

Detecção de Zika Vírus por PCR na região genômica C-prM e a sua relação filogenética

Thayane E. S. Guimarães¹ (PG), Brenda M. Vasconcellos¹ (PG), Thaís A. C. Paschoal² (IC), Tiago S. Salles¹ (PQ), Davis F. Ferreira¹ (PQ), Bianca C. Neves¹ (PQ), Ana Claudia A. Melo¹ (PQ), Mônica F. M. C. Cardoso^{1*} (PQ)

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, ² Instituto Brasileiro de Medicina de Reabilitação - IBMR

Correspondência: monica@iq.ufrj.br

Palavras Chave: Zika vírus, Detecção viral, Sequenciamento, PCR

Introdução

O vírus Zika (ZIKV) é o agente etiológico da febre zika, uma arbovirose transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*¹. Além do mosquito, o ZIKV pode ser transmitido por via sexual, materno-fetal e transfusão de sangue². O ZIKV pertence à família Flaviviridae, com RNA de fita simples e polaridade positiva, pode ser detectado em amostras de sangue, saliva, urina, líquido amniótico e sêmen³. Com a maioria de casos assintomáticos (≈80%), em geral, é leve e autolimitante (2-7 dias)⁴, com possibilidade de complicações neurológicas como síndrome de Guillain-Barré e malformações como a microcefalia⁵. A OMS recomenda que o diagnóstico da doença seja feito por métodos moleculares através de técnicas de RT-PCR e de PCR quantitativo para confirmação do vírus³. O objetivo desse projeto foi estabelecer um protocolo para detecção do ZIKV por métodos moleculares utilizando a região da junção gênica entre o capsídeo e a pré-membrana (C-prM), que inclui novos pares de iniciadores para diagnóstico. Os métodos utilizados neste trabalho foram extração de RNA por TriZol, síntese de cDNA, RT-PCR (*heminested* PCR) e qPCR (SYBR Green) e análise da curva de *Melting*, sequenciamento pelo método de Sanger e posteriores análises computacionais para montagem da árvore filogenética.

Resultados e Discussão

Foram desenhados dois pares de iniciadores para detecção específica de ZIKV na região genômica da C-prM, mD1-F/STZK-R e GTZK-F/STZK-R e testados para amplificação do ZIKV a partir dos *templates*, plasmídeo sintético de ZIKV e o cDNA do vírus, proveniente de células Vero. O par GTZK-F/STZK-R selecionado para ser usado na segunda reação de RT-PCR foi também testado por biologia computacional contra o banco de dados do NCBI utilizando as palavras chaves: "Zika virus" [porgn: txid64320] AND genome NOT partial NOT near". No banco foram encontradas 1.123 sequências completas de ZIKV e o par de iniciadores foi capaz de reconhecer todas. O protocolo do RT-PCR foi validado com amostras de pacientes com aparente quadro clínico de febre zika e como controle negativo amostras de saliva de pacientes sem a presença do quadro clínico, a saber: saliva (8) e urina (4) (protocolo de ética:

80709 HUCFF/FM/UFRJ). Das 12 amostras testadas, 11 delas apresentaram resultado positivo, utilizando para detecção o par GTZK-F/STZK-R em técnica de RT-PCR. Foi testada a possibilidade de reconhecimento cruzado com outros arbovírus com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R, esse par não reconheceu os outros arbovírus. O cDNA das amostras clínicas que apresentaram resultado positivo no RT-PCR, foram amplificadas com o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R e os produtos de PCR amplificados com massa molecular 386 pb, e esse produto clonado em pGEM-T Easy, ambos, foram sequenciados na plataforma de DNA PDTIS/FIOCRUZ. Os resultados do sequenciamento das amostras de saliva e urina com ZIKV e as sequências de ZIKV do NCBI foram utilizadas para confirmação da identidade do agente causador dos sintomas e também na construção de uma árvore filogenética para a investigação da origem do ZIKV do Brasil.

Conclusões

Os resultados demonstraram que o par de iniciadores GTZK-F/STZK-R desenhado neste trabalho, é específico para ZIKV, não reconhecendo outros Flavivírus circulantes no Brasil, podendo ser utilizado como um método alternativo de diagnóstico sensível, bem como uma ferramenta para vigilância epidemiológica.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à FAPERJ, CNPq, Capes.

¹WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheets, Detail, Zika virus. 2016.** <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 23/06/2018

²PETERSEN, L.R.; JAMIESON, D.J.; POWERS, A.M.; HONEIN, M.A. "Zika virus." *N. Engl. J. Med.* 2016. 374:1552–1563.

³BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde de A a Z. Zika vírus. 2017.** <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus>>. Acesso em: 23/06/2018

⁴DUFFY, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C. "Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia." *N. Engl. J. Med.* 2009. 360.24:2536-2543.

⁵ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V.; SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015. 110(4): 569-572.