

O uso de PCR em tempo real em diagnósticos de arboviroses: revisão integrativa

The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review

Christiane O. L. Licínio; Flávio M. Ayres

Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil.

RESUMO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes (*arthropod-borne virus*). Destacam-se dengue, vírus da zica e chikungunya entre as arboviroses emergentes e reemergentes nos últimos anos em todo o mundo. A semelhança dos sintomas dessas infecções faz com que o diagnóstico clínico seja ineficaz, dificultando medidas profiláticas e preventivas para novos surtos. O diagnóstico molecular por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real é uma das formas de diagnosticar tais doenças. Neste estudo, foi compilada e avaliada a literatura sobre o diagnóstico das arboviroses. Nosso objetivo foi responder a uma pergunta norteadora: a metodologia PCR em tempo real é eficaz no diagnóstico das arboviroses? Foram pesquisados artigos científicos de livre acesso nos bancos de dados Pubmed (50 artigos) e Scielo (107 artigos), entre 2014 e 2019. A seleção foi realizada por meio dos critérios de inclusão e exclusão, restando apenas 20 artigos. Entre estes, 85% eram estudos transversais, 10%, revisões sistemáticas e 5%, estudos de caso. O período das publicações foi de 50% em 2017; 35% em 2016; e 5% em 2014, 2015 e 2019, cada. A respeito dos vírus tratados nos artigos, 25% dos estudos pesquisaram sobre dengue; 25%, sobre chikungunya e 20%, sobre o vírus da zica. A eficácia do diagnóstico molecular foi publicada em 21% dos artigos (sensibilidade e especificidade); 53% destacaram o limite de detecção; 70%, a ausência de reações cruzadas; e 80%, a diferenciação entre os vírus.

Unitermos: técnicas de diagnóstico molecular; vírus da dengue; vírus da zica; vírus da chikungunya.

ABSTRACT

Arboviruses are viral diseases transmitted by arthropods (arthropod-borne virus). Standing out dengue, zika virus, and chikungunya among the emergent and re-emergent arboviruses in recent years around the world. The similarity between the symptoms makes the clinical diagnosis ineffective, making difficult the prophylactic and preventive measures of new outbreaks. Molecular diagnosis using the real-time polymerase chain reaction (PCR) technique is one of the ways to diagnose such diseases. In this study, the literature on the diagnosis of arboviruses was compiled and evaluated. The objective was to answer the guiding question: Is the real-time PCR methodology effective in the diagnosis of arboviruses? Scientific articles of free access were searched in the databases Pubmed (50 articles) and Scielo (107 articles), between 2014 and 2019. The selection was done through the inclusion and exclusion criteria, only 20 articles remained. Among them, 85% cross-sectional studies, 10% systematic reviews, and 5% case studies. The period of publications was 50% in 2017, 35% in 2016, and 5% in 2014, 2015 e 2019, each. Regarding the viruses treated in the articles, 25% researched dengue and the same percentage for chikungunya, 20% researched about zika virus. The efficacy of the molecular diagnosis was published in 21% of the articles (sensitivity and specificity), 53% highlighted the limit of detection, 70% highlighted the absence of cross-reactions, and 80% highlighted the differentiation between viruses.

Key words: molecular probes techniques; dengue virus; zika virus; chikungunya virus.

RESUMEN

Las arbovirosis son enfermedades virales transmitidas por artrópodos (arthropod-borne virus). Dengue, zica y chikungunya se destacan entre los arbovirus emergentes y reemergentes en los últimos años en todo el mundo. La similitud de los síntomas de estas infecciones hace que el diagnóstico clínico sea ineficaz, dificultando las medidas profilácticas y preventivas para nuevos brotes. El diagnóstico molecular mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es una de las formas de diagnosticar esas enfermedades. En este estudio se recopiló y evaluó la literatura sobre el diagnóstico de arbovirosis. Nuestro objetivo era responder a una pregunta orientadora: ¿la metodología de PCR en tiempo real es eficaz para diagnosticar arbovirosis? Se buscaron artículos científicos de acceso abierto en las bases de datos Pubmed (50 artículos) y Scielo (107 artículos), entre 2014 y 2019. La selección se realizó utilizando los criterios de inclusión y exclusión, quedando solo 20 artículos. Entre estos, el 85% fueron estudios transversales, el 10% fueron revisiones sistemáticas y el 5% fueron estudios de casos. El período de publicaciones fue del 50% en 2017; 35% en 2016; y 5% en 2014, 2015 y 2019, cada. En cuanto a los virus tratados en los artículos, el 25% de los estudios investigaron sobre el dengue; el 25% el chikungunya y el 20% el virus del Zika. La efectividad del diagnóstico molecular se publicó en el 21% de los artículos (sensibilidad y especificidad); el 53% destacó el límite de detección; 70%, ausencia de reacciones cruzadas; y el 80%, la diferenciación entre virus.

Palabras clave: técnicas de diagnóstico molecular; virus del dengue; virus del zika; virus del chikungunya.

