Universidade do Grande Rio
Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional

HURY HELLEN SOUZA DE PAULA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS ASSOCIADOS A FEBRE CHIKUNGUNYA EM DUQUE DE CAXIAS, RJ.

DUQUE DE CAXIAS
2020

HURY HELLEN SOUZA DE PAULA

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS ASSOCIADOS A FEBRE CHIKUNGUNYA EM DUQUE DE CAXIAS, RJ.

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional (UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO) de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPG BIOTRANS) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Dr. Sergian Vianna Cardozo

DUQUE DE CAXIAS
2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

P324a Paula, Hury Hellen Souza de.
Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais associados a febre *chikungunya* em Duque de Caxias, RJ / Hury Hellen Souza de Paula. – Duque de Caxias, 2020.

75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2020.

"Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo".

Referências: f. 56-69.

1. Biomedicina. 2. Arboviroses. 3. Febre *chikungunya*. 4. Biologia molecular. 5. Testes imunológicos. I. Cardozo, Sergian Vianna. II. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". III. Título.

CDD – 610.28

HURY HELLEN SOUZA DE PAULA

Hury Hellen Souza de Paula

ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS ASSOCIADOS A FEBRE CHIKUNGUNYA EM DUQUE DE CAXIAS, RJ

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy" UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Profa. Dra. Helena Keiko Toma
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Dedico essa dissertação à minha família que nunca me deixou desistir, sempre persistindo em mostrar minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ser a base de tudo em minha vida, por me fortalecer e nunca me deixar fraquejar;

Aos meus pais, Paulo Roberto da Silva de Paula e Silvana Souza de Paula, por terem me dado a vida, por serem meus pilares. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, me levantando, me motivando a continuar, me dando forças e por sempre terem me ajudado. Não há palavras que descreva o quanto sou grata a vocês por tudo.

Ao meu irmão, Carlos Souza de Paula, que tanto me apoiou, que de tanto me ouvir falar de ciências, também entrou para a área. Por me ouvir treinar todas as vezes,por me mostrar que desistir nunca foi uma opção, por ser tão importante na minha vida e me alegrar;

À toda minha família, principalmente minha avó Nilda Leite Souza, por todo o apoio,toda oração, todas as palavras de motivação, de orgulho, de carinho. Obrigada por acreditarem na minha capacidade de poder ir além, de conseguir mais e por todo incentivo;

Ao Dr. Sergian Vianna Cardozo, que aceitou me orientar e dedicar parte do seu tempo ao nosso projeto. Agradeço por toda paciência, por toda compreensão, por me estimular a ser uma aluna melhor, uma profissional melhor. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, por acreditar em mim e principalmente por termos chegado até o fim;

A todos os membros do Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas (NPDI|Unigranrio), que estiveram juntos a mim nesse projeto, que me ajudaram de alguma forma, que sempre torceram por mim;

As minhas amigas Nicole Lima, Brennda Cardoso e Rafaela Mota pelos momentos de reflexão, de força e pelas risadas de sempre. Obrigada pelo carinho e motivação;

A todos os professores que já passaram pela minha vida acadêmica, por todos os ensinamentos e incentivo. Obrigada a todos que de alguma maneira acrescentaram algo importante que levarei para toda minha carreira profissional;

Ao meu companheiro, amor e amigo Fabio Gomes, por sempre me incentivar, me motivar e me fazer persistir pelo meu crescimento profissional.

A aos membros da banca, Profª Drª Helena Keiko Toma, Profº Dr. Pedro Hernan Cabello Acero e Profª Drª Claudia Maria Pereira, por terem aceitado o convite;

À CAPES, pela bolsa concedida.

