

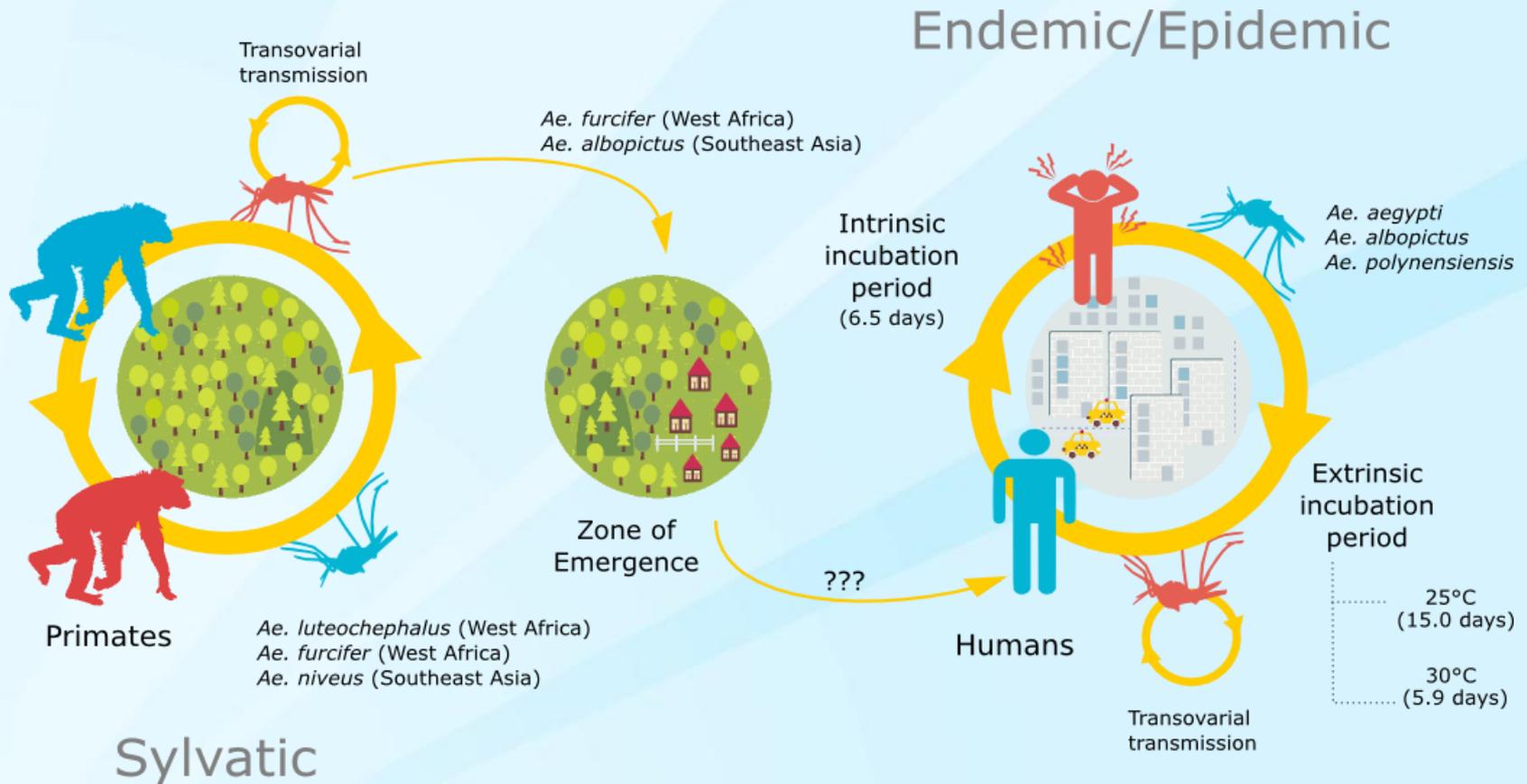
# Diagnóstico de Zika vírus.



**Prof. Dr. Edison Luiz Durigon**  
**Departamento de Microbiologia**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Universidade de São Paulo.**



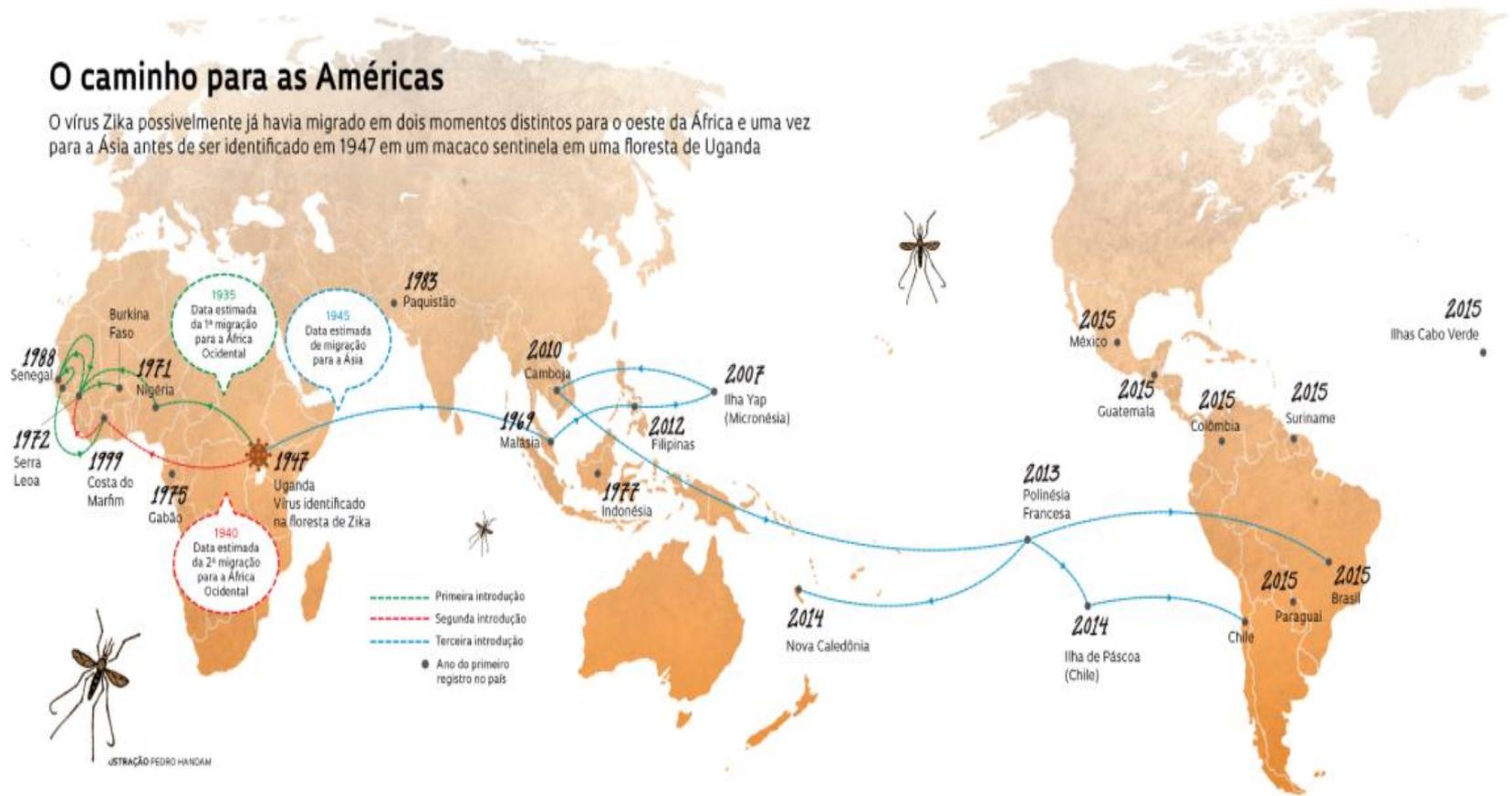
# Diagnóstico de Zika vírus.