INTRODUÇÃO

Arbovírus é uma nomenclatura usada para indicar um agrupamento de vírus transmitidos por artrópodes (*arthropod-borne virus*). Mosquitos e carrapatos são exemplos dos artrópodes capazes de transmitir, pela picada, os vírus pertencentes primordialmente a três famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae*. O gênero mais importante entre essas três famílias é o Flavivírus, que possui quatro integrantes com grande importância epidemiológica: dengue (DENG), vírus da zica (ZIC), febre amarela (FA) e vírus West Nile (VWN). Da família *Togaviridae*, destaca-se o gênero Alphavírus, cujo integrante de maior importância epidemiológica é o chikungunya (CHIK). Todos esses gêneros são vírus do ácido ribonucleico (RNA), de sentido positivo, fita simples e envelopados⁽¹⁾.

Esses patógenos são responsáveis por grandes surtos de doenças em todo o mundo, principalmente nos últimos 20 anos. O fato de serem transmitidos por insetos, que são capazes de se espalhar por uma grande extensão geográfica, contribuiu para a ocorrência de epidemias⁽²⁾. Apenas no continente Antártico não há presença de arbovírus^(3, 4). Os vetores, os hospedeiros vertebrados e as condições climáticas são os principais fatores para que as arboviroses se espalhem tão rapidamente⁽¹⁾. Além disso, a alta capacidade de mutação e a adaptação também influenciam na ocorrência de grandes surtos⁽⁵⁾.

Mudanças climáticas nos últimos tempos, grandes aglomerações pela urbanização descontrolada, condições

sanitárias precárias e grande movimentação humana entre os continentes contribuem para a proliferação das arboviroses^(1-3, 6). Portanto, esses vírus são os protagonistas de doenças emergentes e reemergentes, que causaram um número expressivo de óbitos e impactaram economicamente vários países ao longo de anos⁽³⁾. Os vírus são cocirculantes em várias regiões e, em alguns casos, possuem o mesmo vetor de transmissão⁽⁷⁾.

Inicialmente, as arboviroses apresentam-se como uma doença febril aguda, seguida de sintomas de artralgia, mialgia e trombocitopenia^(5, 8). Isso faz com que o diagnóstico clínico diferencial seja precário, ou seja, a identificação do patógeno causador da doença é ineficiente apenas com esses sintomas. Assim, o diagnóstico laboratorial, com alta sensibilidade e especificidade, é essencial para essa abordagem⁽⁸⁾. Apesar de os sintomas iniciais serem comuns, alguns casos progredem para complicações após a infecção. Como exemplo, a febre hemorrágica nos casos de DENG, microcefalia e síndrome de Guillain-Barré nos casos de ZIC⁽⁵⁾. Dessa forma, a diferenciação entre os arbovírus é importante para o manejo do paciente para evitar as complicações, bem como para auxiliar na tomada de medidas preventivas para a não proliferação da doença⁽⁹⁾.

O diagnóstico laboratorial para as arboviroses pode ser realizado de duas formas: indiretamente, pela pesquisa de anticorpos no sangue do paciente contaminado, ou diretamente, por meio da pesquisa do patógeno no sangue e de outros fluidos corporais⁽¹⁾. O diagnóstico mais comum para os Flavivírus é feito pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (Elisa), que pesquisa

anticorpos da imunoglobulina da classe M (IgM) para os estágios iniciais da doença. Porém, o uso dessa metodologia acarreta inúmeras reações cruzadas entre os diversos arbovírus⁽¹⁰⁾; por isso, o principal método para diagnóstico de arboviroses, no estágio inicial da doença, é a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)⁽⁹⁾.

Os diagnósticos moleculares, como a RT-PCR e a PCR em tempo real, são bastante sensíveis e específicos, uma vez que diminuem a ocorrência de reações cruzadas e identificam os patógenos nos primeiros estágios da doença⁽¹⁰⁾. Várias matrizes biológicas podem ser usadas, como urina, sêmen, líquido amniótico e saliva, além de sangue total, soro e plasma⁽¹⁾. A vantagem da PCR em tempo real em comparação com a PCR tradicional é a quantificação do material amplificado simultaneamente à amplificação do material genético testado. Esse processo diminui o tempo gasto na reação e a possibilidade de contaminação cruzada. Nas amplificações de RNA, que possuem baixa estabilidade na molécula, a rapidez reduz a incidência de falso negativo⁽¹¹⁾.

Considerando a emergência e a reemergência das arboviroses DENG, CHIK, VZIC e FA nos últimos anos e a necessidade de identificar e diferenciar esses vírus, o objetivo desta revisão foi compilar e analisar a literatura científica quanto ao diagnóstico das arboviroses. O foco da pesquisa foi delimitado em relação à eficácia do diagnóstico molecular usado para identificar e diferenciar os vírus, em especial sobre sensibilidade, especificidade, ocorrência de reações cruzadas e limite de detecção.

METODOLOGIA

Este artigo é uma revisão integrativa que foi realizada seguindo as seguintes etapas: 1. seleção e identificação do tema – formulação da pergunta norteadora; 2. estabelecimento dos critérios de inclusão e exclusão; 3. definição das informações (artigos) por meio de pesquisa em bancos de dados; 4. avaliação e categorização das informações; 5. interpretação dos resultados obtidos; e 6. apresentação dos resultados.

A pergunta norteadora foi: a metodologia PCR em tempo real é eficaz no diagnóstico das arboviroses? Os bancos de dados PubMed e Scielo foram utilizados para a pesquisa de artigos científicos de livre acesso, em língua inglesa e portuguesa. O período de publicação entre janeiro de 2014 e julho de 2019 foi delimitado com o intuito de selecionar os artigos mais atuais e relevantes sobre o tema, pois se trata de assunto que foi mais disseminado a partir de 2014. DECS e MESH foram usados para encontrar os descritores

“*real time PCR*”, “*arbovirus*” e “*molecular diagnosis*”. Os operadores booleanos “AND”, na busca do banco de dados PubMed, e “OR”, no banco de dados Scielo, foram utilizados. Não houve restrição quanto ao desenho do artigo.