“O progresso é impossível sem mudança; e aqueles que não conseguemmudar as suas mentes não conseguem nada”

George Bernard Shaw

RESUMO

As arboviroses têm sido reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema global de saúde pública. Dengue (DEN), Zika (ZIK) e Chikungunya (CHIK) são arboviroses de grande preocupação, devido ao impacto social e econômico, gerados especialmente em países de baixa renda. O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes atendidos na UPA Beira Mar (Hospital Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo), Duque de Caxias, RJ, com diagnóstico sugestivo de arboviroses. Um total de 172 pacientes com suspeita clínica de DEN, ZIK ou CHIK, atendidos no período de Janeiro a Junho de 2018, tiveram seus prontuários avaliados, de acordo com os critérios clínicos-epidemiológicos estabelecidos pelaOMS. Os soros obtidos das amostras sanguíneas coletadas de cada um dos 172 pacientes foram submetidos ao teste de biologia molecular (RT-qPCR), para detecção de RNA viral de CHIK. As amostras negativas no teste de biologia molecular (80/172) foram submetidas aoimunodiagnóstico (ELISA), para determinação de imunoglobulinas (IgM e IgG) reagentes ao vírus CHIK. Na análise dos prontuários, 47 (27,32%) foram classificadas como DEN, 31 (18,02%) como ZIK e 94 (53,71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugere um quadro epidêmico de CHIKV, quadro este caracterizado pela biologia molecular que detectou 92/172(53,48%) amostras positivas para CHIKV, determinando o estágio de viremia nesses pacientes. De acordo com os critérios sorológicos de detecção de anticorpos foi observado um total de 18/80 (22,5%) amostras de soro reagentes para IgM, caracterizando a fase aguda da doença. Este achado aumenta o quantitativo de amostras relacionadas a fase aguda da infecção por CHIK de 92/172 (53,48%) para 110/172 (63,9%), ratificando o provável quadro epidêmico já observado nos resultados da biologia molecular.As análises dos critérios clínicos frente aos laboratoriais (artrite/artralgia [OR: 6{IC95% 1,8-19,7}] e conjuntivite [OR: 2,85 {IC95% 1,30 - 6,24}]) foram associadas a CHIK. Asensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram 85,4%, 38,7%, 71,2% e 60%, respectivamente, e a precisão foi de 0,68 [AUC: 0,68 (IC 95% 0,61-0,75)]. Mesmo considerando a necessidade de um refinamento dos critérios clínicos da OMS, o diagnóstico clínico-epidemiológico foi uma boa ferramenta para determinação dos casos de CHIK em período epidêmico, contudo os testes laboratoriais são necessários para aumentar a fidedignidade epidemiológica.

Palavras-chave.arboviroses, chikungunya, imunodiagnóstico, biologia molecular

ABSTRACT

Arboviruses have been recognized by the World Health Organization (WHO) as a global public health problem. Dengue (DEN), Zika (ZIK) and Chikungunya (CHIK) are arboviruses of great concern due to the social and economic impact generated especially in low income countries. The objective of this study was to analyze the clinical and epidemiological aspects of patients treated at the UPA Beira Mar (Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo Hospital), Duque de Caxias, RJ, Brazil, with a suggestive diagnosis of arbovirosis. A total of 172 patients with clinical suspicion of DEN, ZIK or CHIK, attended in the period from January to June 2018, had their medical records evaluated, according to the clinical-epidemiological criteria established by the WHO. The sera obtained from blood samples collected from each of the 172 patients were submitted to the molecular biology (RT-qPCR) test for detection of CHIK viral RNA. Negative samples in the molecular biology test (80/172) were submitted to immunodiagnosis (ELISA) for the determination of immunoglobulins (IgM and IgG) reactive to CHIK. Regarding the analysis of medical records, 47 (27.32%) were classified as DEN, 31 (18.02%) as ZIK and 94 (53.71%) had clinical diagnosis of CHIK, suggesting an epidemic CHIK. This table was characterized by molecular biology that detected 92/172 (53.48%) samples positive for CHIK, determining the stage of viremia in these patients. According to the serological criteria for antibody detection, a total of 18/80 (22,5%) serum samples were observed for IgM, characterizing the acute phase of the disease. This finding increases the quantitative number of samples related to the acute phase of CHIKV infection from 92/172 (53.48%) to 110/172 (63,9%), confirming the epidemiological picture already observed in molecular biology results.The analysis of clinical criteria compared to laboratories (arthritis / arthralgia [OR: 6 {95% CI 1.8-19.7}] and conjunctivitis [OR: 2.85 {95% CI 1.30 - 6.24}]) were associated with CHIK.Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 85.4%, 38.7%, 71.2% and 60%, respectively, and the accuracy was 0.68 [AUC: 0.68 (CI 95 % 0.61-0.75)].Even considering the need for a refinement of WHO clinical criteria, clinical-epidemiological diagnosis was a good tool for determining cases of CHIK in an epidemic period, however laboratory tests are necessary to increase epidemiological reliability.

