

Vírus zika – Epidemiologia e diagnóstico laboratorial

Zika virus – Epidemiology and laboratory diagnosis

Antônia Letícia Pesenti e Silva¹, Sílvia Maria Spalding¹

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) pode ser considerado um patógeno emergente disseminado para a Oceania e a América causando surtos sazonais. No Brasil a infecção começou a ser registrada em 2015 no Nordeste do país, embora a doença seja autolimitada e manifeste sintomas brandos, ocorreram relatos de complicações neurológicas associadas ao ZIKV em recém-nascidos e em adultos. Essa revisão descreve as características epidemiológicas da infecção pelo ZIKV no Brasil e no Rio Grande do Sul, e efetua análise dos métodos utilizados no diagnóstico laboratorial da infecção. As fontes de pesquisa foram artigos científicos em português e em inglês que referiam casos de infecção por ZIKV, no período de 2007 a 2017, citados nos repositórios digitais PubMed, PubMed Central (PMC) e SciELO, foram utilizados os descritores: Zika, diagnóstico, sorologia e epidemiologia. Apesar do decréscimo nos casos notificados no ano de 2017, o ZIKV continua em circulação. O diagnóstico laboratorial utiliza técnicas em métodos moleculares e sorológicas. A reação da transcriptase reversa (RT-PCR) é a metodologia com maior especificidade comparada à de ensaio imunoenzimático e à de neutralização por redução de placas.

Palavras-chave: Zika virus, arbovirus, epidemiologia, reação em cadeia da polimerase, sorologia.

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil.

Instituição:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil.

* Autor Correspondente:

Antônia Letícia Pesenti e Silva
E-mail: silvia.spalding@ufrgs.br;
antoniapesente@gmail.com

Recebido em: 10/09/2017.

Aprovado em: 06/06/2018.

ABSTRACT

Zika virus can be considered a widespread emerging pathogen for Oceania and America causing seasonal outbreaks. Zika's disease began registered in 2015 in Brazil northeast, although the disease is self limited and manifest mild symptoms, there have been reports of neurological complications associated with ZIKV in neonates and adults. This review describes the epidemiological characteristics of ZIKV infection in Brazil and Rio Grande do Sul, and reports the methods used in laboratory diagnosis. The sources of research were scientific articles in Portuguese and English that reported cases of ZIKV infection and with a focus on laboratory diagnosis cited in the digital repositories PubMed, PubMed Central (PMC) and SciELO, from 2007 to 2017, the descriptors : Zika, diagnosis, serology and epidemiology. Despite the decrease in cases described in 2017, ZIKV keeps circulating. The definitive diagnosis is based on molecular and serological methods. Molecular diagnosis by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is the more specific method than the serological methods by enzyme immunoassay and platelet neutralization test.

Keywords: Zika Virus, arboviruses, epidemiology, polymerase chain reaction, serology.

INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus emergente que pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e tem importância clínica no mundo por reunir patógenos humanos como o vírus da dengue (DENV sorotipos 1 a 4), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus do oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV).^{1 2} O ZIKV é transmitido por fêmeas de mosquitos *Aedes (Stegomyia) spp.*,^{3 4} e recentes evidências sugerem que também possa ser transmitido por *Culex quinquefasciatus*.⁵ A infecção também pode ser transmitida pela forma congênita,⁶ pelo ato sexual,⁷ e possivelmente por transfusão sanguínea.⁸

Estima-se que 80% das infecções de ZIKV são assintomáticas,⁹ os sintomas mais comuns são febre, cefaléia, mal-estar, erupção maculopapular, mialgia e artralgia,¹⁰ sendo por vezes confundido com os sintomas de DENV. Apesar de manifestar sintomas leves também ocorrem graves complicações neurológicas como microcefalia em recém-nascidos¹¹ e síndrome de Guillain-Barré em adultos.^{12 13}