As publicações foram selecionadas pelo título e resumo. Foram excluídos artigos repetidos e textos que não traziam informações sobre o diagnóstico da doença ou que não eram sobre arbovírus. Os critérios de exclusão também se aplicaram aos artigos com abordagens alheias aos arbovírus citados anteriormente.

A seleção de artigos foi realizada em fevereiro de 2020. Cinquenta artigos no banco de dados PubMed e 107 artigos no banco de dados Scielo foram encontrados (não encontramos artigos repetidos). Aplicados os critérios de inclusão e exclusão, 32 artigos foram selecionados, porém, nove não eram de livre acesso e três não atenderam aos objetivos. Portanto, a pesquisa foi concluída com 20 artigos. A **Figura** apresenta o fluxo das etapas realizadas na pesquisa.

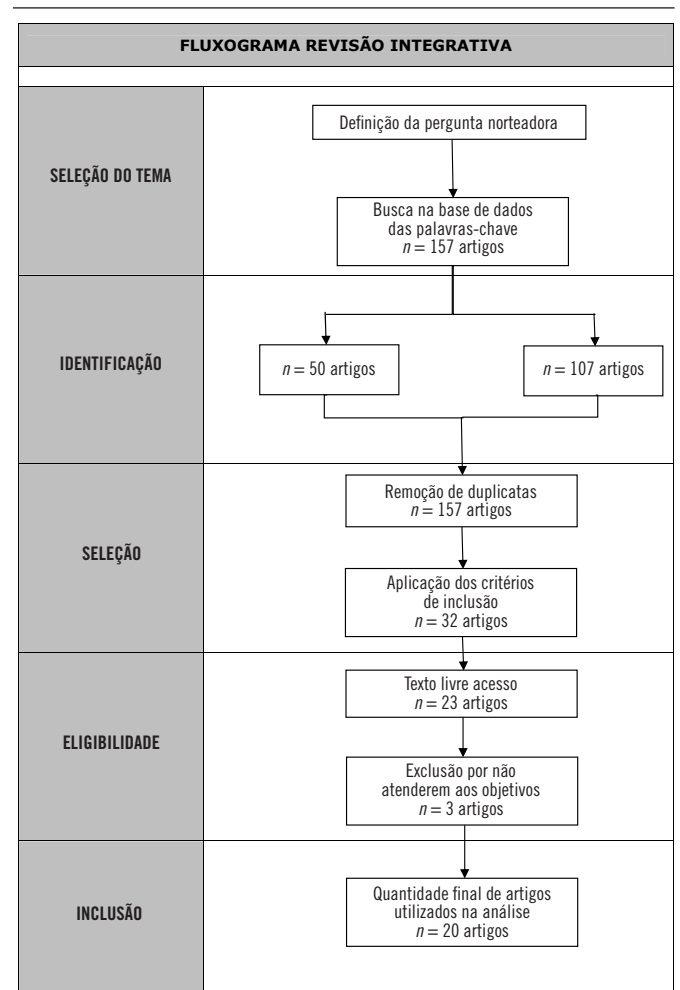


FIGURA – Fluxograma das etapas de busca e seleção dos artigos analisados

RESULTADOS

Dos 20 artigos selecionados, 85% foram de estudos transversais; 10%, de revisões sistemáticas; e 5%, de estudos de casos. A maioria dos artigos foi escrita em 2017 (50%) e 2016 (35%). Em 2019, 2015 e 2014, o número de publicações foi igual (5%), como descrito na **Tabela 1**.

Sobre os vírus pesquisados, a **Tabela 2** mostra que 25% dos artigos relataram exclusivamente sobre a DENG, a mesma porcentagem sobre o CHIK e 20% sobre o VZIC. A porcentagem de artigos que pesquisaram os três vírus ao mesmo tempo também foi de 20%. A pesquisa sobre DENG e CHIK e DENG e VZIC no mesmo artigo foi de 5% para cada grupo de doenças. Nenhum artigo mencionava a FA.

A **Tabela 3** sumariza os resultados dos estudos quanto aos parâmetros pesquisados para a eficácia do teste em questão.

Os artigos que relataram dados numéricos para sensibilidade e especificidade totalizaram 21%. O limite de detecção foi publicado em 53% dos artigos. A diferenciação entre os vírus foi citada em 80% dos textos selecionados, e a ausência de reações cruzadas, em 70%.

DISCUSSÃO

As arbovírus tornaram-se um problema de saúde pública em quase todos os países do mundo. Disseminação rápida, disponibilidade dos vetores, ausência de tratamento e prevenção eficazes fazem com que as epidemias sejam frequentes e cada vez mais virulentas. A capacidade adaptativa dos vírus em decorrência de variações genéticas contribui sobremaneira na sua emergência em novas regiões geográficas e na frequência de surtos em regiões onde já estão estabelecidos⁽¹²⁾.