Key words.arboviruses, chikungunya, immunodiagnostic, molecular biology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Países/territórios com transmissão autóctone ou casos importados de chikungunya nas Américas entre 2013-2017..... 21

Figura 2. Estrutura das partículas virais de CHIKV por microscopia eletrônica..... 23

Figura 3. Representação esquemática dos ciclos de transmissão do ZIKV..... 26

Figura 4. Organograma para diagnóstico laboratorial, de fase aguda e convalescença, para as arboviroses DEN, CHIK e ZIK. Adpatado de Rodriguez-Morales (2015)..... 30

Figura 5. Mapa do Município de Duque de Caxias dividido em distritos..... 33

Figura 6. Fórmulas para calcular sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK..... 34

Tabela 2. Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de Janeiro/2018 a Junho/2018..... 39

Tabela3. Dados demográficos dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de Janeiro/2017 a Junho/2018..... 40

Tabela 4. Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para CHIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TSI) em dias..... 41

Tabela 5. Imunodiagnóstico das amostras negativas no teste de biologia molecular (RT-qPCR), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias..... 44

Tabela 6. Características clínicas de pacientes com diagnóstico laboratorial para CHIKV frente a pacientes com clínica de arbovirose, atendidos na UPA Beira Mar de janeiro a junho de 2018..... 47

Tabela 7. Resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do trabalho..... 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados epidemiológicos retrospectivos de CHIK de 2016 a 2018, no Brasil, Rio de Janeiro e Duque de Caxias..... 17

Quadro 2. Interpretação dos resultados imunodiagnósticos para CHIKV..... 36

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Ae. aegypti	*Aedes aegypti*
Ae. albopictus	*Aedes albopictus*
CHIKV	Chikungunya vírus
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Sorotipo 1 do vírus da dengue
DENV-2	Sorotipo 2 do vírus da dengue
DENV-3	Sorotipo 3 do vírus da dengue
DENV-4	Sorotipo 4 do vírus da dengue
ECSA	África Central, Sul e Leste
FAM	6-*carboxyfluorescein*
Funasa	Fundação Nacional de Saúde
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IOL	Linhagem Oceano Índico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa e da Polimerase em Cadeia em Tempo Real
SE	Semana Epidemiológica
SGB	Síndrome de GuillainBarré
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....18
2.1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.....18
2.2. CHIKUNGUNYA.....19
2.2.1. Perfil epidemiológico no Brasil.....19
2.2.2. Agente etiológico.....22
2.2.3. Manifestações clínicas.....24
2.3. TRANSMISSÃO DOS ARBOVÍRUS.....24
2.4. DISPERSÃO VETORIAL.....27
2.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES.....28
3. OBJETIVO.....31
3.1. OBJETIVO GERAL.....31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....31
4. METODOLOGIA.....32
4.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....32
4.2. ÉTICA DA PESQUISA.....32
4.3. ÁREA DE ESTUDO.....32
4.4. ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS.....33
4.5. COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....34
4.6. IMUNODIAGNÓSTICO.....35
4.7. IDENTIFICAÇÃO VIRAL EM SORO.....36
4.7.1. Extração do RNA viral.....36
*4.7.2. Reação da transcriptase reversa e da polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)*37
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....37
5. RESULTADOS.....38
5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....38
5.2**.** BIOLOGIA MOLECULAR (RT-qPCR).....40
5.3**.** IMUNODIAGNÓSTICO.....43
5.4**.** DIAGNÓSTICO CLÍNICO *vs*LABORATORIAL.....46
6. DISCUSSÃO.....49
6.1**.** DADOS DEMOGRÁFICOS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....49