O ZIKV inicialmente foi identificado na África e da Ásia e se difundiu para a Oceania e América causando surtos sazonais. O primeiro surto fora da África e Ásia ocorreu em 2007 na ilha de Yap (Oceania). DUFFY *et al.*¹⁴ estimaram que três quartos da população da ilha foram infectadas pelo vírus. Antes desse surto, somente 16 casos de doença humana por ZIKV haviam sido documentados no mundo.¹⁵ Em 2008, dois cientistas norte-americanos relataram terem sido picados por mosquitos *Aedes spp.* no Senegal. Quando retornaram aos USA, ambos manifestaram sintomas associados a doença de ZIKV. A esposa de um deles também manifestou os sintomas da doença dias depois dele ter retornado para

casa. O casal relatou ter tido relações sexuais naquele período o que sugere que houve infecção de ZIKV via transmissão sexual.⁷

Posteriormente, no início de 2014, na Ilha de Páscoa (Chile) houve o primeiro surto de ZIKV.¹⁶ No Brasil, até 2015 não havia relato da infecção,¹⁵ e em fevereiro de 2016 o diretor-geral da World Health Organization (WHO) declarou que os casos relacionados com desordens neurológicas identificados no país constituem emergência de saúde pública de interesse internacional.¹⁷

Essa revisão teve como objetivo caracterizar a situação epidemiológica de ZIKV no Brasil e no Rio Grande do Sul e descrever os métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial da infecção.

MÉTODOS

Foi realizada revisão sistematizada sobre a infecção por ZIKV, com enfoque na epidemiologia e no diagnóstico laboratorial, de janeiro de 2007 à dezembro de 2017. Foram selecionados artigos nos idiomas português e inglês dos repositórios digitais PubMed, PubMed Central (PMC) e SciELO e utilizados os seguintes descritores: Zika, diagnóstico, sorologia e epidemiologia. As referências bibliográficas citadas nos artigos também foram consultadas para rastrear demais artigos a respeito do tema revisado. As informações foram complementadas com dados específicos sobre a situação epidemiológica da doença de ZIKV no Brasil e no Rio Grande do Sul citados em boletins epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) e do Centro Estadual de Vigilância em Saúde da

Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS/SES-RS) nos anos de 2015 à 2017.

EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL E NO RIO GRANDE SUL

Casos autóctones de ZIKV foram confirmados em 18 estados do Brasil, em 2015, e 2.782 casos suspeitos de microcefalia associados e notificados em 618 municípios e no Rio Grande do Sul não ocorreu nenhum caso.^{18 19}

No próximo ano foram registrados 215.319 casos suspeitos de infecção por ZIKV no país, (incidência de 105,3 casos/100 mil habitantes), distribuídos em 2.306 municípios, tendo sido confirmados 130.701 casos (60,7%). A maior incidência ocorreu na região centro-oeste com 222 casos/100 mil habitantes. Destacaram-se os Estados do Mato Grosso (671 casos/100 mil habitantes), do Rio de Janeiro (414,2 casos/100 mil habitantes) e da Bahia (340,5 casos/100 mil habitantes) e confirmados oito óbitos por ZIKV.²⁰ No Rio Grande do Sul, em 2016, foram confirmados 85 casos de infecção por ZIKV, 44 (10%) autóctones em Frederico Westphalen, Santa Maria, Ivoti, Rondinha, Novo Hamburgo, Canoas, Porto Alegre, Ijuí, Santo Ângelo e Caxias do Sul. Desses casos, quatro ocorreram em gestantes, duas infectadas no primeiro trimestre. Das quatro gestações, uma delas foi interrompida e as outras chegaram à termo sem que os recém-nascidos apresentarem alterações no sistema nervoso central.²¹

No país, em 2016, foram confirmados 2.289 casos de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central sugestivo de infecção congênita. No Rio Grande do Sul foram confirmados 18 casos de infecção congênita, sendo dois casos por ZIKV.²¹

