

UTILIZAÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR PELO MÉTODO DE RT-PCR NO DIAGNÓSTICO DE ZIKA VÍRUS EM HUMANOS

Priscila Trajano da Silva¹; Adriane Policarpo Rose Guedes ¹; Jeane Karla de Mendonça Mota².

¹Discente da Faculdade Maurício de Nassau

²Docente da Faculdade Maurício de Nassau

Resumo: O Zika vírus foi descoberto em 1946, mas só teve notoriedade depois que países foram atingidos pela epidemia do vírus, como o Brasil. Em 2015, grande quantidade de pessoas com a infecção viral procurou a unidade de saúde em busca de diagnóstico e tratamento para a patologia. Foram realizadas para descoberta da doença. Após sua identificação descobriu-se que o vírus é transmitido através do mosquito *Aedes Aegypti*. O Vírus é classificado como um arbovirus da família flavivirus e seu diagnóstico é específico onde utiliza-se um método de biologia molecular, a técnica de RT-PCR transcriptase reversa-reação em cadeia polimerase. Este estudo tem como objetivo fazer um levantamento de informações em torno da forma de diagnóstico do Zika vírus através da biologia molecular por meio da RT-PCR para esclarecimento sobre o diagnóstico desta doença tão frequente nos dias atuais onde serão avaliadas as principais vantagens e desvantagens do uso da RT-PCR. **Metodologia:** Trata-se de uma revisão de literatura a partir de pesquisa em livros e artigos nas bases de dados: Scielo, Pubmed, Bibliomed de 2010 a 2016 no idioma português e inglês. **Resultados e discussão:** Uma das formas de diagnóstico do Zika vírus é feito por método de biologia molecular em que amostras colhidas até do 1º ao 3º dia do início dos sintomas está indicada a pesquisa de ácidos nucleicos virais por RT-PCR; O método possui sensibilidade e alta especificidade, sendo preciso, rápido e eficaz. Sua desvantagem é que a técnica necessita de conteúdo viral de amostras positivas de pessoas contaminadas pelo vírus no tempo adequado, é restrito, requer rapidez e cuidados. **Conclusão:** Conclui-se que o método é confiável e rápido podendo promover melhor forma de tratamento individualizado, evitando complicações posteriores. Suas desvantagens dificultam o acesso da população.

Palavras-Chave: Zika Vírus, Reação em Cadeia Polimerase (PCR), Biologia Molecular.

Introdução:

Segundo o ministério da saúde, de fevereiro a abril de 2016, foram registrados 91.387 prováveis casos de Zika vírus no Brasil. A incidência é de 44,7 casos por cada 100 mil habitantes. A região nordeste é a segunda com maior número de casos prováveis com 30.286, perdendo apenas para o sudeste (BRASL, 2016).

A doença é considerada nova nos países, visto que, surgiu em fevereiro de 2015 com grande surto de sinais e sintomas da doença em pessoas que procuraram unidades de saúde no Nordeste, porém sem sucesso, pela falta de exames específicos e tratamentos para esta patologia, até então desconhecida. A maior parte da população não procura os serviços de saúde devido aos sinais e sintomas variáveis porque alguns casos podem ser até assintomáticos. Sendo assim, os dados epidemiológicos podem ser camuflados pela ausência de registro das pessoas que não são diagnosticadas. Em abril, pesquisadores da universidade da Bahia estudaram o caso e conseguiram identificar o vírus. Descobriram então que ele havia sido descoberto em 1947, sendo classificado como arbovirus do gênero flavivírus, da família flaviridae com afinidade pelo

sistema nervoso. O vetor de transmissão é o mosquito *Aedes aegypti* (BALM, 2012; BRASL 2015).

É um vírus comum na África, e evidências laboratoriais mostram que após 1966 houve disseminação para Ásia e posteriormente para Oceania. Após sua detecção o vírus recebeu o nome de Zika, por causa do lugar onde foi descoberto, na floresta de Zika em Uganda, por cientistas que pesquisavam sobre a febre amarela em macacos. Na América do Sul, o surgimento veio em 2015 com o surto da doença no Brasil e Colômbia. Existem duas linhagens do vírus, uma africana e outra asiática que possivelmente se adaptou de forma diferente geneticamente, e foi identificada no Brasil (BRASL 2015; BRASL 2016; BALM, 2012; COES, 2015; ECDC, 2014; FREIRE, 2015).