TABELA 1 – Artigos selecionados durante as etapas da pesquisa da revisão integrativa

Artigo	Autores	Título do artigo	Desenho da pesquisa	Ano de publicação
1	Alva-Urcia <i>et al.</i> ⁽¹⁾	Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru	Estudo transversal	2017
2	Kurosaki <i>et al.</i> ⁽²⁾	Development and evaluation of a rapid molecular diagnostic test for zika virus infection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification	Estudo transversal	2017
3	Giry <i>et al.</i> ⁽³⁾	Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan [®] assay	Estudo transversal	2017
4	Edwards <i>et al.</i> ⁽⁴⁾	Analytical and clinical performance of a chikungunya qRT-PCR for Central and South America	Estudo transversal	2017
5	Giry <i>et al.</i> ⁽⁵⁾	Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic <i>Leptospira</i> genomes using a multiplex TaqMan [®] assay	Estudo transversal	2017
6	Luo <i>et al.</i> ⁽⁶⁾	Laboratory and molecular characterization of dengue viruses in a 2014 outbreak in Guangfo region, Southern China	Estudo transversal	2017
7	Fortuna <i>et al.</i> ⁽⁷⁾	Imported arboviral infections in Italy, July 2014–October 2015: a National Reference Laboratory report	Estudo transversal	2017
8	Eppes <i>et al.</i> ⁽⁸⁾	Testing for zika virus infection in pregnancy: key concepts to deal with an emerging epidemic	Revisão sistemática	2017
9	Gorman <i>et al.</i> ⁽⁹⁾	Assay optimization for molecular detection of zika virus	Estudo transversal	2016
10	Johnson <i>et al.</i> ⁽¹⁰⁾	Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays	Estudo transversal	2016
11	Patel <i>et al.</i> ⁽¹¹⁾	A field-deployable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the chikungunya virus	Estudo transversal	2016
12	Pessôa <i>et al.</i> ⁽¹²⁾	Investigation into an outbreak of dengue-like illness in Pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of zika, chikungunya, and dengue virus type 1	Estudo transversal	2016
13	Chen <i>et al.</i> ⁽¹³⁾	Development and evaluation of a sybr green-based real-time multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses	Estudo transversal	2016
14	Abd El Wahed <i>et al.</i> ⁽¹⁴⁾	Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of dengue infection	Estudo transversal	2015
15	Xavier <i>et al.</i> ⁽¹⁵⁾	Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update	Revisão sistemática	2017
16	Souza <i>et al.</i> ⁽¹⁶⁾	Clinical and laboratory diagnosis of congenital zika virus syndrome and diaphragmatic unilateral palsy: case report	Estudo de caso	2016
17	Acosta <i>et al.</i> ⁽¹⁷⁾	False-negative dengue cases in Roraima, Brazil: an approach regarding the high number of negative results by NS1 Ag kits	Estudo transversal	2014
18	Romeiro <i>et al.</i> ⁽¹⁸⁾	Evaluation and optimization of SYBR Green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the Flavivirus genus in Brazil	Estudo transversal	2016
19	Galo <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾	Development of in-house serological methods for diagnosis and surveillance of chikungunya	Estudo transversal	2017
20	Slavov <i>et al.</i> ⁽²⁰⁾	Simultaneous zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit	Estudo transversal	2019

TABELA 2 – Objetivos dos artigos selecionados, amostras utilizadas nos estudos e breve resumo dos principais resultados