6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....51
6.3. ACURÁRIA DO DIAGNÓSTICO DE CHIK.....52
7. CONCLUSÕES 55
8. BIBLIOGRAFIA.....56
9. ANEXOS 70
9.1. ANEXO 1 71
9.2. ANEXO 2..... 72
9.3. ANEXO3.....73
9.4. ANEXO 4.....75

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são caracterizadas por um grupo de doenças virais, transmitidas por vetores (*arthropod-borne* vírus). Estas tem sido reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema global de saúde pública, em virtude de sua crescente dispersão territorial e necessidade de ações de prevenção e controle cada vez mais complexas (WHO, 2009). A designação dos arbovírus não é somente relacionada à sua veiculação através dos artrópodes, mas principalmente pelo fato de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos. Neste sentido, para classificar um artrópode como veiculador de um arbovírus é necessário que este tenha a capacidade de infectar vertebrados e invertebrados; de iniciar uma viremia em um hospedeiro vertebrado por tempo suficiente para permitir a infecção do vetor invertebrado; e de iniciar uma infecção produtiva e persistente da glândula salivar do invertebrado, a fim de fornecer vírus para infecção de outros hospedeiros vertebrados (CASSEB et al. 2013). Dessa forma, os arbovírus possuem hospedeiros variados, sejam vertebrados ou invertebrados, ocasionado doenças em humanos e em outros animais, sendo constituídos basicamente de cinco famílias virais: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae (LOPES et al. 2014).

Dentre os abovírus que apresentam maior circulação atualmente no Brasil estão dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e zika vírus (ZIKV) (BRASIL, 2015a). DENV e ZIKV pertencem a família Flaviviridae e CHIKV à família Togaviridae. A Portaria GM/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 estabelece as doenças dengue (DEN), chikungunya (CHIK) e zika (ZIK) de notificação compulsória semanal e os óbitos suspeitos como de notificação compulsória imediata (BRASIL, 2016). Contudo, em situações de surto ou epidemias, os primeiros casos suspeitos devem ser confirmados laboratorialmente e os demais seguem o padrão de diagnóstico clínico-epidemiológico (BRASIL, 2015c).

Os sinais e sintomas relacionados com as doenças causadas por estes agentes são bastante semelhantes, o que acaba interferindo no diagnóstico clínico preciso dessas doenças (RODRIGUEZ-MORALES, 2015). A confirmação laboratorial da etiologia viral para os três arbovirus tem sido realizada por meio de teste sorológico específico (ELISA), para cada vírus. Contudo, o diagnóstico considerado “padrão ouro” para as infecções por DEN, CHIK e ZIK é realizado pela detecção viral por meio da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), durante a fase aguda da

doença.

Além disso, ainda não se conhece profundamente os desdobramentos da associação desses arbovírus em um mesmo paciente, fato possível de ocorrer por estes circularem, muitas vezes, na mesma região geográfica e serem transmitidos pelos mesmos vetores, *Aedes aegypti e Aedes albopictus* (ROTH, 2014).

A incidência das arboviroses, com destaque para a DEN tem se mostrado bastante alta, assim como sua dispersão em todo território brasileiro. De acordo com os dados epidemiológicos apresentados pelo Ministério da Saúde o número de casos graves e óbitos tem sido alarmante na população brasileira (BRASIL, 2015b). O desafio enfrentado para controlar essas arboviroses, devido à complexidade das ações necessárias para tal, e a incidência de surtos em diversos países, as tornam cada vez mais preocupantes (ALENCAR et al. 2008; STAPLES et al. 2009).

