



O DESAFIO DE
DIAGNOSTICAR A
ZIKA

Não há consenso científico de que algum dos 48 testes laboratoriais aprovados consiga diferenciar as infecções das causadas pelo vírus da dengue

Carlos Fioravanti

Em 2015, emergiu no Brasil uma doença até então obscura, a zika, cujas origem e consequências, principalmente a microcefalia, logo se tornaram conhecidas. Oficialmente, o número de casos registrados da doença caiu bastante nos últimos quatro anos, de 216 mil em 2016 para 2,3 mil de janeiro a março deste ano. O tamanho real da epidemia, porém, é desconhecido, já que os testes mais usados – os rápidos e os sorológicos – nem sempre identificam corretamente o agente causador da doença. A dificuldade se deve à grande semelhança genética entre o vírus da zika e o da dengue, que dificulta a tarefa de distinguir um do outro. É a chamada reação cruzada, uma limitação das ferramentas de diagnóstico conhecida há pelo menos 20 anos. Para complicar, alguns sintomas clínicos das duas doenças são similares, como febre e dor muscular, e ambos os vírus são transmitidos pela mesma espécie de mosquito, *Aedes aegypti*. Diferenciar o vírus da zika é importante para fazer o diagnóstico laboratorial da doença, conhecer seu ritmo de propagação na população e tomar medidas de prevenção.

Desde 2016, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), a partir de informações dos próprios fabricantes, aprovou para a venda 48 testes de identificação do vírus da zika, comercializados por nove empresas nacionais (privadas

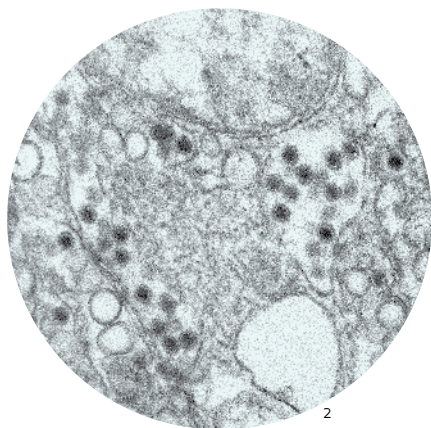
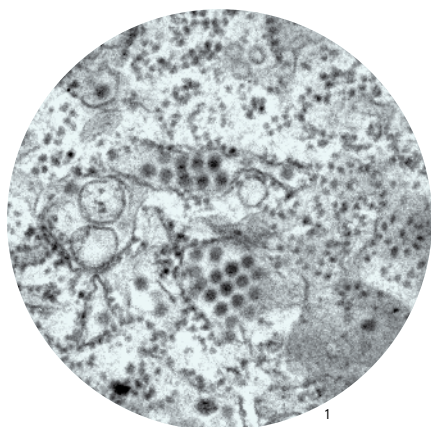
ou públicas) e 16 importadoras. Tiveram chancela da Anvisa 5 testes rápidos, 36 sorológicos e 7 moleculares. Os exames rápidos dependem da quantidade de anticorpos produzidos contra o vírus, bastante baixa nos primeiros dias após a infecção. Do mesmo modo, os testes sorológicos detectam anticorpos cuja produção foi estimulada pela presença do vírus no organismo, principalmente as imunoglobulinas do tipo G (IgG) e M (IgM), que podem ser detectadas depois de cinco ou sete dias após o início dos sintomas. Produzidos por células de defesa, os anticorpos permanecem no sangue, embora nem sempre seja possível identificar qual patógeno ativou sua produção. Esse tipo de exame pode ser feito a partir de uma semana após o contágio e custa menos do que o molecular.

Denominados RT-PCR, sigla para reação de transcriptase reversa, seguida de outra, em cadeia da polimerase, os testes moleculares registram trechos específicos de cada vírus. São o mais preciso de todos, mas têm de ser feitos em no máximo uma semana após a infecção, quando o vírus ainda pode ser encontrado no sangue, e por equipes especializadas. Em laboratórios privados, o preço dos testes para diagnóstico de zika varia de R\$ 10 a R\$ 600, dependendo da metodologia empregada.