Artigo	Objetivo	Amostras	Vírus-alvo da pesquisa	Principais resultados
1	Avaliar a prevalência de DENG, OROV, CHIK, MAYV e VZIC em pacientes com doença de febre aguda na cidade de Puerto Maldonado (Peru)	139 amostras de soro de humanos	DENG CHIK VZIC	41 (29,5%) positivos para arboviroses; 13 (9,35%) positivos para CHIK; nove (6,48%) positivos para DENG; sete (5,03%) positivos para VZIC. A diferenciação entre as arboviroses é precária apenas pela clínica
2	Desenvolver e avaliar um teste de diagnóstico molecular rápido para VZIC com a metodologia RT-LAMP	120 amostras de suspeitos, 90 de soro/plasma e 99 de urina	VZIC	100% de concordância entre RT-LAMP e qRT-PCR, sendo o limite de detecção da qRT-PCR mais sensível
3	Implementar um novo método molecular para detecção de Alphavírus	Cepas de vírus obtidas em diversos laboratórios	CHIK	Positividade nas amostras de CHIK. LD maior que o teste referência na mesma metodologia. Doze espécies de vírus foram testadas e não houve reação cruzada
4	Desenvolver e validar um ensaio de qRT-PCR capaz de detectar todas as linhagens de CHIK	RNA de cultura de vírus e amostras soro da Guatemala e do Equador em julho de 2015	CHIK	Ensaio eficaz, principalmente a cepa circulante na América do Sul. Em comparação com a PCR do CDC EUA, 98% de sensibilidade e 100% de especificidade
5	Implementar uma abordagem síndrome baseada no uso de um ensaio <i>multiplex</i> de qPCR para facilitar o rápido diagnóstico de síndromes semelhantes às da dengue na Ilha Reunion	Cepas de vírus de vários laboratórios e plasma humano positivo	CHIK DENG	Avaliação e acurácia do ensaio foram satisfatórias para CHIK e DENG, oferecendo respostas confiáveis. Demonstrou ser uma opção mais barata do que os testes simples para os mesmos patógenos
6	Investigar a utilidade de testes laboratoriais simples como marcadores preditivos de diagnósticos confirmados de DENG, bem como analisar o genótipo e a filogenética da cepa circulante na epidemia de DENG em Guang-Dong, em 2014	1044 pacientes: 875 confirmados casos de DENG (862 positivos por NS1 e 13 por PCR) e 169 negativos	DENG	Os testes laboratoriais simples (leucopenia, trombocitopenia, aminotransferases e tempo de tromboplastina ativada) são marcadores úteis no diagnóstico da DENG
7	Descrever os resultados das análises realizadas pelo Laboratório Nacional de Referência em Arboviroses (NRLA) no Instituto Nacional Italiano de Saúde no período de julho de 2014 a outubro de 2015, das infecções por arboviroses importadas da Itália	Amostras de soro de pacientes hospitalizados ($n = 180$)	DENG CHIK VZIC	Maior número de casos de DENG. Houve um aumento nos casos de CHIK, e o primeiro caso de VZIC foi detectado. Neste último, a técnica de PRNT foi decisiva na identificação; o vírus foi negativo nas técnicas de sorologia e PCR (que se mostrou sensível e específica). Porém, apenas por um curto período de tempo, limitado à viremia no organismo
8	Revisar a metodologia de testes laboratoriais para explorar a presença do vírus e a resposta imune	Sangue, soro, urina, líquido amniótico, LCR, saliva, sêmen, leite materno e mucosa vaginal	VZIC	Viremia é baixa no soro, de dois a 10 dias, o que dificulta o diagnóstico molecular e aumenta os casos de falso negativos. O estudo de caso demonstrou permanência do vírus nas hemácias por 81 dias, sugerindo que o uso de sangue total pode aumentar a sensibilidade
9	Examinar a performance diagnóstica da PCR em tempo real para a detecção de VZIC	Soro e urina de indivíduos que viajaram para Brasil, República Dominicana e Suriname entre 2015 e 2016	VZIC	Baixa viremia foi comprovadamente a causa de falso negativos. Este estudo não comprovou diferença entre viremia no sangue e na urina, mas sugere o uso das duas amostras combinadas. Ensaios com NS1 são mais específicos e sensíveis, enquanto os ensaios com NS3 e NS5 possuem baixa sensibilidade e dificuldade em probes específicos, respectivamente.
10	Descrever os resultados encontrados pelo CDC EUA sobre a eficiência de <i>kits</i> diagnóstico para CHIK	Soro e plasma	CHIK	Para PCR, o alvo NS2 é mais sensível, porém não há publicações sobre sua validação. Outras metodologias foram eficazes e não tiveram reações cruzadas
11	Desenvolver e avaliar um ensaio de PCR em tempo real para ser potencialmente uma ferramenta de diagnóstico <i>point of care</i> para detecção de CHIK	Soro e plasma humanos	CHIK	O ensaio mostrou-se com sensibilidade e especificidade clínicas de 100%, baixo limite de detecção e apenas uma reação cruzada com um vírus pouco conhecido (O'nyong'nyong). Com a utilização de um <i>primer</i> diferenciado, a reação cruzada foi extinta
12	Investigar e identificar a etiologia viral e aconselhar as autoridades sanitárias na implementação de medidas de controle para conter um surto	77 amostras de plasma humano, coletadas no Hospital Severino de Souto Siqueira, em Recife, PE, entre 25 e 31 de maio de 2015	DENG CHIK VZIC	31 (40,2%) pacientes com infecção por VZIC; nove (11,7%) pacientes com infecção por DENG; um (1,3%) paciente positivo para CHIK IgM, porém negativo no teste de PCR. Foi comprovada a coinfeção por VZIC/DENG em 2,6% dos pacientes. O estudo realça a necessidade de diferenciação entre os vírus para melhorar as medidas de controle sanitários

Cont. →

→ Cont.