No Rio de Janeiro, segundo os dados do Boletim Epidemiológico de 2016, foram notificados 83.962 casos prováveis de DEN, correspondente a uma taxa de incidência de 507,3 casos/100 mil habitantes (SES, 2016). Em 2017, segundo o levantamento da Secretaria Estadual de Saúde foram notificados 10.697 casos suspeitos de DEN, que corresponde a uma taxa de incidência de 64,3 casos/100 mil habitantes (SES, 2017). Em 2018, ainda no Estado do Rio de Janeiro, foram registrados 14.992 casos prováveis de DEN, com uma incidência de 87,4 casos/100 mil habitantes (SES, 2019).

Com relação a casos de ZIK no Rio de Janeiro, em 2016 foram notificados 68.943 casos prováveis no estado, correspondendo a uma taxa de incidência de 416,6 casos/100 mil habitantes (SES, 2016). Em 2017 houve uma redução altamente significativa, onde foram notificados 2.508 casos suspeitos de ZIK, que corresponde a uma taxa de incidência de 15,1 casos/100 mil habitantes (SES, 2017). Já em 2018 foram registrados 2.349 casos prováveis de ZIK, com taxa de incidência de 13,7 casos/100 mil habitantes (SES, 2019).

Quanto à infecção pelo CHIK, em 2016 foram notificados 15.383 casos prováveis no Estado do Rio de Janeiro, com uma taxa de incidência de 92,9 casos/100 mil habitantes. A capital concentra a maioria dos casos (89,9%) e a incidência mais elevada entre as demais áreas do Estado do Rio de Janeiro (SES, 2016). Assim como ocorreu com a DEN e ZIK, CHIK também apresentou uma diminuição significativa no ano de 2017, onde temos notificados 4.305 casos suspeitos, que corresponde a uma taxa de incidência de 25,9 casos/100 mil habitantes (SES, 2017). Em 2018 tornou a

aumentar, onde foram registrados 39.725 casos prováveis de CHIK, com uma incidência de 231,5 casos/100 mil habitantes, com 18 óbitos no estado do Rio de Janeiro (SES, 2019) **(Quadro 1)**.

Quadro 1. Dados epidemiológicos retrospectivos de CHIK de 2016 a 2018, no Brasil, Rio de Janeiro e Duque de Caxias.

Período	Localidade*	Dados epidemiológicos de CHIK		
		Casos prováveis	Casos confirmados	Incidência (/100 mil hab.)
2016	**Brasil**	271.824	151.318	55,7
	Rio de Janeiro	17.888	NR	92,9
	Duque de Caxias**	288	275	31,5
2017	**Brasil**	185.737	151.966	81.8
	Rio de Janeiro	4.305	NR	25,9
	Duque de Caxias**	141	127	15,4
2018	**Brasil**	87.687	68.962	78,6
	Rio de Janeiro	39.725	NR	232,5
	Duque de Caxias**	498	409	54,4

CHIK - Chikungunya vírus; * Dados obtidos do Ministério da Saúde - SINAN; ** Dados obtidos da Divisão de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Duque de Caxias (DVS-SMSDC).

Tratando-se separadamente do município de Duque de Caxias, o mesmo nos últimos três anos, em muitos bairros, foi classificado como de “alto risco” para apresentar uma epidemia relacionada com essas arboviroses. Isto porque, considera-se as informações da circulação desses arbovírus em Duque de Caxias e a elevada dispersão vetorial no município, favorecendo uma maior taxa de infecção da população.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