Nos primeiros oito meses de 2017 foram registrados 15.518 casos prováveis de infecção pelo ZIKV no Brasil, destes 6.587 (42,4%) foram confirmados. Em relação às gestantes foram registrados 2.130 casos prováveis, sendo 708 confirmados. Nenhum óbito por ZIKV foi confirmado laboratorialmente.²² No Rio Grande do Sul não foi encontrada circulação autóctone de ZIKV e os dois casos reportados ocorridos foram importados.²³

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A confirmação do diagnóstico por ZIKV é baseada na detecção do RNAm do vírus pela RT-PCR em fluidos biológicos²⁴, como soro, urina, sêmen, e pela detecção indireta de anticorpos IgM e IgG anti-ZIKV no soro. O diagnóstico de ZIKV em amostras de urina pode ser bastante útil, por ter um longo período de detecção e apresentar maior carga viral comparada ao soro. Além disso, a urina possui a vantagem de ser um material de fácil obtenção.^{25 26}

A RT-PCR convencional e a quantitativa são técnicas rápidas, com alta sensibilidade e especificidade, porém a detecção do ZIKV é limitada ao estreito período no início da infecção. A RT-PCR quantitativa apresenta maior custo comparada à convencional, porém possui muitas vantagens como a baixa taxa de contaminação, diminuição de resultados falso-positivos, alta sensibilidade e especificidade, fácil padronização e possibilidade de quantificação do ácido nucléico viral. Pela elevada especificidade, esse método pode ser utilizado para diagnóstico diferencial de arboviroses

em regiões com ocorrência simultânea de ZIKV, DENV e Chikungunya (CHIKV).^{27 28}

Como a duração da fase de viremia do ZIKV é curta, os métodos sorológicos cumprem um importante papel no diagnóstico na fase não-viral, o mais utilizado é o ELISA de captura de IgM. A limitação desta metodologia é a reatividade cruzada com outras arboviroses como DENV.²⁸ Isso pode ser desencadeado por infecções com outras arboviroses e vacinas,²⁹ e além disso alguns ensaios utilizam somente proteínas estruturais virais (ex: a proteína E do envelope), que são responsáveis por gerar reatividade cruzada de anticorpos. Uma forma de reduzir a reatividade cruzada na sorologia de IgM, e assim aumentar a especificidade da técnica é incluir proteínas virais não-estruturais (NS) no ensaio como NS1, NS3 e NS5.^{30 31}

Um grande número de tecnologias vem sendo desenvolvidas para o diagnóstico sorológico de ZIKV baseados nas proteínas E e NS1, podendo se citar ELISA IgM proteína E da InBios (aprovado pelo FDA), ELISA proteína NS1 da EuroImmun (aprovado para uso clínico na Europa), e ELISA IgM proteína NS1 da NovaTec (atualmente com o uso restrito a pesquisa). Recentemente um método multiplex Luminex foi desenvolvido usando proteínas E, NS1 e NS5 e mostrou uma significativa melhoria na especificidade da técnica.³¹

Nas amostras reagentes para IgM é recomendado efetuar o teste de neutralização por redução de placas (PRNT), considerado teste padrão dentro da sorologia de arboviroses. Entretanto, o método PRNT é trabalhoso, de baixo rendimento, com o resultado sendo liberado em mais de uma semana. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de um teste PRNT rápido e com maior rendimento, considerando que não é recomendado para diagnóstico em pacientes com histórico de infecção com arboviroses e vacinas devido a reatividade cruzada.³²

No Brasil os principais kits laboratoriais de ZIKV registrados e autorizados pela ANVISA^{33 34 35} são: o IF mosaico arbovírus® da Euroimmun IgM (registro 81148560014) e IgG (81148560015), Bio Gene PCR® da Quibasa (registro 10269360300), kit molecular ZDC® da Fiocruz (registro 80142170032), testes rápidos IgG/IgM combo® (registro 811285200001) e NS1® (registro 811285200003) da Bahiapharma. Os dois ensaios de sorologia da Euroimmun detectam a presença de anti-ZIKV IgM e IgG pelo método de imunofluorescência indireta, os da Quibasa e da ZDC, o ácido nucléico de ZIKV pela técnica da RT-PCR quantitativa, sendo que o da ZDC também detecta as arboviroses DENV e CHIKV. O teste rápido da Bahiapharma é baseado em imunocromatografia utilizando o soro do paciente. No Rio Grande do Sul, o Laboratório Central do Estado realiza o diagnóstico de Zika através da RT-PCR quantitativa. O período virêmico não está totalmente estabelecido, a detecção direta do vírus ocorre até quatro a sete dias após o início dos sintomas, sendo ideal que o material biológico seja examinado até o quarto dia. Os ácidos nucléicos do vírus foram detectados em humanos entre um e onze dias após início dos sintomas e o vírus foi isolado em primata não-humano até nove dias após inoculação experimental.¹⁹