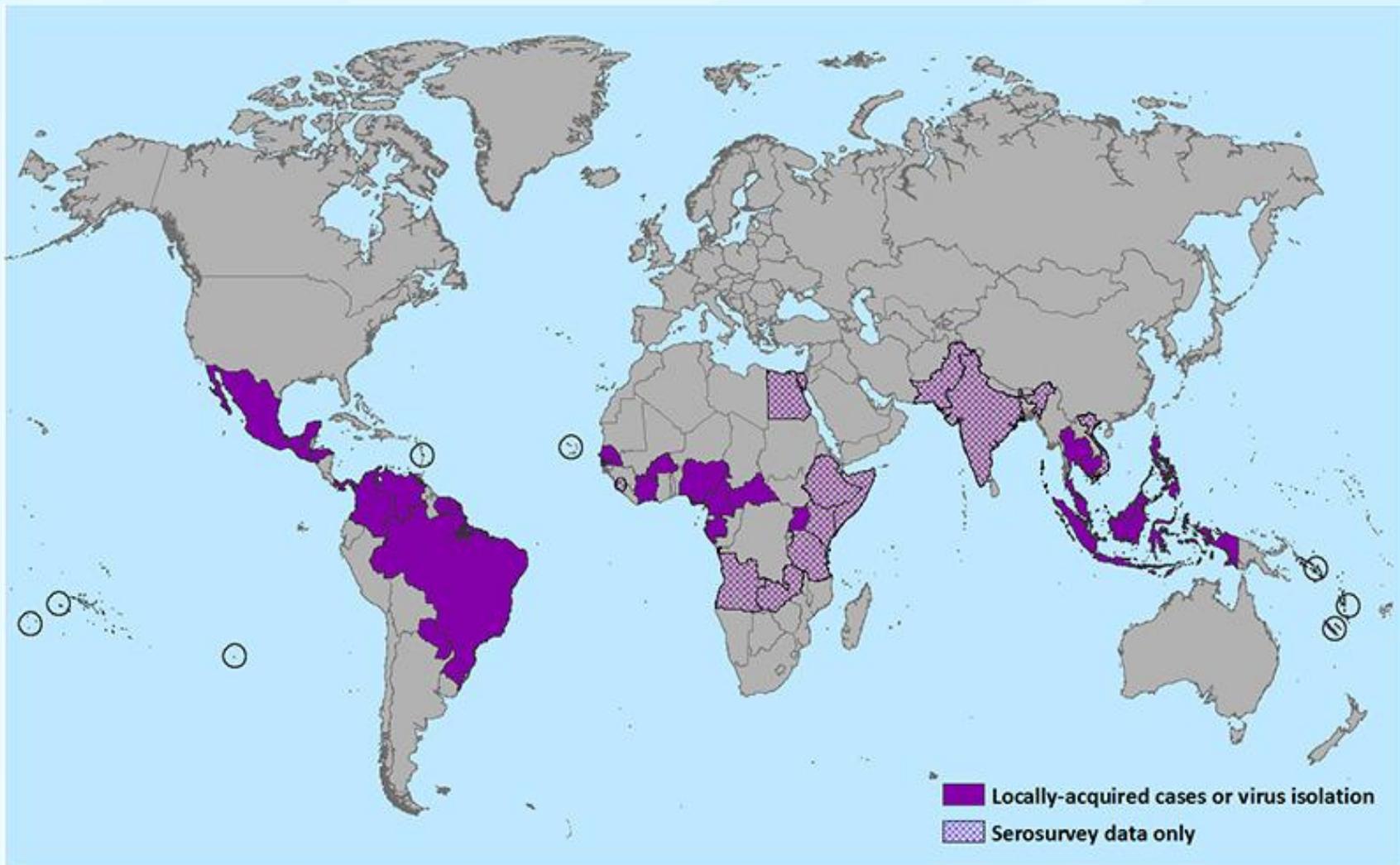
# A Epidemia de Zika no Mundo.

## O caminho para as Américas

O vírus Zika possivelmente já havia migrado em dois momentos distintos para o oeste da África e uma vez para a Ásia antes de ser identificado em 1947 em um macaco sentinela em uma floresta de Uganda



Países com evidência passada ou até março de 2016 com transmissão do Zika vírus.



# Países com transmissão de Zika vírus por picada de mosquito.

25/09/2016.



Este mapa não inclui Países ou territórios que tenham reportado somente casos associados a viajantes e também não incluem países ou territórios com transmissão passada de ZIKV.

Mosquito Transmissor da Zika: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*



# Infecção por Zika vírus

- Exantema “Rash”



19 photos: Zika virus outbreak

Angelica Prato, a pregnant woman infected by the Zika virus, receives medical attention at a hospital in Cucuta, Colombia, on January 25.



- Microcefalia



## Hiperemia Conjuntival



# Doenças Causadas pelo Aedes no Brasil

## Variações sutis

Alguns sinais clínicos ajudam a distinguir a infecção causada pelo Zika de dengue e *chikungunya*

Sintomas	DENGUE	ZIKA	CHIKUNGUNYA
Febre	Superior a 38°C por 4 a 7 dias	Ausente ou até 38°C por 1 a 2 dias	Superior a 38°C por 2 a 3 dias
Manchas vermelhas na pele (exantema)	Surgem a partir do quarto dia em 30% a 50% dos casos	Surgem no primeiro ou segundo dia em mais de 90% dos casos	Surgem entre o segundo e o quinto dia em 50% dos casos
Dor nos músculos	Muito frequente	Frequente	Pouco frequente
Dor nas articulações	Pouco frequente e leve	Frequente e de leve a moderada	Muito frequente e de moderada a intensa
Inchaço nas articulações	Raro	Frequente e leve	Frequente e de moderado a intenso
Conjuntivite	Rara	Ocorre em 50% a 90% dos casos	Ocorre em 30% dos casos
Cefaleia	Muito frequente e muito intensa	Frequente e de intensidade moderada	Frequente e de intensidade moderada
Coceira	Leve	Moderada a intensa	Leve
Hipertrofia dos gânglios	Leve	Intensa	Moderada
Tendência a sangramento	Moderada	Ausente	Leve
Acometimento neurológico	Raro	Mais frequente do que em dengue e <i>chikungunya</i>	Raro (ocorre principalmente em recém-nascidos)

FONTE: CARLOS BRITO/UFPE – IN PROTOCOLO DE VIGILÂNCIA E RESPOSTA À OCORRÊNCIA DE MICROCEFALIA RELACIONADA À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA, 2015

- Microcefalia notificados no Brasil suspeita de Zika: 3.680 casos
- Microcefalia confirmado por Teste Laboratorial para Zika : 464 casos



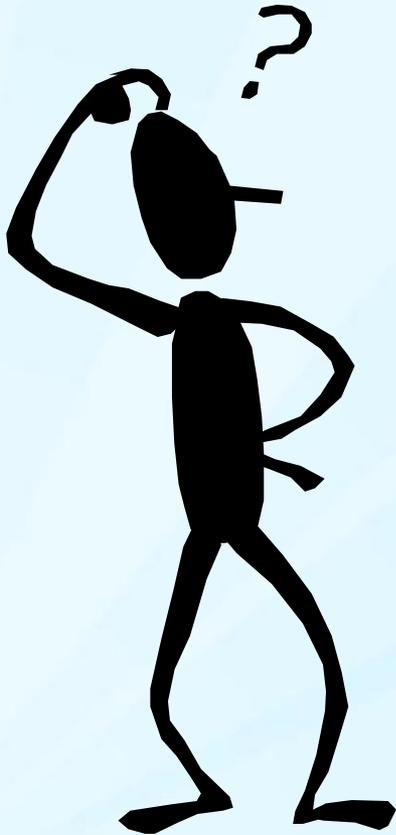
**19 photos:** Zika virus outbreak

Alice Vitoria Gomes Bezerra, a 3-month-old baby with microcephaly, is placed in her crib by her father Wednesday, January 27, in Recife.

# Diagnóstico de Zika Vírus: O que desejamos e o que temos.



# E o que o Brasil esta Fazendo?



# Fazendo Piadas ? Do Jeitinho Brasileiro



# O BRASIL ESTA DANDO EXEMPLO PARA O MUNDO

- Brasil esta Lutando contra a Epidemia de Zika
- Controle de Vetores : Matando Mosquito



# Larvas de Aedes aegypti em Agua Represada



**19 photos:** Zika virus outbreak

The larvae of *Aedes aegypti* mosquitoes are photographed in a lab in Cali, Colombia, on January 25. Scientists are studying the mosquitoes to control their reproduction and resistance to insecticides.

# Larva de *Aedes aegypti* em Caixa de Água



**19 photos:** Zika virus outbreak

A Brazilian soldier inspects a home in Recife on Monday, January 25, while canvassing the neighborhood and attempting to eradicate the larvae of mosquitoes linked to the virus.

# Pesquisa sobre casos de Microcefalia na FIOCRUZ de Recife



**19 photos:** Zika virus outbreak

Dr. Angela Rocha shows brain scans of a baby born with microcephaly at the Oswaldo Cruz Hospital in Recife on Thursday, January 28.

# Pesquisas no Combate ao Aedes aegypti no ICB da USP em São Paulo.



**19 photos:** Zika virus outbreak

Aedes aegypti mosquitos are seen at the University of Sao Paulo on January 8. Researchers from the Pasteur Institute in Dakar, Senegal, came to Brazil to train local researchers to combat the Zika virus epidemic.

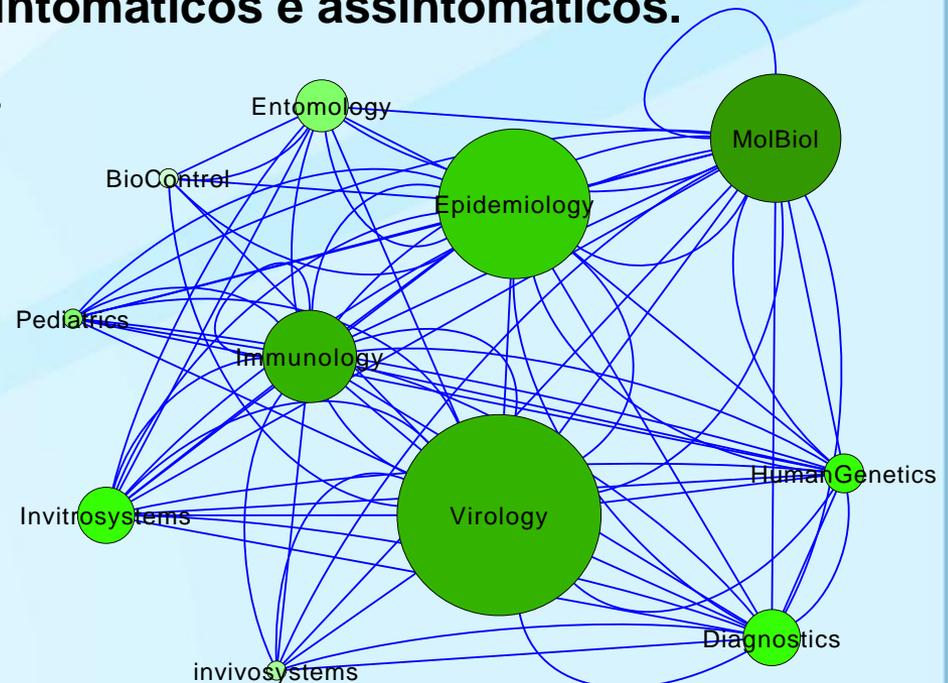
# Desenvolvimento de Novos Métodos de Diagnóstico no ICB - USP

## 1. Detecção do Vírus em Pacientes – Sintomáticos

- Teste de PCR em tempo Real.
- Cultura de Célula de material Clínico.
- Imunofluorescência (IF) de material clínico e cultura de célula.
- Microscopia Eletrônica de material clínico

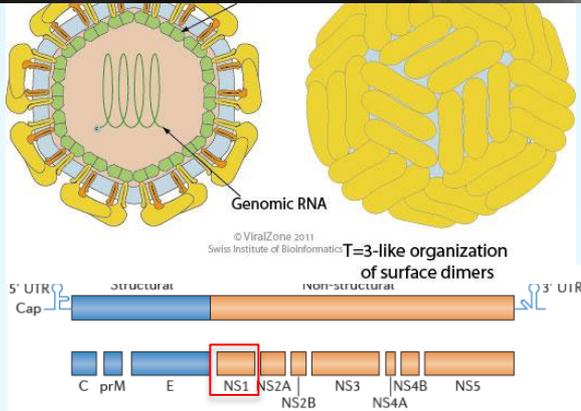
## 1. Exame sorológico – Pacientes sintomáticos e assintomáticos.