O termo “doenças negligenciadas” foi proposto em 1970 pela Fundação Rockefeller configurando todas as doenças endêmicas causadas por agentes infecciosos e parasitários em populações de baixa renda. A OMS e a organização Médicos Sem Fronteiras estabeleceram a classificação por doenças “globais” (Tipo I) “negligenciadas” (Tipo II) as transmissíveis que apresentam maior ocorrência nos países em desenvolvimento, e “mais negligenciadas” (Tipo III) exclusivas dos países em desenvolvimento (DE SOUZA, 2010). Nesse contexto a Doença de Chagas, Leishmanioses, Lepra, Malária, Filarioses, Hanseníase, Tuberculose, DENV, YFV e outras arboviroses resultam, principalmente em crianças, no desenvolvimento cognitivo prejudicado, morte e aumento da pobreza no país (OMS, 2013).

Essas enfermidades também apresentam indicadores inaceitáveis e investimentos reduzidos em pesquisas, produção de medicamentos e em seu controle (DECIT, 2010). As doenças tropicais, como a malária, a doença de Chagas, a doença do sono (tripanossomíase humana africana), a leishmaniose visceral, a filariose linfática, as arboviroses (DEN, CHIK, YF e ZIK) e a esquistossomose continuam sendo consideradas como algumas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (OLIVEIRA, 2018).

Estas enfermidades, conhecidas como doenças negligenciadas, incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida (DECIT, 2010).

Originadas entre os séculos XVIII e XIX, as políticas públicas de saúde, foram normalizadas por ações individuais, logo evoluíram para uma compreensão mais ampla sobre a influência dos determinantes sociais na instalação e prognóstico das doenças (CANADÁ, 1994). Determinantes sociais estes que, segundo a OMS, são definidos como condições sociais em que as pessoas vivem e trabalham. A partir dessa definição claramente descritiva, foi reconhecida a necessidade de entender as etiologias que resultam nas desigualdades, e a partir delas os determinantes sociais que são compreendidos como condições sociais que afetam a saúde e que podem ser alterados através de ações com base em informações (KRIEGER, 2011).

Neste contexto houve a criação da iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), uma organização de pesquisa e desenvolvimento sem fins lucrativos que trabalha com a finalidade de oferecer novos tratamentos para doenças negligenciadas, em particular, para a doença do sono, doença de Chagas, leishmaniose, infecções por helmintos específicos (filariais), malária e HIV pediátrico (DNDi 2017).

Os indicadores de saúde no Brasil são baseados principalmente em auto avaliações realizadas em diferentes populações. Esses relatórios evidenciam rotineiramente que existem fortes correlações entre morbidade, e a consequente esperança de vida com a estratificação da população por renda *per capita* e distribuição geográfica (GIOVANELLA et al. 2014).

Um estudo recente sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas revelou que menos de 5% deste financiamento foram investidos no grupo das doenças extremamente negligenciadas, ou seja, doença do sono (tripanossomíase africana), leishmaniose visceral e doença de Chagas (tripanossomíase americana), ainda que mais de 500 milhões de pessoas sejam ameaçadas por estas três doenças parasitárias. As doenças negligenciadas são um problema global de saúde pública, mas as indústrias farmacêuticas são orientadas quase sempre pelo lucro, estando o setor industrial privado focado nas doenças globais para as quais medicamentos podem ser produzidos e comercializados com geração de lucros. Com baixo poder aquisitivo e sem influência política, os pacientes e sistemas de saúde mais pobres não conseguem gerar o retorno financeiro exigido pela maior parte das empresas voltadas ao lucro (OLIVEIRA, 2018).

2.2. VÍRUS CHIKUNGUNYA

2.2.1. Perfil epidemiológico no Brasil

O CHIKV da família Togaviridae, gênero *Alphavirus* (JOHNSTON & PETERS 1996) foi descrito pela primeira vez em 1952 na Tanzânia, durante um suposto surto de DENV. Existem quatro genótipos principais provenientes da África do Sul, Central e Oriental (ECSA); Oeste africano; Ásia e Oceano Índico (IOL - originalmente do grupo ECSA) (VOLK et al. 2010). A linhagem IOL, foi responsável pelas epidemias na Ilhas do Oceano Índico e na Ásia entre 2005 a 2011. Além disso, várias dessas linhagens, abrigam mutações que aumentam a infectividade e transmissão pelo *Ae. albopictus*

(TSETSARKIN et al. 2014).