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção por ZIKV é nova no Brasil e em outros países da América. Os sintomas da doença são inespecíficos

podendo ser facilmente confundidos com os de DENV e de CHIKV. Embora quando manifestados os sintomas sejam leves, a vigilância de saúde e o corpo clínico precisam estar atentos para possíveis complicações neurológicas nos pacientes, como a síndrome de Guillain-Barré já relatada no Brasil e na Polinésia Francesa, e também malformações no sistema nervoso central de fetos.

As técnicas moleculares por serem mais específicas do que a sorologia, cumprem um papel importante em regiões onde há coinfeção com outras arboviroses como a DENV e a CHIKV. A desvantagem da RT-PCR em amostras de soro é a baixa estabilidade do ácido nucléico viral, em comparação com amostras de urina cuja estabilidade é maior. Os testes para detecção do antígeno NS1 do ZIKV (Elisa, imunocromatográfico) são específicos para essa arbovirose. Portanto, sugere-se que, frente a resultados negativos/não reagentes em pacientes com suspeita de ZIKV, deve ser considerada, a critério da vigilância epidemiológica, a investigação para outros flavivírus cujas infecções possam cursar com quadro semelhante ao do ZIKV.

A NS1 é uma proteína conservada do ZIKV, e a detecção desse antígeno em ensaios de sorologia torna a técnica mais específica e sensível, contribuindo assim para a confiabilidade do resultado sem interferentes de reatividade cruzada. Uma forma de aumentar a especificidade, e diminuir falsos negativos dos ensaios sorológicos é incluir proteínas não-estruturais (NS), produzidas pelo vírus na fase aguda da doença de ZIKV, como a NS1. Alguns kits sorológicos do mercado já incluem a NS1, inclusive kits disponíveis no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg infect dis.* Sep 2009;15(9):1347-1350.
- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* Dec 2004;10(12):S98-S109.
- Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RMD, Fernandes RS, Campos SS, Silva KABD, *et al.* First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Oct 2016;111(10):655-8.
- Li MI, Wong PSJ, Ng LC, Tan CH. Oral susceptibility of Singapore *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus) to Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis.* Aug 2012; 6(8):e1792.
- Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krovovsky L, dos S Rocha SW, *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infectious.* Aug 2017;6(8):e69.
- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro surveill.* Apr 2014;19(13):20751.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddock AD, *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg infect dis.* May 2011;17(5):880.
- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(14):20761.
- Ladhani SN, O'connor C, Kirkbride H, Brooks T, Morgan D. Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain-Barré syndrome. *Arch dis child.* 2016;101(7):600-2.
- Heang V, Yasuda CY, Sovann L, Haddock AD, da Rosa APT, Tesh RB, *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. *Emerg infect dis.* Feb 2012;18(2):349-51.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, *et al.* Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med.* Mar 2016;2016(374):951-8.
- Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* Mar 2014;19(9):20720.
- Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME. The Zika outbreak of the 21st century. *J autoimmun.* Feb 2016;68:1-13.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *N Engl j med.* Jun 2009;360(24):2536-43.
- Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: The origin and spread of a mosquito borne-virus. *Bull World Health Organ.* Apr 2016;94(9):675-86C.
- Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch virol.* 2016;161(3):665-8.
- World Health Organization. Director-general summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 2016 [acessado em Ago 2017] Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>>.
- Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 48. *Boletim epidemiológico*, v. 46, n. 44. 2015a [acessado em Ago 2017] Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>>
- Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a semana epidemiológica 50. *Boletim epidemiológico*, v. 46, n. 46. 2015b [acessado em Ago 2017] Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/dezembro/28/2015-boletim-microcefalia-se50-vol46-n46.pdf>>
- Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika da semana 1 até a semana epidemiológica 52. *Boletim epidemiológico*, v. 48, n. 3. 2017a [acessado em Ago 2017] Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v-rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>

21. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (RS). Informativo Epidemiológico Dengue, Chikungunya, Zika vírus e Microcefalia – Semana epidemiológica 1 a 52 (03/01/16 a 31/12/16). 2017a [acessado em Ago 2017] Disponível em: < <http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201705/09170305-informativo-epidemiologico-dengue-chik-e-Zika-se-52-31-12-16-final.pdf>>
22. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 33. Boletim epidemiológico, v. 48, n. 27. 2017b [acessado em ago 2017]. Disponível em:< <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/29/2017-026-Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-33-de-2017.pdf>>
23. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (RS). Informativo Epidemiológico Dengue, Chikungunya, Zika vírus – Semana epidemiológica 1 a 33 (09/01/17 a 19/08/17). 2017b [acessado em Ago 2017]. Disponível em: < <http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201708/23091632-informativo-epidemiologico-dengue-chik-e-zika-se-33-19-08-17.pdf>>
24. Faye O, Faye O, Dupressoir A, Weidmann M, & Ndiaye, M. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. *J clin virol.* May 2008;43(1):96-101.
25. Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg infect dis.* Jan 2015;21(1):84-6.
26. Bingham AM. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease – Florida 2016. *Morb mortal wkly rep.* 2016; 65.
27. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol j.* 2013;10(1):1-8.
28. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg infect dis.* Aug 2008;14(8):1232-9.
29. Venturi G, Zammarchi L, Fortuna C, Remoli ME, Benedetti E, Fiorentini C, *et al.* Authors reply: diagnostic challenges to be considered regarding Zika virus in the context of the presence of the vector *Aedes albopictus* in Europe. *Euro Surveill.* Mar 2016;21(10):30163.
30. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, *et al.* Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science (Wash.).* Aug 2016;353:823-6.
31. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP, Kramer LD, *et al.* A multiplex microsphere immunoassay for Zika virus diagnosis. *EBioMedicine.* Jan 2017;16:136-40.
32. Shan C, Xie X, Ren P, Loeffelholz MJ, Yang Y, Furuya A, *et al.* A Rapid Zika Diagnostic Assay to Measure Neutralizing Antibodies in Patients. *EBioMedicine.* Mar 2017;17:157-62.
33. Diário Oficial da União. Resolução nº 301 de 2 de fevereiro de 2016. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=24&data=03/02/2016>> Acessado em Ago 2017.
34. Diário Oficial da União. Resolução nº 372 de 12 de fevereiro de 2016. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/108913667/dou-suplemento-secao-1-15-02-2016-pg-55>> Acessado em Ago 2017.
35. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Consulta de registros de produtos. Disponível em: < <https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodSearch&page=1&fastSearch=&anvisaType=8&anvisaId=&anvisaIdType=0&anvisaProcN=&anvisaProcNType=0&anvisaProdDesc=&anvisaProdDescType=0&anvisaProdCat=Zika&anvisaProdCatType=0&anvisaProdMod=&anvisaProdModType=0&anvisaHolderReg=&anvisaHolderRegType=0&anvisaProdOrig=&anvisaProdOrigType=0#results>> Acessado em Ago de 2017.
36. Centro Estadual de Vigilância em Saúde (RS). Nota técnica IPB – LACEN nº 1/2016 – revisão 2. 2016 [acessado em ago 2017] Disponível em: < <http://www.cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201705/10115112-orientacoes-basicas-para-diagnostico-laboratorial-dengue-chikungunya-e-zika.pdf>>