- IgG  
Teste de ELISA e teste de IF
- IgM  
Teste de ELISA e teste de IF.

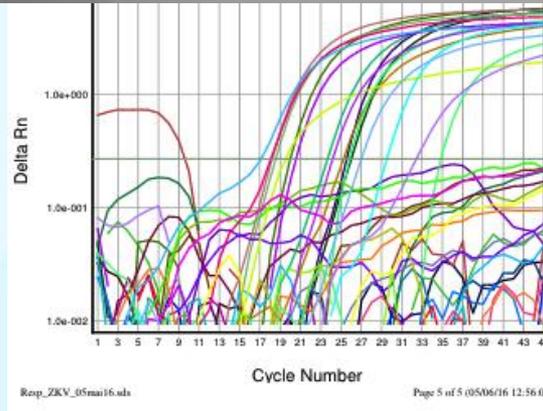


V. B. Silveira<sup>1</sup>, F. S. Mesquita<sup>1</sup>, L. M. Thomazelli<sup>1</sup>, E. A. Mendes<sup>1</sup>, S. R. Melo<sup>1</sup>, E. L. Durigon<sup>1</sup>, D. B. L. Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Clinical and Molecular Virology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil.



Primer utilizado: Lanciotte et al., 2008.

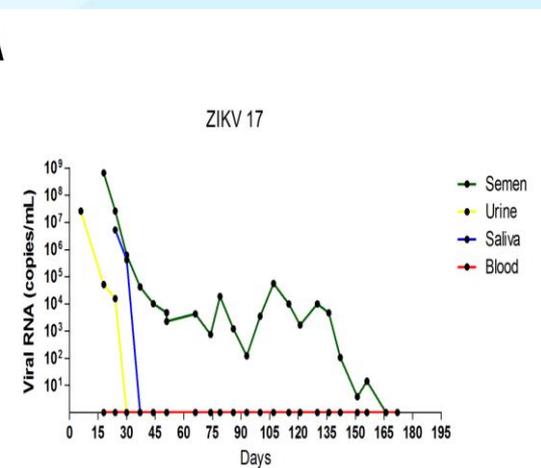


## Desafios:

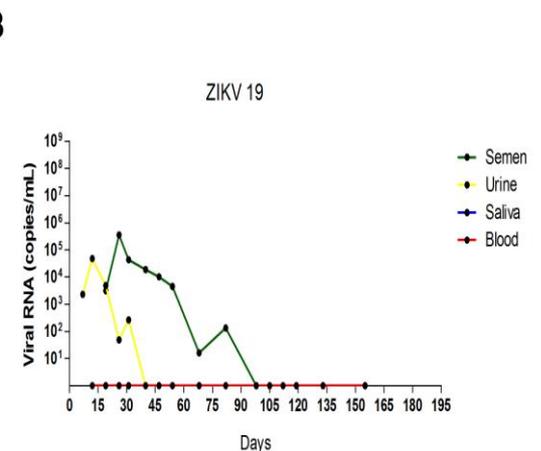
1. Amostra a ser testada: Urina, Saliva, soro e semen.
2. Tipo de extração: Coluna, Trizol ou Silica magnética
3. Quantidade de amostra: +/- Inibição de qPCR
4. Quantificação em números de cópias:
  - Plasmídeo proibido em lab. de diagnóstico.

Resultado: 400µl de urina, soro e saliva  
100µl de semen

A



B



# Detecção do Vírus em Pacientes – Sintomáticos



## COMPARISON OF CYTOPATHIC EFFECT OF ZIKA VIRUS INFECTION IN C6/36 AND VERO CELL LINES BY QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION-PCR, PLAQUE TITRATION AND INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY

E. A. Mendes<sup>1</sup>, D. B. Araujo<sup>1</sup>, S. R. Melo<sup>1</sup>, C. T. Branconi<sup>1</sup>, **F. S. Mesquita<sup>1</sup>**, P. Zanotto<sup>1</sup>, V. Botosso<sup>2</sup>, S. R. Favoretto<sup>1</sup>, E. L. Durigon<sup>1</sup>, D. B. L. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Scientific Development Division, Virology Branch, Institute Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

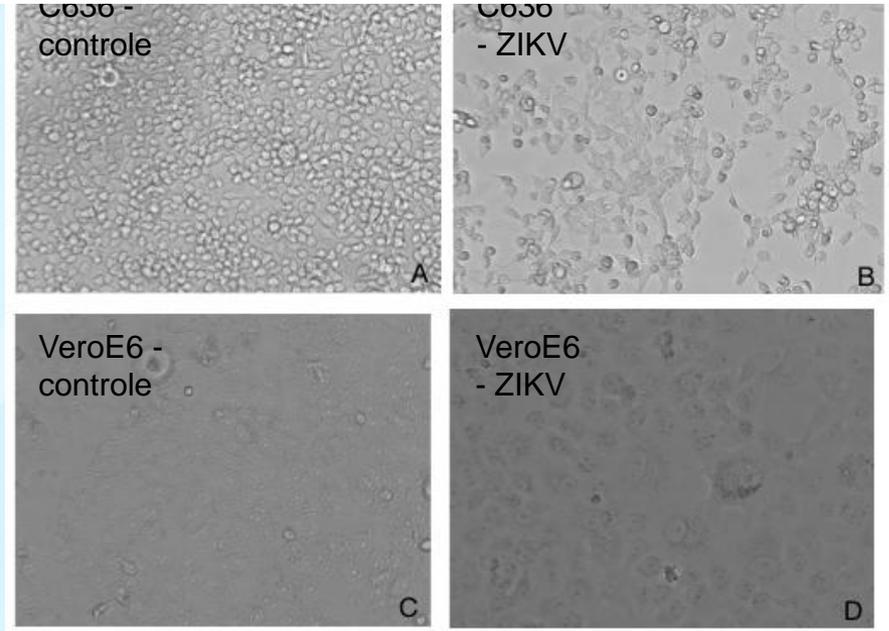


### QUESTÕES:

1. O material Biológico contém vírus infectante?
2. Quanto de material se deve inocular?
3. Como saber se houve replicação? ECP? Ct? ou ambos?
4. Qual a melhor célula e o melhor fluido corpóreo?

### Resultado:

1. Manutenção celular: L15 + ANE (1%), PVNa (1%), SFB (10 ou 5%)
2. Infecção viral:
  - L15 puro e Adsorção de 1h
  - L15 + ANE (0,5%), PvNa (0,5%), SFB (2%) por 12 dias.



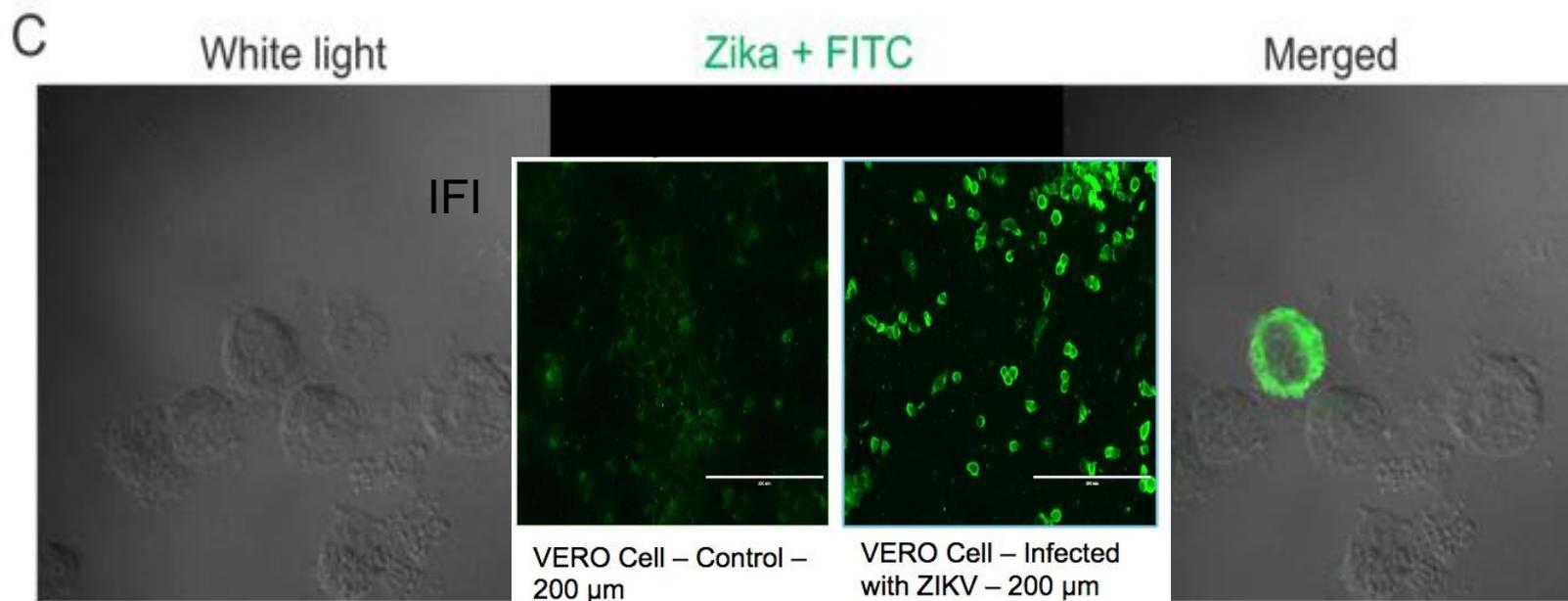
C6/36 Cell subculture	Titer (PFU/ml)	Cycle Threshold (RT-qPCR)
T1	6x10 <sup>8</sup>	17.26
T2	7,5x10 <sup>6</sup>	15.5
T3	4x10 <sup>12</sup>	9.52
VERO Cell subculture	Titer (PFU/ml)	Cycle Threshold (RT-qPCR)
T1	9,5x10 <sup>4</sup>	20
T2	3x10 <sup>4</sup>	19.89
T3	2x10 <sup>4</sup>	14.17