Não são relatadas complicações graves durante o período patogênico da doença, porém, casos de má formação do feto estão sendo associados ao vírus quando a mãe é infectada durante a gestação (BRASIL, 2015; BRASIL, 2016).

O diagnóstico do vírus é possível por meio da biologia molecular através do método de reação em cadeia polimerase (PCR), onde em tempo real na fase aguda da doença é identificado o

material genético do vírus (COES, 2015; BRASIL 2015).

Este estudo tem como objetivo fazer um levantamento de informações em torno da forma de diagnóstico do Zika vírus através da biologia molecular por meio da RT-PCR para esclarecimento sobre o diagnóstico desta doença tão frequente nos dias atuais. Como objetivos secundários, foram avaliadas as principais vantagens e desvantagens do uso da RT-PCR como forma de identificação do vírus.

Zika Vírus:

O Zika vírus é classificado como arbovírus, são transmitidos por artrópodes e uma das manifestações que ele pode apresentar é encefalite. É do gênero Flavivírus, família Flaviviridae, onde possuem um RNA (sigla em português: ARN e em inglês, RNA, ribonucleic acid) de fita simples (BRASIL, 2015; STEPHEN, 2014).

A transmissão mais conhecida até o momento é pela picada do mosquito do mosquito *Aedes aegypti*. Outras formas de transmissão por meio do leite materno, saliva, sêmen ainda não foram comprovados. Estudos comprovam que no líquido amniótico é possível

encontrar o vírus, e ele é importante ser identificado porque pode afetar o feto, Em 2015, o vírus Zika foi detectado no fluido amniótico de duas mulheres grávidas, indicando que é possível atravessar a placenta e causar infecções em recém-nascidos. (ECDC, 2014, BRASL, 2015, OLIVEIRA MELO, 2016).

Acredita-se que o vírus chegou ao Brasil em 2014 e causou uma doença sem conhecimento da população e dos órgãos de saúde do país, tornando a população brasileira suscetível à infecção devido à falta da imunidade natural contra o Zika vírus e a falta de vacinação para prevenção da doença.

A manifestação clínica mais comum da infecção pelo vírus é leve a moderada com febre controlada, abaixo de 38,5°C, sem complicações, marcas vermelhas na pele ou não apresentar sintomas, dor muscular, articulações, edema nas articulações de intensidade leve a moderada, prurido e conjuntivite não purulenta, podendo raramente evoluir para quadro grave, onde ocorreu um único caso de morte em 2015. Outras complicações podem ser associadas como a microcefalia e a relação do vírus com a síndrome de Guillain-barré. Até 24 de maio de 2016, a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da

Saúde confirma casos de microcefalia no Brasil q chegou a 1.434, 50 a mais que nos últimos dados do Ministério da Saúde. Ao todo, são 7.623 notificações desde o início das investigações. Em 22 de outubro, até 21 de maio de 2016, foram identificados casos em 311 municípios distribuídos em 14 unidades da federação, onde foram registradas ainda 285 mortes suspeitas de microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central após o parto ou durante a gestação. Destes, 60 foram confirmados para microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central. Outros 187 continuam em investigação e 38 foram descartados. Os estados com maior número de casos confirmados foram Pernambuco, com 359 casos, seguido da Bahia, com 247, Paraíba, com 129, e do Maranhão, com 126.

O tratamento não é específico, é recomendado q pacientes com a febre Zika sejam aconselhados a descansar, utilizar paracetamol ou dipirona nos casos sintomáticos, fazer ingestão de líquidos para hidratação, anti-histamínicos para diminuir manchas vermelhas e uso de aspirina e anti-inflamatórios não esteroides utilizados somente após a febre dengue ser descartada, a fim de reduzir o risco de hemorragias (BENNET, 2014; BRASIL, 2015; BRASIL, 2016).

PCR:

PCR significa reação da polimerização em cadeia, uma técnica da biologia molecular que amplifica o DNA ou RNA independente do seu tamanho, produzindo cópias para diagnóstico de diversas patologias.

As poucas moléculas de DNA ou RNA são utilizadas como moldes para amplificação (FORATTINI, 2005)

Várias adaptações do método foram desenvolvidas para melhor utilidade. Um desses foi a TR - PCR, que pode amplificar o RNA (COX, 2012).