De acordo com os fabricantes, os testes diferenciam os anticorpos produzidos pelo organismo em resposta ao ví-

Testes sorológicos apresentam risco alto de confundir o vírus da zika com o da dengue

Os CDC dos Estados Unidos alertam que os testes para zika podem dar resultado negativo para a doença real ou positivo para uma inexistente



Os círculos escuros nestas imagens de microscopia representam os vírus da dengue (*no alto*) e da zika (*acima*). As proteínas de superfície dos dois tipos apresentam uma similaridade genética de 41% a 46%

rus da zika dos resultantes da infecção por dengue. Mas há indícios de que os resultados nem sempre são confiáveis. “Os testes sorológicos disponíveis não parecem ser satisfatórios para diferenciar infecções causadas pelos vírus da zika e da dengue”, diz o infectologista Guilherme de Sousa Ribeiro, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), de Salvador. “Os fabricantes deveriam fornecer informações mais detalhadas sobre os testes e as amostras que usaram para validá-los.”

Ribeiro coordenou uma avaliação de dois testes de diagnóstico de zika de um dos principais fabricantes, a Euroimmun, filial de uma multinacional alemã. Nesse trabalho, publicado em julho de 2018 na revista científica *Virology Journal*, o teste para a detecção de anticorpos IgM contra o vírus da zika não conseguiu detectar 87,5% das pessoas infectadas e deu resultados falsos positivos em apenas 2% dos casos, indicando a ocorrência de uma infecção pelo vírus que na verdade não havia.

Inversamente, a avaliação do teste para a detecção de anticorpos IgG registrou uma sensibilidade (capacidade de identificar corretamente as pessoas com uma doença) de 100% e uma especificidade (capacidade de apresentar um resultado negativo em quem não tem a doença) de 27,3% em amostras de soro de pacientes com dengue e de 45% em amostras de doadores de sangue. Com base nesse último teste, todas as amostras de pessoas com a doença foram positivas, mas para muitas que não tinham a doença o teste apresentou resultados falsos positivos, indicando, erroneamente, que a teriam contraído.

A Euroimmun contestou a metodologia e os resultados da avaliação. O farmacêutico-bioquímico Gustavo Janaudis, diretor-executivo da empresa, diz que o teste consegue identificar todas as pessoas que têm o vírus no sangue e dá apenas 2% de falsos positivos. “A reatividade cruzada com dengue é praticamente nula”, diz ele. A Mobius Life Science, empresa nacional sediada em Pinhais, Paraná, produz testes com tecnologia própria a partir de antígeno da proteína NS-1 do vírus da zika. Seus testes, que não passaram por uma avaliação independente, também teriam a capacidade de identificar 100% das pes-

soas com o vírus da zika e daria apenas 2% de falsos positivos, segundo Aline Leck, da assessoria científica da empresa. Essa proteína é uma das primeiras a serem produzidas pelo organismo quando ocorre a infecção por zika.

“Não podemos confiar nas informações dos fabricantes”, observa o infectologista Celso Granato, professor da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e assessor médico do Grupo Fleury, formado por uma rede de 185 laboratórios de diagnósticos em oito estados do país. “Os testes podem funcionar em populações do exterior, mas não aqui. As cepas de vírus encontradas na população brasileira são diferentes da dos países em que os testes foram produzidos.” Segundo ele, as equipes do Fleury fizeram uma validação interna dos testes dos fabricantes, antes de usá-los, com base em amostras de pessoas com diagnóstico confirmado de zika em 2016, e encontraram diferenças de até 30 pontos percentuais a menos que os valores apresentados pelos fabricantes.

NOVO TESTE

O Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) criou um teste sorológico de diagnóstico de zika em parceria com a AdvaGen, pequena empresa com uma dezena de funcionários sediada em Itu, interior paulista. Fundada por dois empresários, sem participação de pesquisadores, a AdvaGen produzia placas de petri quando, durante a epidemia de zika no país, seus donos procuraram o ICB com o intuito de criar o exame. Ainda antes de adotar o nome atual, a empresa recebeu auxílio pelo programa Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas (Pipe) da FAPESP.

Desenvolvido desde 2015 com o propósito de evitar a reação cruzada com o vírus da dengue, o teste da USP está sendo avaliado em hospitais, centros de pesquisa e laboratórios clínicos de São Paulo e de outros estados. De acordo com a biomédica Danielle Oliveira, pesquisadora do ICB e coordenadora do projeto, o teste atingiria uma acurácia de 92% para registrar o vírus da zika em pacientes infectados e resultaria em no máximo 5% de falsos positivos.