13	Desenvolver um ensaio específico, sensível e robusto na metodologia RT-LAMP, para diagnóstico e diferenciação entre os sorotipos 1-4 da DENG	190 amostras de soro	DENG sorotipos 1-4	Os resultados RT-LAMP foram satisfatórios; essa metodologia foi mais eficaz que a PCR tradicional e em tempo real. Resultados (RT-LAMP, RT-PCR, qRT-PCR): sensibilidade 98,9%, 84,2% e 90,5%, respectivamente; especificidade 100%, 93% e 100%, respectivamente
14	Desenvolver dois ensaios de RT-RPA para detecção de DENG 1-4	Amostras humanas provenientes de surtos do Senegal e da Tailândia	DENG sorotipos 1-4	Resultados (RT-RPA e qRT-PCR): sensibilidade 98% RNA Tailândia e 72% RNA Senegal; 98% RNA Tailândia e 94,4% RNA Senegal. Especificidade 100% e 100%, respectivamente
15	Atualizar o diagnóstico clínico e laboratorial da febre pelo VZIC	Sangue, saliva e urina. Líquido amniótico, LCR, placenta e cordão umbilical em casos de infecção neonatal	VZIC	qPCR detecta infecção aguda em até sete dias após início dos sintomas. Sangue é menos sensível que urina (15 dias) e saliva. Terceiro dia de manifestação é o melhor momento para o teste. Em neonatos com sintomas clínicos e PCR negativo, realizar sorologia
16	Relatar um caso de paralisia diafragmática unilateral em um neonato com diagnóstico confirmado de zica congênita pelo exame de líquido amniótico por RT-PCR e por LCR por sorologia	Líquido amniótico e LCR	DENG CHIK VZIC	RT-PCR positivo na 29ª semana de gestação no líquido amniótico. Negativo no soro da mãe e do neonato após o parto (infecção aguda durante a gestação). IgM no soro do neonato confirma infecção intrauterina (IgM não ultrapassa barreira placentária)
17	Sugerir que os testes de NS1 Elisa possuem baixa sensibilidade e produzem resultados falso negativos e reações cruzadas com outras arboviroses	150 amostras de soro humano negativas para DENG por Elisa	DENG	33 amostras negativas Elisa foram positivas para qRT-PCR, ou seja, 22% falso negativos eram verdadeiramente positivos; 75% eram de DENG-4. Correlação com outros estudos em que a infecção secundária por DENG produz falso negativos em <i>kits</i> NS1
18	Avaliar e otimizar um teste diagnóstico pela metodologia qRT-PCR para o gênero Flavivírus	410 amostras de soro com febre aguda negativas para DENG por RT-PCR	DENG	qRT-PCR é mais sensível e específico que a PCR tradicional, além de permitir a quantificação do vírus. Não houve amplificação de outros Flavivírus, indicando que não há reação cruzada
19	Desenvolver e avaliar métodos sorológicos para diagnóstico e pesquisa de CHIK na Nicarágua	260 amostras de soro na fase aguda e convalescente	CHIK	qRT-PCR foi utilizado como <i>gold standard</i> . Sete amostras positivas em PCR foram negativas para a sorologia; quatro amostras negativas em PCR e positivas para sorologia podem indicar reação cruzada da sorologia. Baixa sensibilidade da sorologia na fase aguda, sendo alta para o PCR nessa mesma fase
20	Relatar a detecção de DENG e VZIC em um doador de sangue pré-sintomático, por qRT-PCR, em Ribeirão Preto, São Paulo	Uma amostra de sangue (plasma) de doador	DENG VZIC	Deteção de infecção pelo VZIC simultaneamente à infecção por DENG. Foram encontrados no mesmo plasma de doador sanguíneo 13 milhões cópias/ml de VZIC e 5 milhões cópias/ml de DENG-4

DENG: dengue; OROV: oropouche vírus; CHIK: chikungunya; MAYV: mayaro vírus; VZIC: vírus da zica; RT-LAMP: amplificação isotérmica mediada por alça com transcrição reversa; qRT-PCR: reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase; CDC: Centro de Controle de Prevenção de Doenças; IgM: imunoglobulina da classe M; RT-RPA: reação da polimerase de transcriptase reversa; RNA: ácido ribonucleico; LCR: líquido cefalorraquidiano.

TABELA 3 – Eficácia dos ensaios de PCR tempo real, realizados nos artigos selecionados na revisão integrativa

Artigo	Sensibilidade	Limite de detecção	Especificidade	Valor de <i>cut-off</i>	Diferenciação entre vírus	Reação cruzada
1	AS	NI	AE	NI	Sim	Não
2	NI	10 cp/ensaio	NI	< 35	Sim	Não
3	AS	10 cp/ensaio	AE	< 20,96	Sim	Não
4	98,4%	19,6 cp/ensaio	100%	< 37	Sim	Não
5	AS	NI	AE	< 36	Sim	Não
6	NI	NI	NI	< 38	NI	NI
7	AS	NI	AE	NI	Sim	Não
8	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	AS	10 cp/ensaio	AE	NI	Sim	Não
10	AS	5,3 cp/ensaio	AE	NI	NI	NI
11	100%	80 cp/ensaio	100%	< 36	Sim	Não
12	AS	100 cp/ml	AE	< 40	Sim	Não
13	90,5%	100 cp/ml	100%	NI	Sim	Não

Cont. →

→ *Cont.*

14	94,4%-98%	10 cp/µl	100%	< 38	Sim	Não
15	AS	NI	AE	NI	NI	NI
16	NI	NI	NI	NI	Sim	NI
17	NI	NI	NI	< 39	Sim	NI
18	AS	100 cp/ml	AE	NI	Sim	Não
19	NI	NI	NI	NI	Sim	Não
20	NI	NI	NI	NI	Sim	Não

PCR: reação em cadeia da polimerase; AS: alta sensibilidade (valor numérico não informado); NI: não informado; AE: alta especificidade (valor numérico não informado); cp: cópias de vírus.

As arboviroses foram muito debatidas no Brasil devido à ocorrência de surtos de VZIC e CHIK em 2015 e a recorrência de DENG por vários anos. Houve poucas publicações sobre o diagnóstico das arboviroses entre os anos de 2014 e 2015, antes do surto, e entre 2018 e 2019, pós-surto. A maioria das publicações foi entre 2016 e 2017. Também foi possível verificar que os artigos de estudos transversais são maioria, o que caracteriza a predominância de artigos observacionais.

Entre os arbovírus, destacam-se os gêneros Flavivírus (DENG, VZIC e FA) e os Alphavírus (CHIK) como os patógenos causadores de doença febril aguda, com a evolução para complicações hemorrágicas ou febris neurológicas⁽¹²⁾. Por serem cocirculantes em uma mesma área geográfica, o diagnóstico diferencial é ainda mais difícil⁽¹³⁾. As consequências dessa cocirculação ainda não são totalmente conhecidas e podem ser um fator de piora na evolução das infecções⁽¹²⁾. Há relatos de coinfeção em um mesmo paciente de DENG-VZIC, DENG-CHIK ou VZIC-CHIK⁽¹⁴⁾.

