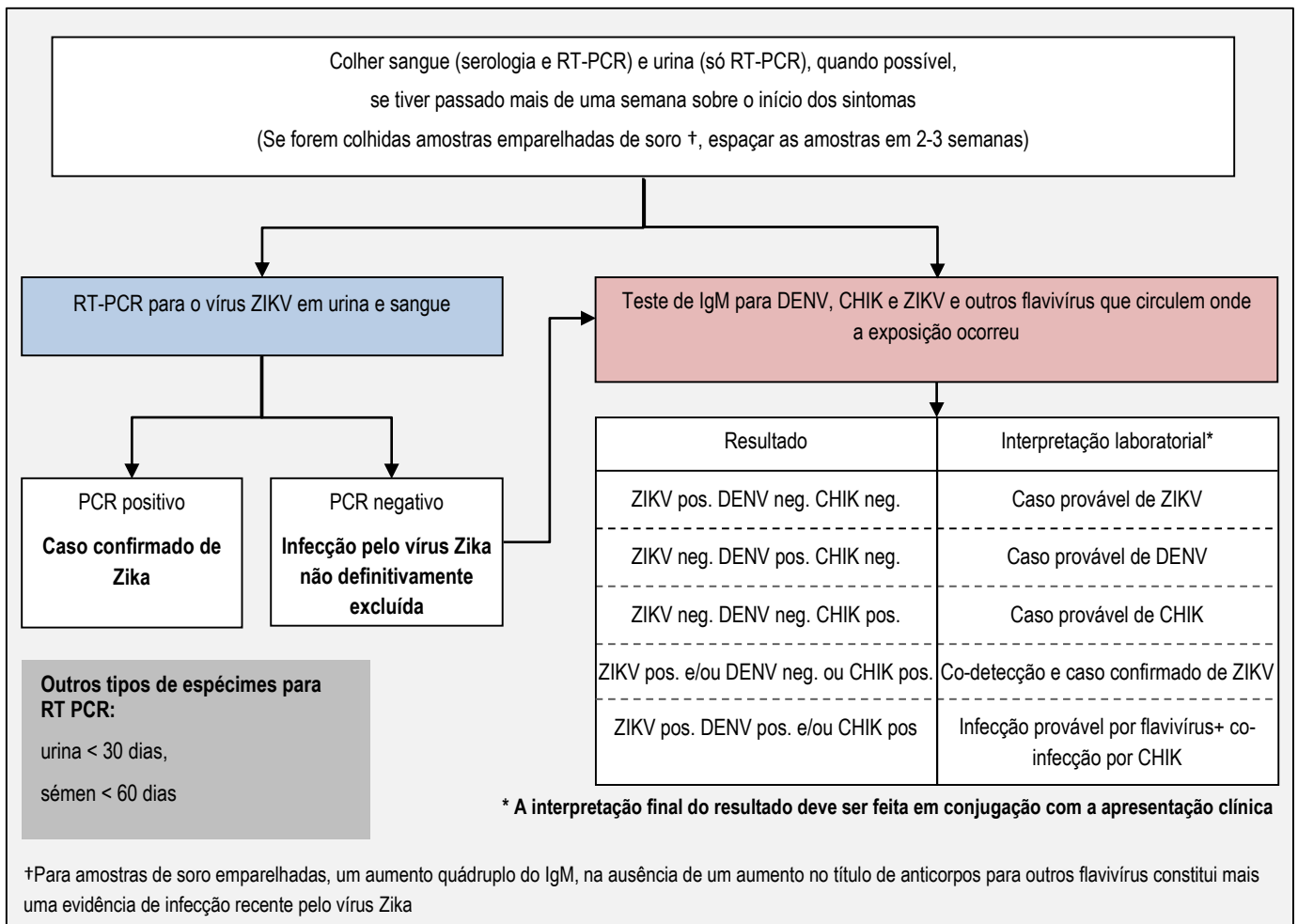


Figura 2. Algoritmo de análise proposto para casos suspeitos de infecção por arbovírus mais de uma semana depois do início dos sintomas