O exame do ICB apresentaria baixo risco de reação cruzada por se valer de um fragmento específico da proteína NS-1 do vírus da zika. Outros fabrican-

Teste do ICB-USP tem a meta de oferecer maior precisão por usar um fragmento específico de uma proteína do vírus da zika



tes afirmam que também utilizam partes dessa proteína ou toda ela em seus exames para detectar infecções por zika. “A NS-1 é uma das primeiras proteínas que o vírus da zika libera na circulação sanguínea e induz a uma produção intensa de anticorpos”, explica o biólogo Luis Carlos de Souza Ferreira, diretor do ICB, que participou do trabalho. Segundo Wagner Rodrigues, diretor administrativo da AdvaGen, a meta é produzir a proteína em um volume muito maior e o mais rapidamente possível para participar de grandes licitações de compras promovidas pelo Ministério da Saúde.

Em fevereiro deste ano, com base em laudos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), ligado à Fiocruz, a Anvisa proibiu a produção de testes rápidos para zika, dengue e chikungunya da Fundação Baiana de Pesquisa Científica e Desenvolvimento Tecnológico, Fornecimento e Distribuição de Medicamentos – Bahiafarma, do governo estadual. Os laudos argumentavam que os exames não davam resultados confiáveis. De acordo com a assessoria de comunicação, a Bahiafarma contestou judicialmente as alegações de que a eficácia dos testes era baixa. Também disse que já havia cessado a produção antes da ação da Anvisa, após o término de contrato com o Ministério da Saú-

de, para o qual forneceu cerca de 6,5 milhões de testes diagnósticos de zika, dengue e chikungunya desde 2016, a um valor aproximado de R\$ 165 milhões. Desenvolvido com a empresa coreana Genbody e um dos primeiros usados no país, o teste de diagnóstico de zika da Bahiafarma conseguiria, segundo a empresa, identificar corretamente 94% das pessoas infectadas pelo vírus da zika e daria 7% de falsos positivos.

As instituições públicas disputam com empresas privadas as encomendas do Ministério da Saúde, dos centros de pesquisa e dos laboratórios clínicos privados. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), da Fiocruz, produz testes para a detecção de IgG e IgM com tecnologia da empresa norte-americana Chembio. Feitos com fragmentos de proteínas virais, entre elas a NS-1, têm sensibilidade e especificidade superiores a 95%, segundo Antonio Gomes Pinto, gerente do programa de desenvolvimento tecnológico de reativos para diagnóstico do Bio-Manguinhos/Fiocruz. “No entanto, com amostras de pacientes com dengue, evidenciamos reações cruzadas, em níveis superiores a 50% com a resposta de IgG de nossos testes de zika”, diz ele. “Altos percentuais de reações cruzadas, especialmente para a resposta de IgG, são apontados entre todos os testes de diagnóstico comerciais disponíveis atualmente, no Brasil e no mundo.”

Embora de 41% a 46% da sequência de proteínas da superfície dos vírus da zika e da dengue sejam diferentes, as similaridades são suficientes para permitir reações cruzadas: a maioria dos anticorpos que reagem às proteínas da superfície do vírus da dengue também reage com as da zika, de acordo com um estudo de pesquisadores do Imperial College, de Londres, publicado na *Nature Immunology* em 2016. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), dos Estados Unidos, alertam que não há teste 100% preciso para zika. O resultado pode às vezes ser negativo em caso de infecção real ou indicar resultado positivo para uma doença inexistente. ■

Projeto

Diagnóstico sorológico rápido e de baixo custo para zika vírus, utilizando a plataforma Elisa-IgG/IgM (nº 16/08727-5); Modalidade Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas (Pipe); Pesquisadora responsável Danielle Bruna Leal de Oliveira (Meios de Cultura Barth); Investimento R\$ 1.491.845,40.

Artigos científicos

KIKUTI, M. *et al.* Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (Elisas) for diagnosis of zika virus infection. *Virology Journal*. v. 15, n. 1, p. 2-7. 13 jul. 2018.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nature Immunology*. v. 17, n. 9, p. 1102-8. set. 2016.

MONTECILLO-AGUADO, M. R. *et al.* Cross-reaction, enhancement, and neutralization activity of dengue virus antibodies against zika virus: A study in the Mexican population. *Journal of Immunology Research*. v. 2019, ID 7239347, p. 1-14. 2 set. 2019.