Comparação da titulação da amostra crescida em C636 e VeroE6.

# Detecção do Vírus em Pacientes – Sintomáticos

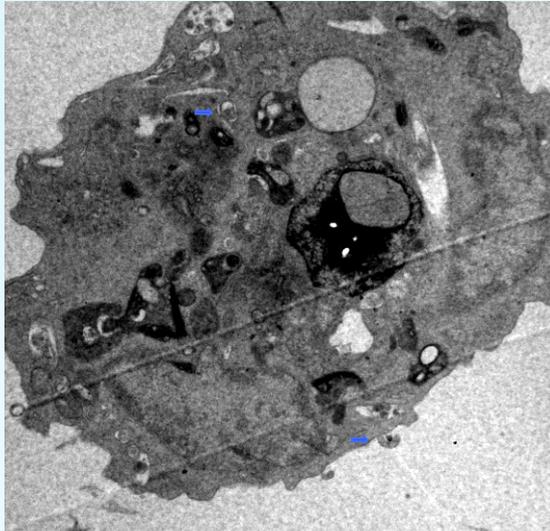
## Imunofluorescência (IF) de material clínico e cultura de célula.

Co-focal



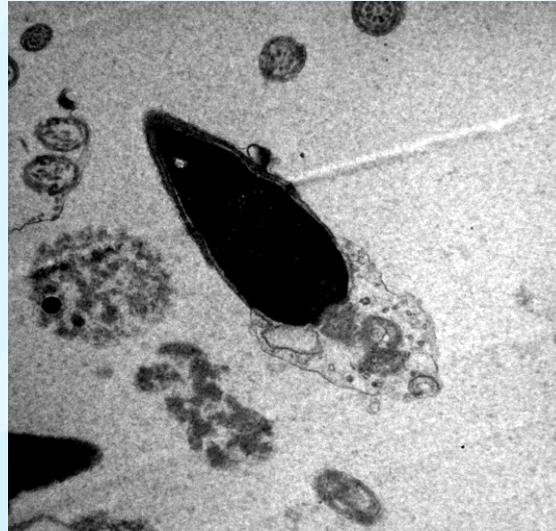
# Detecção do Vírus em Pacientes – Sintomáticos

## Microscopia Eletrônica de material clínico



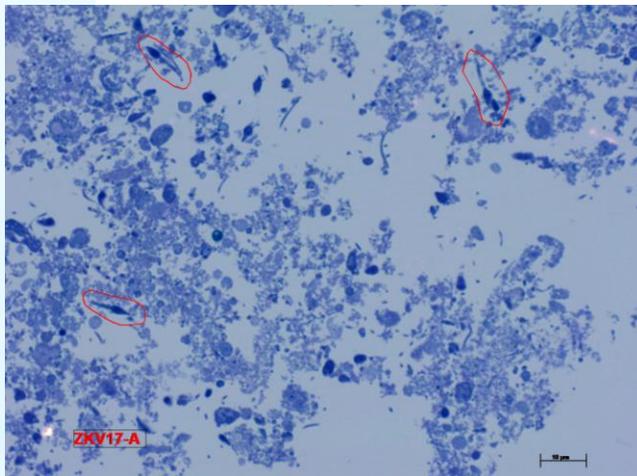
File Name = ZKV-2 - 02.tif  
Print Mag = 70313x @ 150 mm  
Acquired Sep 21 2016 at 11:03 AM

500 nm  
TEM Mag = 10000x  
AMT Preferred Customer

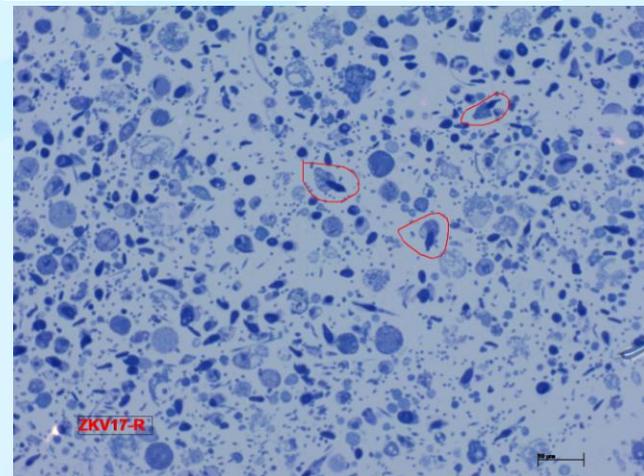


File Name = ZKV-2 - 06.tif  
Print Mag = 105469x @ 150 mm  
Acquired Sep 21 2016 at 11:40 AM

100 nm  
TEM Mag = 15000x  
AMT Preferred Customer



ZKV17-A

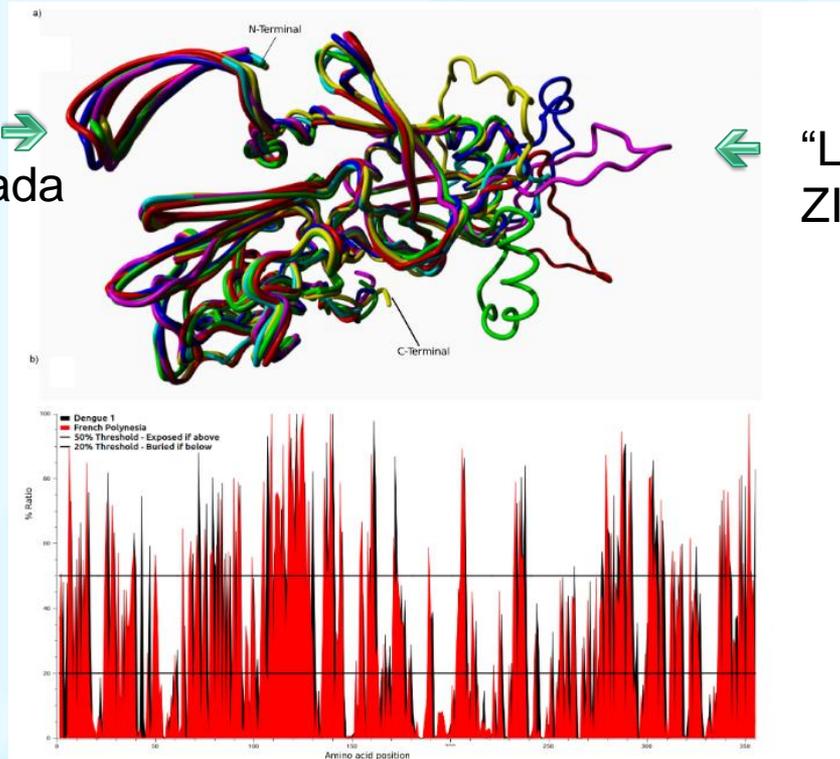


ZKV17-R



# Desenvolvimento de teste sorológico baseado na proteína NS1

Imunidade cruzada na estrutura conservada do domínio →

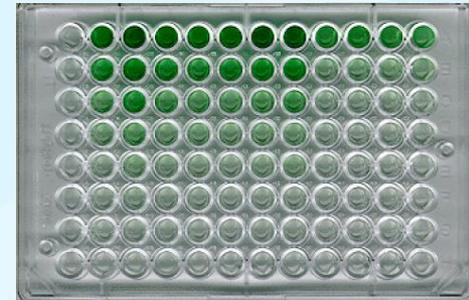


← “Loop” específico para ZIKV.

**Figure S5. Structural alignment of the ZIKV and DENV NS1 protein models and solvent accessible area surface comparison (SASA).** A) DENV reference sequences (GenBank accession numbers: AGN94879, AGN94890, ABV03585 and AFX65881), and ZIKV strains from Senegal and French (GenBank accession numbers: AEN75266.1 and AHZ13508) structural alignment. DENV 1 NS1 model was color-coded in green, DENV 2 NS1 model in cyan, DENV 3 NS1 model in magenta, DENV 4 NS1 model in gray. ZIKV NS1 model from Senegal was color-coded in red and ZIKV NS1 model from the French Polynesia was color-coded in blue. b) Reference sequences used for homology modeling generated coordinate PDB files that were evaluated for SASA at the GETAREA website.