Além dos casos de coinfeção, há uma preocupação com a reinfeção, principalmente nos casos de DENG. Dentre as arboviroses, ela é a doença com maior número de casos e maior severidade em morbidade e mortalidade. O vírus possui quatro sorotipos, e cada um deles pode causar uma infecção distinta⁽¹⁾. A cada reinfeção por um sorotipo distinto, os anticorpos não são capazes de neutralizar o vírus e causam a amplificação da doença mediada por anticorpos [realce de anticorpos dependentes (ADE)]^(12, 15). Portanto, uma segunda infecção pela DENG é ainda mais grave que a primeira, com alta viremia e vários marcadores inflamatórios liberados na corrente sanguínea⁽¹²⁾.

Muitas pesquisas concentram-se em identificar se, como no caso de uma reinfeção por DENV, a cocirculação e a coinfeção com ZIKV pode causar a ADE em infecções secundárias por este patógeno⁽¹⁶⁾. Há muitas semelhanças entre DENG e VZIC, o que causa grande número de reações cruzadas nos anticorpos. Alguns pesquisadores aventaram a possibilidade de o VZIC ser um quinto sorotipo da DENG⁽¹⁷⁾, visto que a sequência genética da proteína E deles é compartilhada na proporção entre 54% a 59%⁽¹⁵⁾. Stettler

et al. (2016)⁽¹⁸⁾ mostraram que houve reação cruzada do sistema imune entre uma infecção prévia de DENG com uma infecção secundária de VZIC nos anticorpos contra o envelope viral nos domínios I e II (EDI/II), causando uma neutralização baixa do VZIC.

Duas publicações referem-se a coinfeções. Uma delas relata o caso de uma mulher de 28 anos que foi diagnosticada com coinfeção por DENG e CHIK, em Fortaleza, Ceará, Brasil. Foi comprovada uma complicação hematológica severa em decorrência da coinfeção; inicialmente, a paciente apresentou apenas os sintomas inespecíficos das arboviroses (febre, mialgia e artralgia). Ela desenvolveu púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) adquirida, uma trombocitopenia mediada por anticorpos, uma complicação grave da infecção por CHIK⁽¹⁹⁾. A outra publicação, de 2019, relata o caso de uma doadora de sangue pré-sintomática. Três dias após a doação, ela apresentou sintomas característicos e retornou ao local onde fez o procedimento. Em investigação, foram detectados RNA de VZIC e DENG, simultaneamente, no plasma do sangue coletado durante a doação⁽²⁰⁾.

Os artigos selecionados na presente revisão integrativa apresentaram os seguintes objetivos: desenvolvimento de produtos, análise comparativa entre metodologias e, em menor frequência, revisão de estudos sobre diagnóstico de arboviroses. Em 20% deles, houve a pesquisa dos três vírus de maior importância epidemiológica das arboviroses, conforme visto na Tabela 2. O artigo 12 identificou 2,6% de casos de coinfeção de VZIC-DENG em um hospital de Recife, Brasil, durante o surto de 2015, realçando a necessidade de diferenciação entre os vírus para melhoria de controles sanitários.

A importância do diagnóstico das arboviroses não se restringe apenas em diferenciar qual agente é o causador da infecção; essa análise também é crucial nos estudos de investigação de casos graves das doenças, como nas associações entre VZIC e distúrbios neurológicos. Além disso, o diagnóstico é essencial nos estudos de soroprevalência e vigilância de novas epidemias⁽¹⁷⁾, bem como nas rotas alternativas de transmissão⁽²¹⁾.

O diagnóstico molecular de arboviroses é uma ferramenta bastante utilizada no estágio agudo da infecção, no qual a viremia está no ápice. Há várias metodologias de pesquisa direta do patógeno, e a técnica de PCR em tempo real demonstra muitas vantagens em comparação com as demais disponíveis no mercado. Isso ocorre devido à facilidade de execução da metodologia, ao menor valor de reagentes e equipamentos e ao menor risco de contaminação, tanto do operador quanto da amostra⁽⁹⁾.

A técnica de PCR em tempo real é uma variação da PCR tradicional; utiliza sondas fluorescentes que monitoram a amplificação do material genético durante toda a reação. É desse processo que se denomina de tempo real, visto que a amplificação e a quantificação ocorrem simultaneamente⁽²²⁾. É uma técnica rápida, específica e sensível que pode detectar mais de um patógeno em uma mesma reação (*multiplex* qPCR), basta haver diferentes corantes fluorescentes entre os reagentes⁽²³⁾.

Os *primers* utilizados para a amplificação são projetados de acordo com o patógeno que se deseja pesquisar. O desenvolvimento desses *primers* com o auxílio da bioinformática tem aumentado a sensibilidade e a especificidade dos reagentes. Isso se deve à maior identificação de regiões genômicas dos patógenos, diferenciando-os dos demais indivíduos de sua família ou gênero⁽²³⁾.

Os parâmetros utilizados para a determinação de eficácia de um ensaio são sensibilidade e especificidade. A sensibilidade diz respeito ao teste ser verdadeiramente positivo, ou seja, quando o indivíduo realmente possui a doença pesquisada e o teste resulta em positivo. A especificidade relaciona-se ao fato de o teste ser verdadeiramente negativo quando não há doença e o resultado é negativo. A baixa sensibilidade de um ensaio produz resultados falso negativos, e a baixa especificidade, resultados falso positivos⁽²⁴⁾.