RT – PCR (Transcriptase Reversa - reação em cadeia da polimerase):

A RT – PCR é a técnica de PCR com a transcriptase reversa, uma enzima que transcreve o material genético de RNA em cDNA de uma amostra. Esta amostra deve conter mRNA purificados podendo ser de cultura de células ou de tecidos , sem qualquer vestígio de DNA. Então a partir do cDNA haverá em seguida a técnica de PCR por protocolos normais (convencional). Essa técnica é utilizada para quantificar os níveis de mRNA, entre outro objetivos. É uma

técnica simples e rápida (PASSAGLIA, 2014; WALTER, 2010).

Metodologia:

O trabalho seguiu um estudo descritivo de caráter exploratório, pesquisa bibliográfica, o qual se observa, analisa e correlacionam fatos e fenômenos variáveis sem manipulá-los. Neste estudo foram adotadas como principais fontes de pesquisa: bibliografias, trabalhos acadêmicos e artigos avulsos no período de 2014 até 2016, no idioma inglês e português, consultas à internet através de sites de pesquisa como o Scielo, Pubmed, sites governamentais, jornais e revistas de conteúdo científico.

Resultados e Discussão:

A biologia molecular é ferramenta básica de profissionais do meio da genética e epidemiologia que estudam variação e distribuição de doenças nas famílias e populações. Com o projeto Genoma Humano, foi feita uma base de dados de sequências genômicas disponíveis em National Center for Biotechnology Information (NCBI), apresentando uma grande quantidade de genes para uso posterior de outras

pesquisas (VENTER et al. 2001).

O conhecimento sobre biologia molecular avançado traz esperança para cura de diversas doenças, visto que é um método preciso e eficaz, contribuindo para evitar efeitos Adversos de doenças se forem diagnosticados rapidamente (ELLSWORTH & MANOLIO, 1997 apud GATTÁS, 2012).

Um das formas de diagnóstico do Zica vírus é feito por método de biologia molecular através da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), onde vai ser amplificado seu gene. O período de incubação da doença é de 3-12 dias após a infecção picada de mosquito. Uma vez que o estágio virêmico pode ser curto, a OMS (Organização Mundial De saúde) recomenda que o ensaio de RT-PCR deverá ser feito no material sanguíneo colhido, utilizando a parte do soro dentro de 1 a 3 dias após o início dos sintomas ou nas amostras de saliva ou urina coletadas durante os primeiros 3 a 5 dias após o início para a pesquisa de ácidos nucléicos virais por RT-PCR em Tempo Real e RT-PCR convencional; A técnica utiliza RNA de transcriptase reversa e moléculas com RT-PCR após, para ampliar sequências de nucleotídeos com sensibilidade e alta especificidade,

demonstrando a sua utilidade como uma ferramenta de diagnóstico da doença. Uma desvantagem é que a técnica necessita de conteúdo viral in vivo, ou seja, amostra positiva de pessoas contaminadas pelo vírus e isso requer cuidados de segurança para manejo do material, profissionais habilitados para realizar a técnica, além de ser um método caro e não está a alcance de todos, porém, produz um diagnóstico preciso, visto que identifica o material genético do vírus com rapidez. (FAYE, 2014; CAMACHO, 2016).

O diagnóstico laboratorial específico de Zica Vírus baseia-se principalmente na detecção de RNA viral a partir de espécimes clínicos. Acredita-se que o período virêmico seja curto, o que permitiria a detecção direta do vírus até quatro a sete dias após o início dos sintomas, sendo ideal até o terceiro dia. Até o momento, a disponibilidade para realização de isolamento viral e RT-PCR está restrita aos Laboratórios de Referência da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) (BRASIL, 2016).

Conclusões:

As técnicas de biologia moleculares promovem um avanço para laboratórios

de diagnóstico e de pesquisa. A técnica é precisa e traz um diagnóstico eficaz, visto que identifica o material genético do agente infeccioso. A técnica Através de RT - PCR amplifica o material genético do vírus mesmo com pouco material biológico com rapidez e o identifica, sendo uma vantagem para o diagnóstico. É considerado um método de difícil acesso por que necessita de material específico que tem um custo elevado, profissionais e laboratórios habilitados para a técnica. Além desses fatores o vírus possui um tempo de incubação curto e a coleta deve ser pelo menos do 1º ao 3º dia de apresentação dos sinais e sintomas, porém em alguns casos a doença pode ser assintomática e o diagnóstico não é feito contribuindo para camuflagem de dados estatísticos de casos confirmados da doença. Conclui-se que é método é confiável e rápido, se utilizado no tempo correto para diagnóstico pode promover melhor forma de tratamento individualizado, contribuindo assim para melhor sobrevivência das pessoas, evitando complicações posteriores. Suas desvantagens dificultam o acesso da população a essas vantagens de se obter um diagnóstico rápido e ter um tratamento individualizado.