# *Zika Virus NS1 ELISA*

*Luis Carlos Ferreira Team: Rubens, Robert, Lennon*



Cor do Substrato



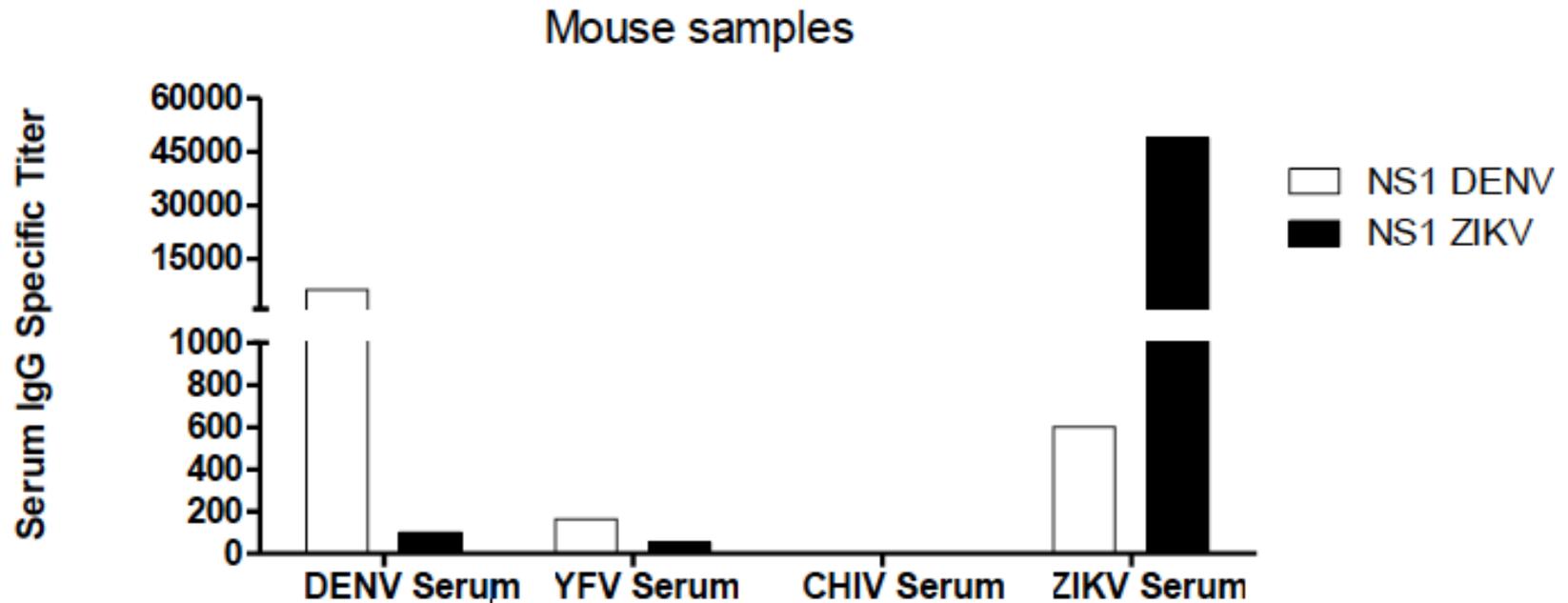
Conjugado anti-Human IgG or IgM

Sero do paciente (IgG or IgM)

Viral Antigen Delta-NS1

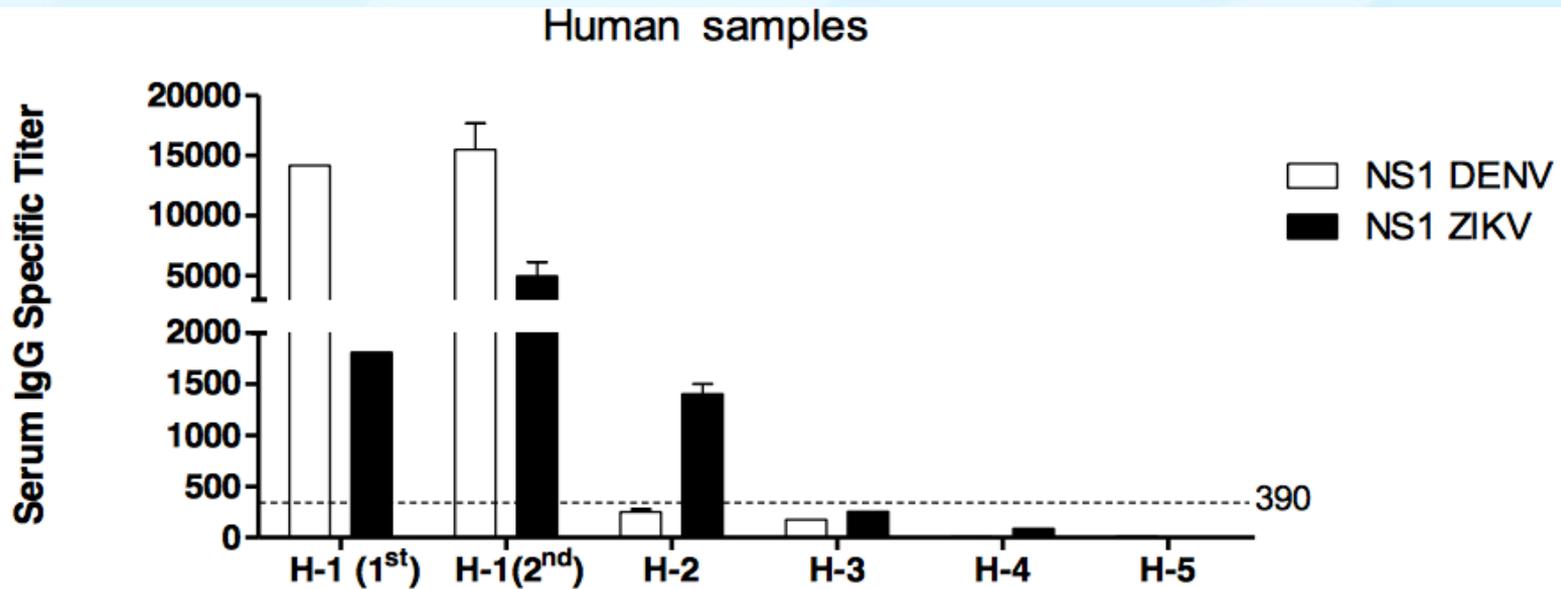
Solid-phase

## ELISA em soro de camundongo usando a proteína recombinante NS1-ZIKV.



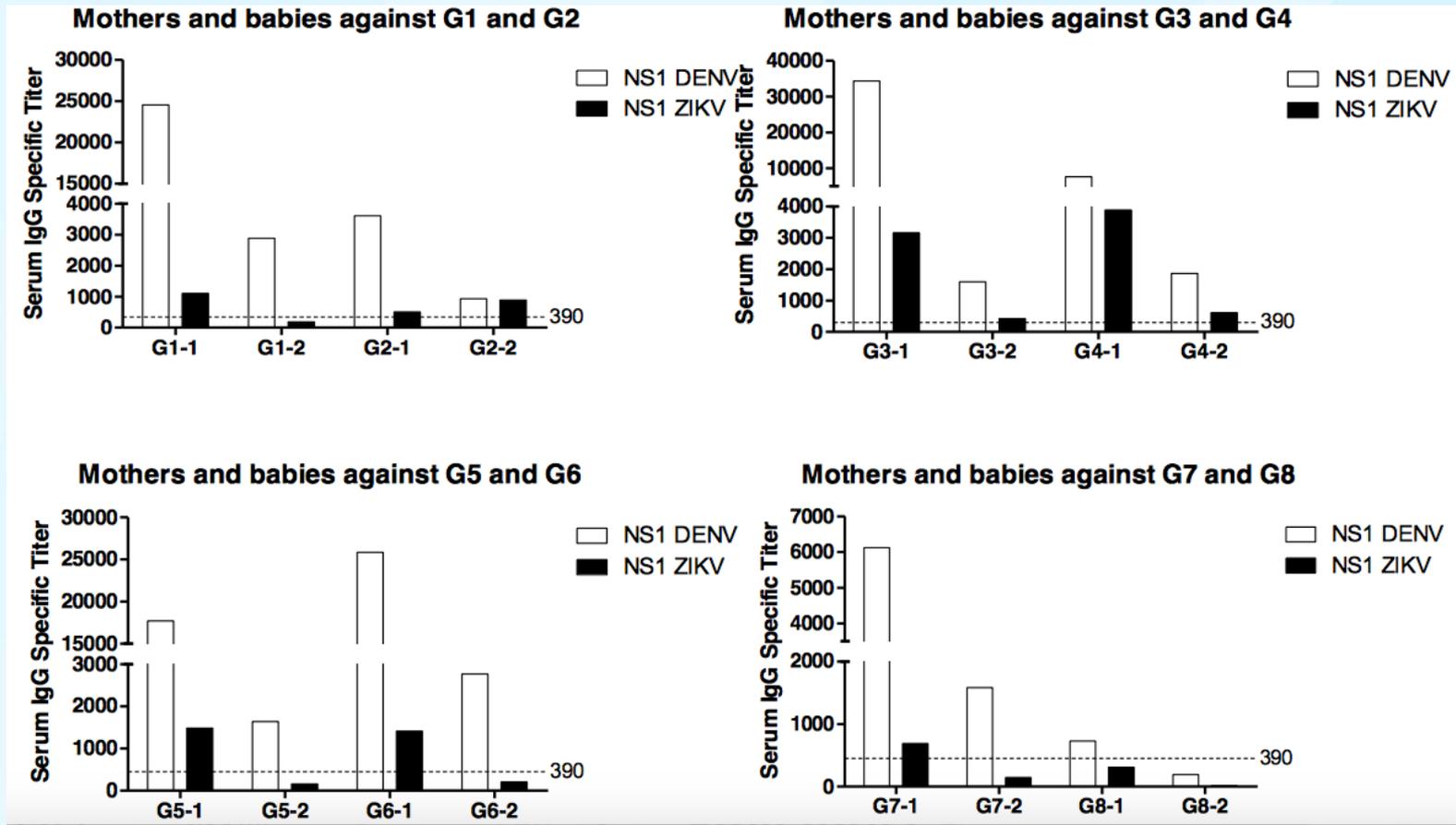
**Figura 1. Validação do reconhecimento específico da proteína NS1 de ZIKV.** Para tal objetivo foram realizados ensaios ELISAS com diferentes soros de camundongos, específicos para um único arbovírus (DENV, YFV, CHIV, ZIKV), contra as proteínas NS1 de DENV2-NGC e NS1 de ZIKV. Pode-se observar no gráfico (com escala em log), que não houve reconhecimento cruzado significativo entre os soros em relação à proteína NS1.