O limite de detecção e a ocorrência de reações cruzadas são derivados desses parâmetros. O primeiro parâmetro refere-se

à mínima quantidade de um analito, neste caso, o RNA viral – capaz de detectar uma determinada amostra. Os artigos analisados mostraram que a técnica de PCR em tempo real é bastante sensível. Para cada detecção de genes [ácido desoxirribonucleico (DNA)] ou de expressão gênica (RNA), há um limite de detecção que é variável entre menos de 100 a 5,3 cópias/ensaio de amostra; esta última quantidade é considerada muito baixa e limítrofe na detecção de RNA viral⁽²⁵⁾.

Os *primers* de PCR em tempo real são desenhados de acordo com o genoma do vírus em pesquisa. Na diferenciação entre os vírus, há o uso de reagentes fluorescentes distintos nos *primers* diferentes, evidenciando cada um dos vírus. Nas reações cruzadas, os *primers* se ligam em regiões diferentes dos vírus, permitindo a distinção entre vírus filogeneticamente semelhantes, como nos casos do VZIC e da DENG.

CONCLUSÃO

A metodologia de PCR em tempo real é eficaz no diagnóstico das arboviroses. Ela é capaz de diferenciar os vírus da DENG, do VZIC e da CHIK, com baixa ocorrência de reações cruzadas e baixa reação inespecífica. Além disso, a técnica é capaz de identificar o patógeno mesmo em baixa viremia, o que é importante para o diagnóstico precoce da doença. O diagnóstico é rápido, sensível e específico, o que a torna uma ferramenta diagnóstica de alta confiabilidade.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – processo número 201810267000572.

REFERÊNCIAS

1. Vasudevan RS. Dengue and zika: control and antiviral treatment strategies [Internet]. Vol. 1062. 2018. Disponível em: <http://www.springer.com/series/5584>.
2. Lorenz C, Aguiar BS, Azevedo TS, Chiaravalloti Neto F, Suesdek L. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 1-19.
3. Li X, Gao X, Fu S, et al. Arboviruses and their related infections in China: a comprehensive field and laboratory investigation over the last 3 decades. *Rev Med Virol*. 2017; 1-21.
4. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2014; 5(3): 55-64. Disponível em: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
5. Alva-Urcia C, Aguilar-Luis MA, Palomares-Reyes C, et al. Emerging and reemerging arboviruses: a new threat in Eastern Peru. *PLoS One*. 2017; 12(11): 1-13.

6. Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, Lamballerie X. Emerging arboviruses: why today? 2017; 4(June): 1-13.
7. Edwards T, del Carmen Castillo Signor L, Williams C, et al. Analytical and clinical performance of a Chikungunya qRT-PCR for Central and South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2017; 89(1): 35-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.001>.
8. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic *Leptospira* genomes using a multiplex TaqMan[®] assay. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 1-10.
9. Romeiro MF, de Souza WM, Tolardo AL, et al. Evaluation and optimization of SYBR green real-time reverse transcription polymerase chain reaction as a tool for diagnosis of the flavivirus genus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(3): 279-85.
10. Hu SF, Li M, Zhong LL, et al. Development of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1-4. *BMC Microbiol* [Internet]. 2015; 15(1): 1-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0595-1>.
11. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005; 5(2): 209-19.
12. Donalisio MR, Freitas ARR, Freitas R, Von Zuben APB. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Rev Saúde Pública*. 2017; 51: 30.
13. Giry C, Roquebert B, Li-Pat-Yuen G, Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan[®] assay. *BMC Microbiol*. 2017; 17(1): 1-9.
14. Chaves BA, Orfano AS, Nogueira PM, et al. Coinfection with zika virus (ZIKV) and dengue virus results in preferential ZIKV transmission by vector bite to vertebrate host. 2018; 218: 563-71.
15. Roth C, Delgado FG, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A. Immune responses to dengue and Zika viroses — guidance for T cell vaccine development. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2018; 15(2): 1-12. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/2/385>.
16. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol* [Internet]. 2017; 89(8): 1477-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.24789>.
17. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017; 201704984. Disponível em: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1704984114>.
18. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301): 823-6.
19. Bastos MLA, Araújo RMO, Oliveira DS, Cavalcante ANM, Júnior GBS. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with dengue and chikungunya virus coinfection: case report during an epidemic period. [Internet]. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2018; 1-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2018.05.003>.
20. Slavov S, Ferreira F, Rodrigues E, Gomes R, Covas D, Kashima S. Simultaneous zika and dengue serotype-4 viral detection and isolation from a donor plasma unit. *J Vector Borne Dis*. 2019; 56(2): 166-9.
21. Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus. *Bull World Health Organ*. 2016; 94(12): 880-92.
22. Kim T, Vo D, Bigot P, et al. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travellers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007; 101(5): 422-8.
23. Nunes ARD, Alves BEB, Pereira HWB, et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(5): 1-9.
24. Kawamura T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. Eficiência de um teste. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 79(2): 437-41.
25. Esposito DLA, Fonseca BAL. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(4): 465-9.

AUTOR CORRESPONDENTE

Christiane Oliveira Lima Licínio  0000-0003-3114-4595
 e-mail: chrislima28@hotmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.