Referências:

BALM MN, LEE CK, LEE HK, CHIU L, KOAY ES, TANG JW. **A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus.** Journal of medical virology 2012;84:1501-5.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença.** Boletim Epidemiológico; 2015; 4. [Acessado em: 15 maio. 2016] Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-zika>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**, 28 de novembro de 2015. Nota à imprensa. 2015 [Acessado em 22 de maio de 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saudeconfirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo Vírus Zika**; 2015; [Acessado em 21 de maio de 2016] Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/>

[pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigilancia-e-resposta---vers-o-1---09dez2015-8h.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/09/Microcefalia---Protocolo-de-vigilancia-e-resposta---vers-o-1---09dez2015-8h.pdf)

BRASIL. Ministério da Saúde. **Saúde divulga primeiro balanço com casos de Zika no país**; 2016; [Acessado em 20 de maio de 2016] Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/23390-saude-divulga-primeiro-balanco-com-casos-de-zika-no-pais>

BENNETT, JOHN E.; DOLIN, RAPHAEL; BLASER, MARTIN J. (2014). Principles and Practice of Infectious Diseases. **Elsevier Health Sciences.** p. 1881. ISBN 978-1-4557-4801-3.

CAMACHO, Daría et al. Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 33, n. 2, 2016.

COX, Michael M.; DOUDNA, Jenifer A.; DONNEL, Michael O'. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas.** Porto Alegre: Artmed, 2012. Centro de Operações de Emergências em Saúde Pública sobre Microcefalias (COES). **Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a Semana**

Epidemiológica. Informe
Epidemiológico - Semana
Epidemiológica 47. 2015. Available at:
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/30/coes-microcefalias---informe-epidemiologico---se-47.pdf>.

ECDC. Rapid Risk Assessment - **Zika virus infection outbreak, French Polynesia** [Acessado em: 18 de maio de 2016]. Stockholm; 2014. Disponível em:
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Zika-virus-FrenchPolynesia-rapid-risk-assessment.pdf>

FAYE, Oumar; FREIRE, Caio C. M.; IAMARINO, Atila; FAYE, Ousmane; DE OLIVEIRA, Juliana Velasco C.; DIALLO, Mawlouth; ZANOTTO, Paolo M. A.; SALL, Amadou Alpha; BIRD, Brian (9 January 2014). "**Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century**". PLoS Neglected Tropical Diseases 8 (1): e2636. doi:10.1371/journal.pntd.0002636. PMC 3888466. PMID 24421913

FORATTINI, Oswaldo Paulo. **Conceitos Básicos de Epidemiologia Molecular**. São Paulo: Edusp, 2005. 135 p.

Freire CC de M, Iamarino A, Neto DF de L, Sall AA, Zanotto PM de A. **Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans**. [Acessado em: 25 de maio de 2016] Disponível em:
<http://biorxiv.org/content/early/2015/11/25/032839.abstract>

GATTÁS, Gilka Jorge Figaro; SEGRE, Marco; WÜNSCH FILHO, Victor. Genética, biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde. **Cien Saude Colet**, v. 7, n. 1, p. 159-167, 2002.

OLIVEIRA MELO, A. S.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. O.; ALVES SAMPAIO, S.; BISPO DE FILIPPIS, A. M. (1 January 2016). "**Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?**". Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 47 (1): 6–7. doi:10.1002/uog.15831. ISSN 1469-0705.

PASSAGLIA, Luciane M. P.; ZAHA, Arnaldo. Técnicas de Biologia Molecular: Técnicas de Biologia Molecular em Plantas. In: ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P.. **Biologia Molecular Básica**. 5.



ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. Cap. 16. p. 348-348.

STEPHEN, N J. **Virologia**. 1 ed. Rio de Janeiro. Elsevier 2014.

VENTER, J. C. et al. The Sequence of the Human Genome. **Science**, Estados Unidos, n. , p.1304-1351, 16 fev. 2001.

WALTER, Bruce Alberts | Alexander Johnson | Julian Lewis | Martin Raff | Keith Roberts | Peter. **Biologia celular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.