## Amostra de soro Humano testado por ELISA com a proteína recombinante NS1-ZIKV.



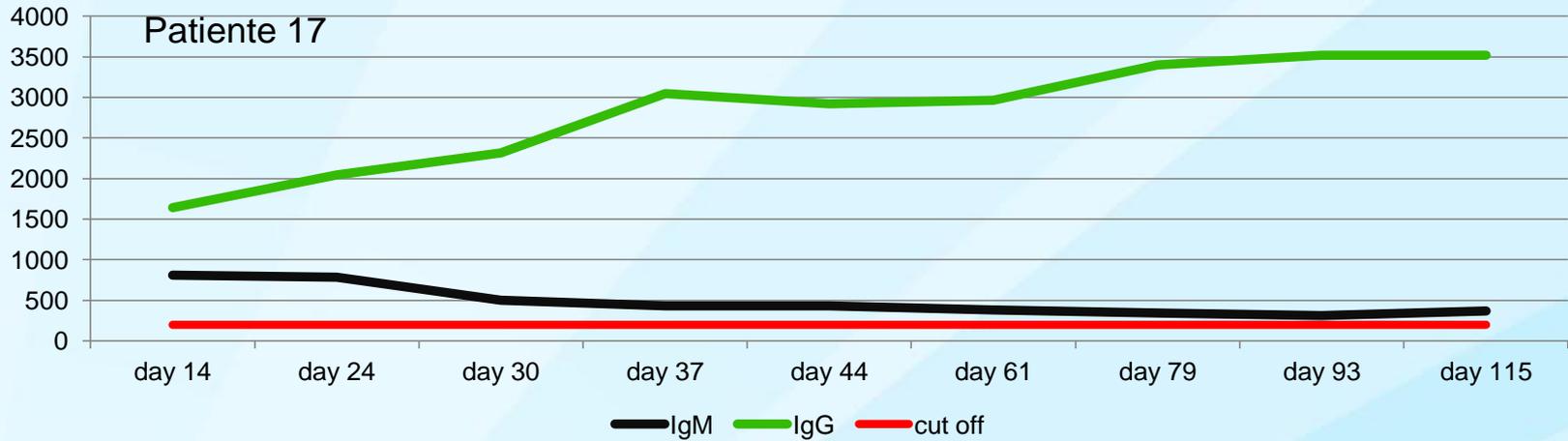
**Figura 3. Utilização do Cut Off de ZIKV para diferenciação de amostras IgG anti-ZIKV positivas.** Para tal objetivo ensaios de ELISA foram realizados com diferentes amostras de soro humano, positivos ou negativos para DENV2. Como antígenos de fase sólida, para este ensaio, foram empregadas as proteínas NS1-DENV2-NGC e NS1-ZIKV. Como é possível observar no gráfico acima, não houve reconhecimento cruzado significativo entre as amostras testadas e a proteína NS1-ZIKV. Para a paciente H-1 foram realizadas duas coletas de soro, a primeira após 5 dias do surgimento de sintomas característicos de infecção por ZIKV e a segunda após 5 dias após a primeira coleta. Somente as amostras H-1 e H-2 foram consideradas positivas para IgG ZIKV específico.

# Aplicação diagnóstica dos ensaios de ELISA empregando a proteína NS1-ZIKV.



**Fig 2.** Para tal objetivo ensaios de ELISA foram realizados com diferentes amostras de soro humano suspeitos de infecção por ZIKV. As amostras são provenientes de mulheres que apresentaram sintomas característicos de infecção por ZIKV durante a gestação (amostras “1” de cada grupo) e tiveram filhos microcefálicos. Amostras de soro dos bebês com microcefalia também foram testadas nas mesmas condições (amostras “2” de cada grupo). Como é possível observar no gráfico acima, os soros de todas as mulheres reagiram positivamente para NS1-DENV2-NGC e NS1-ZIKV, exceto o soro da paciente G8- 1. As amostras oriundas dos bebês também se apresentaram positivas para NS1-DENV2- NGC, entretanto, nem todas foram positivas para NS1-ZIKV.

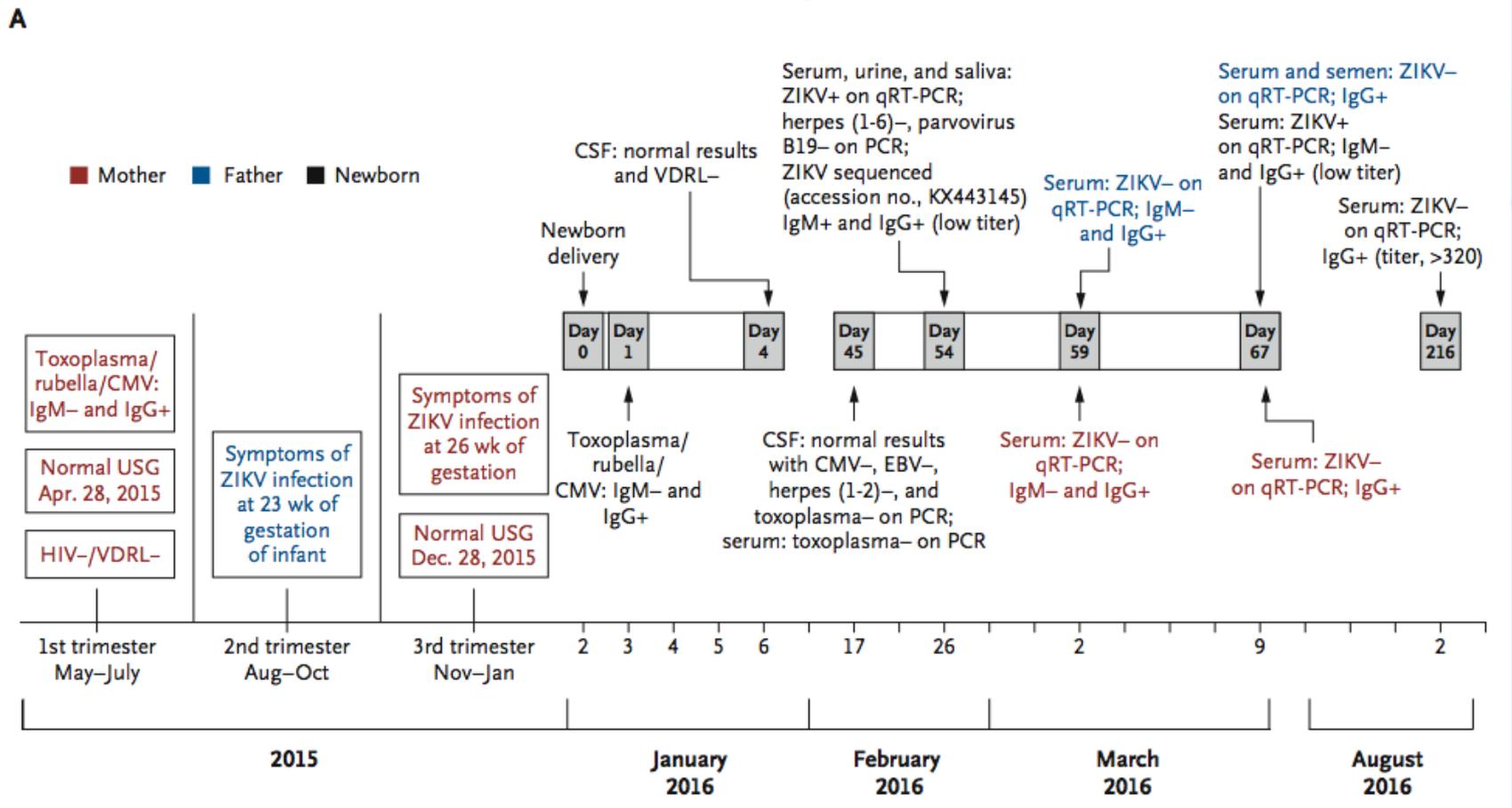
# Avaliação Temporal



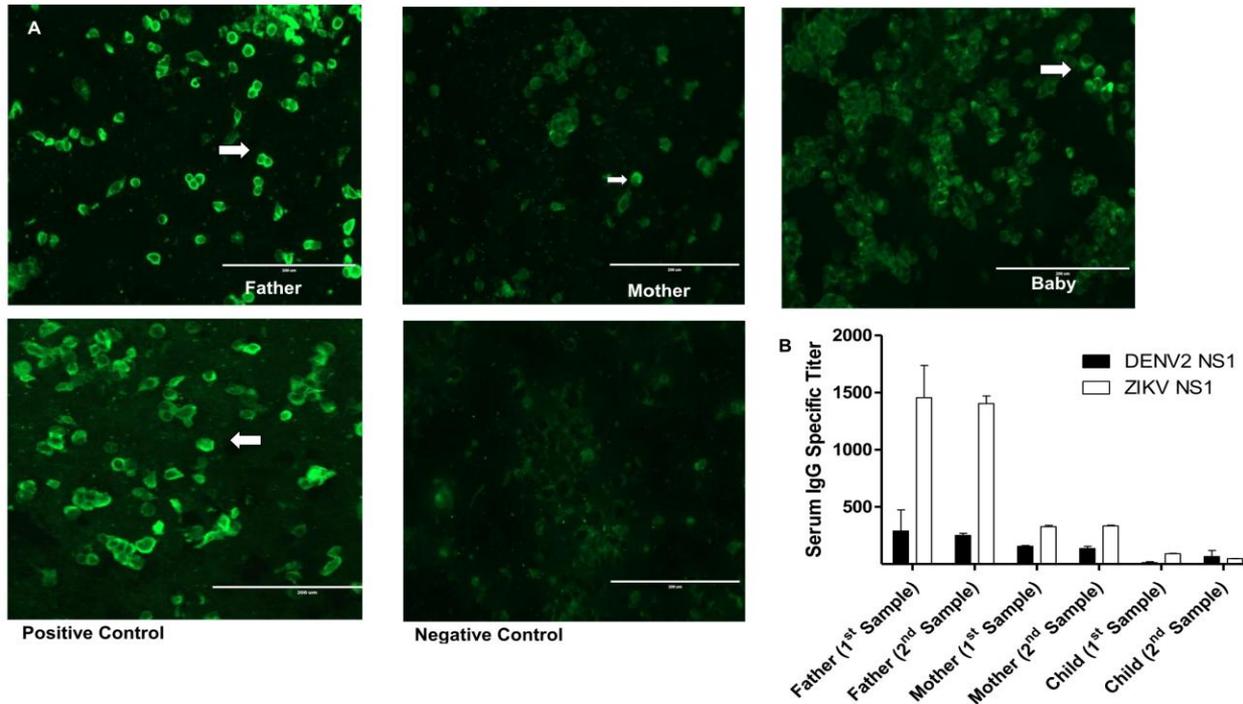
Aplicação do Elisa em diferentes pontos de coleta do mesmo paciente.

CORRESPONDENCE

**Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection**



## Detection of Zika virus antibodies in sera from patients.



(A) Immunofluorescence assay of sera sampling from father, newborn and mother; sera positive and negative for antibodies against Zika virus (IgG) were used as controls.

(B) Family antibody levels against ZIKV and DENV2 NS1 through time. The titer of NS1-specific serum antibodies was measured by ELISA using two serum samples collected in different time points from each individual with ~ 2 weeks of interval between each sampling. IgG titers against DENV2-NS1 and ZIKV-NS1 are represented by black and white bars, respectively.

(C) Overall view of laboratorial exams from the case. Data representative of two independent experiments. Scale bar = 200 micrometers.

ND: not done; + low reactive; +++ high reactive.

		ELISA						IFI	qPCR		
		ZIKV		DENV		CHIKV	YF	ZIKV	ZIKV	DENV	CHIKV
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgM	IgM	IgG			
Baby	1st sampling	NS1 Pos (91±4.5)	Pos (OD 0,636)	Neg	Neg	Neg	Neg	ND	Pos	Neg	Neg
	2nd sampling	NS1 Pos (47±2.7)	ND	Neg	ND	Neg	Neg	+	Pos	Neg	Neg
Father	1st sampling	NS1 Pos (1456±398.04)	Pos (OD 0,235)	NS1 Pos (289±261.17)	Neg	Neg	Neg	+++	Neg	Neg	Neg
	2nd sampling	NS1 Pos (1403±95.89)	ND	NS1 Pos (250±26.41)	ND	Neg	Neg	ND	Neg	Neg	Neg
Mother	1st sampling	NS1 Pos (327±15.90)	Neg	NS1 Pos (156±9.17)	ND	Neg	Neg	ND	Neg	Neg	Neg
	2nd sampling	NS1 Pos (324±9.54)	ND	NS1 Pos (136±28.22)	ND	Neg	Neg	+	Neg	Neg	Neg

# Zika virus detection by real-time PCR based on the SYBR-Green method as a diagnosis more accessible for developing countries.

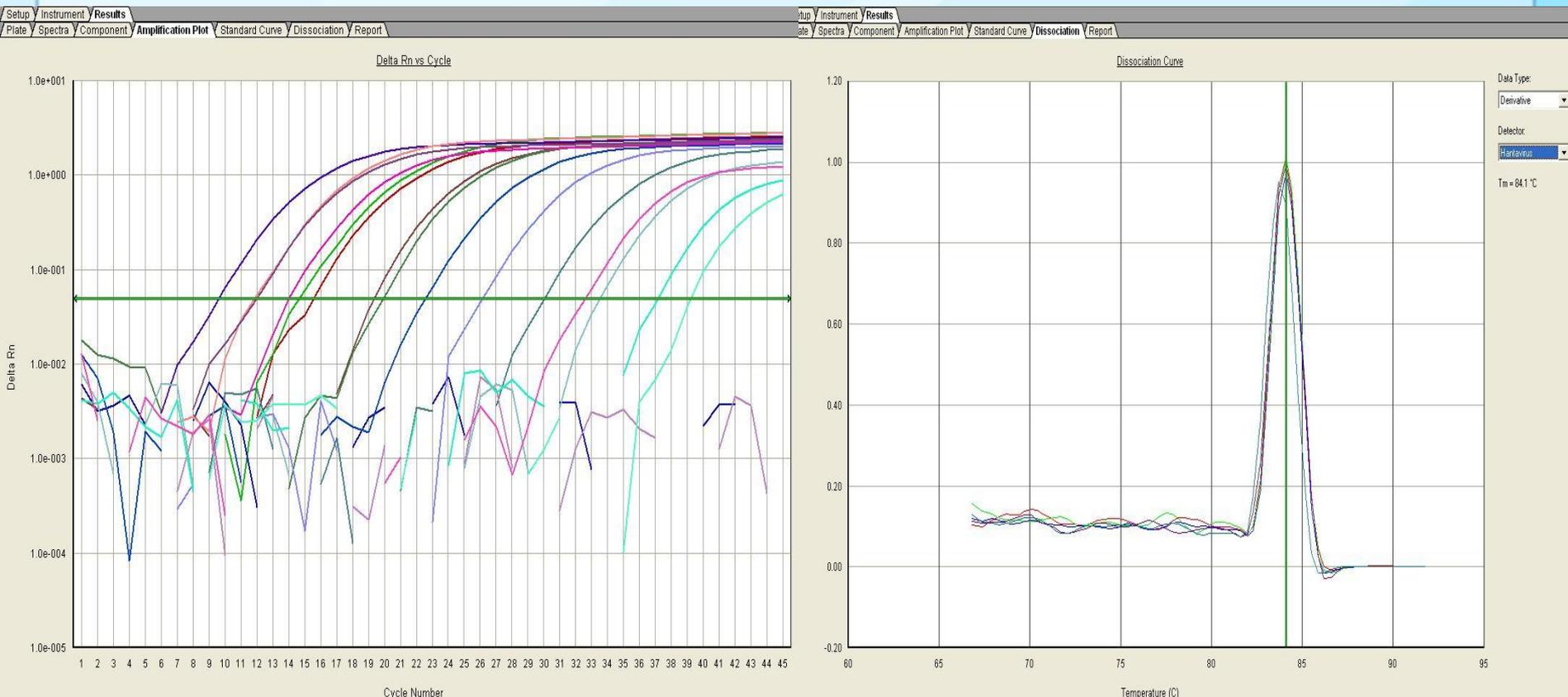
V. B. Silveira<sup>1</sup>, F. S. Mesquita<sup>1</sup>, L. M. Thomazelli<sup>1</sup>, E. A. Mendes<sup>1</sup>, S. R. Melo<sup>1</sup>, V. F. Botosso<sup>2</sup>, E. L. Durigon<sup>1</sup>, D. B. L. Oliveira<sup>1</sup>.

1 Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil.

2 Scientific Development Division, Virology Branch, Institute Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

Taqman (Ct)

SYBR-Green (Ct)



Results of real-time PCR based on Taqman (Ct) and SYBR-Green (Ct) method as a diagnosis more

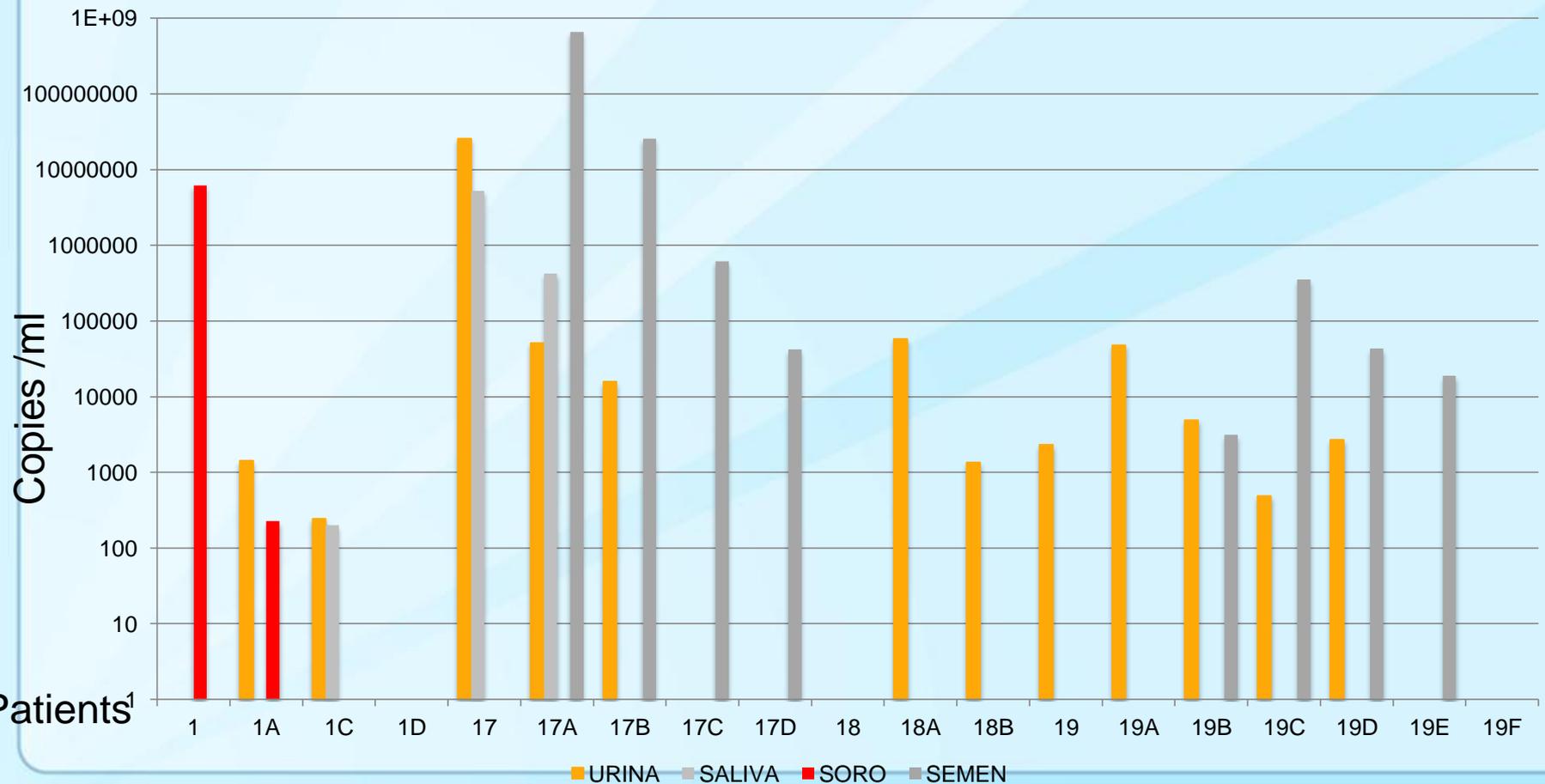
Passagem	Linhagem	Taqman (Ct)	SYBR Green (Ct)
T1	C6/36	17.26	19.12
	VERO	19.89	21.18
T2	C6/36	14.59	15.67
	VERO	19.89	21.18
T3	C6/36	9.52	13.44
	VERO	14.17	15.80
T4	C6/36	11.81	14.04
	VERO	12.0	14.29
T5	C6/36	13.82	15.0
	VERO	15.58	17.11
T6	C6/36	15.00	16.90
	VERO	17.83	20.1

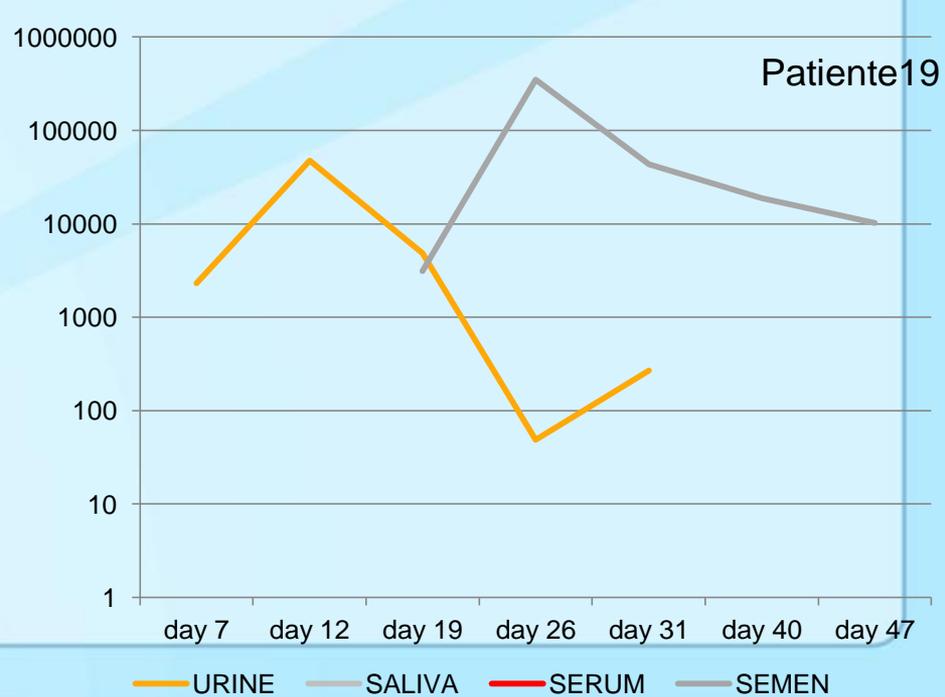
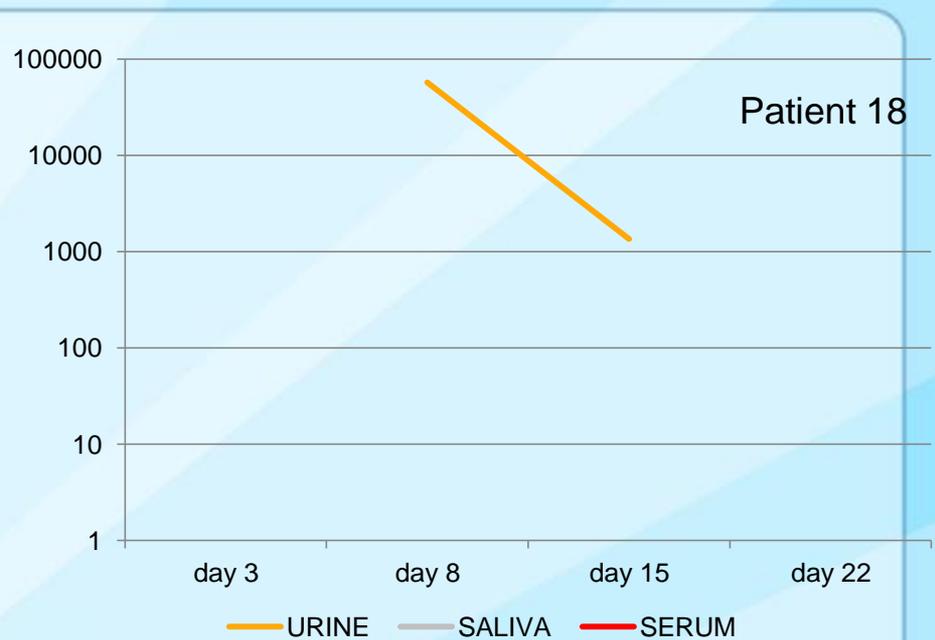
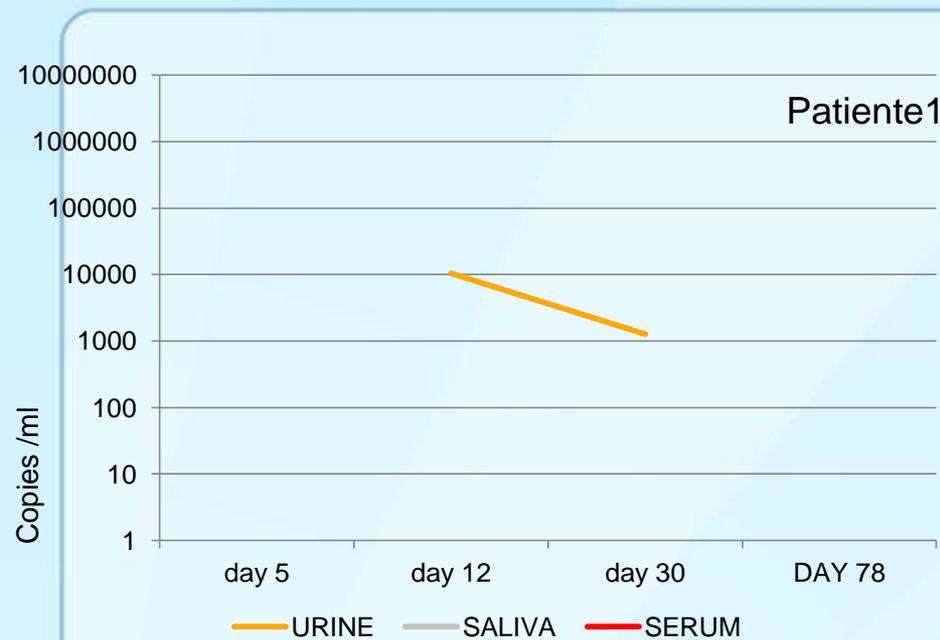
# COMPARISON OF DIFFERENT CLINICAL SAMPLES FOR DETECTION OF ZIKA VÍRUS IN SYMPTOMATIC PATIENTS BY REAL-TIME PCR.

V. B. Silveira<sup>1</sup>, F. S. Mesquita<sup>1</sup>, L. M. Thomazelli<sup>1</sup>, E. A. Mendes<sup>1</sup>, S. R. Melo<sup>1</sup>, V. F. Botosso<sup>2</sup>, E. L. Durigon<sup>1</sup>, D. B. L. Oliveira<sup>1</sup>.

1 Department of Microbiology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, Brazil.

2 Scientific Development Division, Virology Branch, Institute Butantan, São Paulo, SP, Brazil.





# **Zika Vírus no Brasil**

**Obrigada!**