A doença causada pelo CHIKV estava, principalmente, confinada a surtos localizados na Ásia e na África, com centenas de milhares de casos (DE RANITZ, 1965). Em 2005, uma cepa de CHIKV, que provavelmente se originou no litoral do Quênia, se espalhou para as ilhas do Oceano Índico e da Índia (KARIUKI NJENGA et al. 2008). Desde então, CHIKV se espalhou pelo mundo todo, causando epidemias em diferentes territórios, sendo transmitido por *Ae. aegypti* de habitat urbano e por *Ae. albopictus* presente, principalmente, em áreas rurais. Este último tem-se adaptado cada vez mais em áreas urbanas e periurbanas (STAPLES et al. 2009). Visto que a presença de humanos está sendo cada vez maior dentro das florestas, acabam deixando recipientes propícios para oviposição e são uma fonte de sangue para alimentação dos mosquitos *Ae. albopictus*, o que justifica ainda mais a diminuição rápida da distância da borda onde foram encontrados esses mosquitos (DOS SANTOS et al. 2018)

Essa epidemia por CHIKV, que afeta milhões de pessoas, foi inédita em sua escala e provavelmente, foi impulsionada por vários fatores, que incluem o aumento do volume de viajantes, a ampla distribuição geográfica dos mosquitos vetores e a adaptação da cepa epidêmica ao *Ae. albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007). A suscetibilidade de mosquitos em regiões não endêmicas, como Austrália (VAN DEN HURK et al. 2010) e América do Norte (STAPLES et al. 2009), e a ocorrência de surtos autóctones na Itália (REZZA et al. 2012) e na França (GRANDADAM et al. 2011), mostraram que CHIKV não pode mais ser considerado como um problema dos países tropicais.

A transmissão autóctone de CHIKV no Brasil foi detectada em setembro de 2014, na cidade do Oiapoque (Amapá) (NUNES et al. 2015; PAHO, 2017b). Provavelmente, essa introdução deveu-se à epidemia que ocorreu no Caribe, em 2013, pois já havia ocorrido outras epidemias atingindo a África e a Ásia (WHO, 2013).

No decorrer do ano de 2014, foram confirmados 2.772 casos de CHIKV, distribuídos em seis estados no Brasil: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). Ocorreram registros também de casos importados, confirmados por laboratório, nos seguintes estados: Amazonas, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (BRASIL, 2015b) (**Figura 1**).

Figura 1. Países/territórios com transmissão autóctone ou casos importados de Chikungunya nas Américas entre 2013-2017.

Fonte: PAHO/WHO, 2017

No ano de 2015, foram notificados 38.499 casos suspeitos de CHIKV dos quais 1.513 foram confirmados como casos autóctones, a saber, 735 no Amapá (genótipo asiático) e 778 na Bahia (genótipo africano) (NUNES et al. 2015; BRASIL, 2018). Essas relações de casos versus genótipos foram demonstradas que durante esse período, em regiões próximas, já estavam circulando dois genótipos distintos. Outra questão importante é que ao longo das epidemias, uma vez caracterizada a transmissão sustentada de CHIKV em uma determinada área, com a confirmação laboratorial dos primeiros casos, o Ministério da Saúde recomenda que os demais casos sejam confirmados por critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2015c).

Segundo os dados epidemiológicos de 2016, foram registrados no país 277.882 casos prováveis de CHIK, com 216 óbitos (BRASIL, 2018). De acordo com dados do Boletim Epidemiológico de 2017, foram registrados 185.583 casos prováveis de CHIKV, já em 2018, foram registrados 87.687 casos prováveis de CHIKV no país com

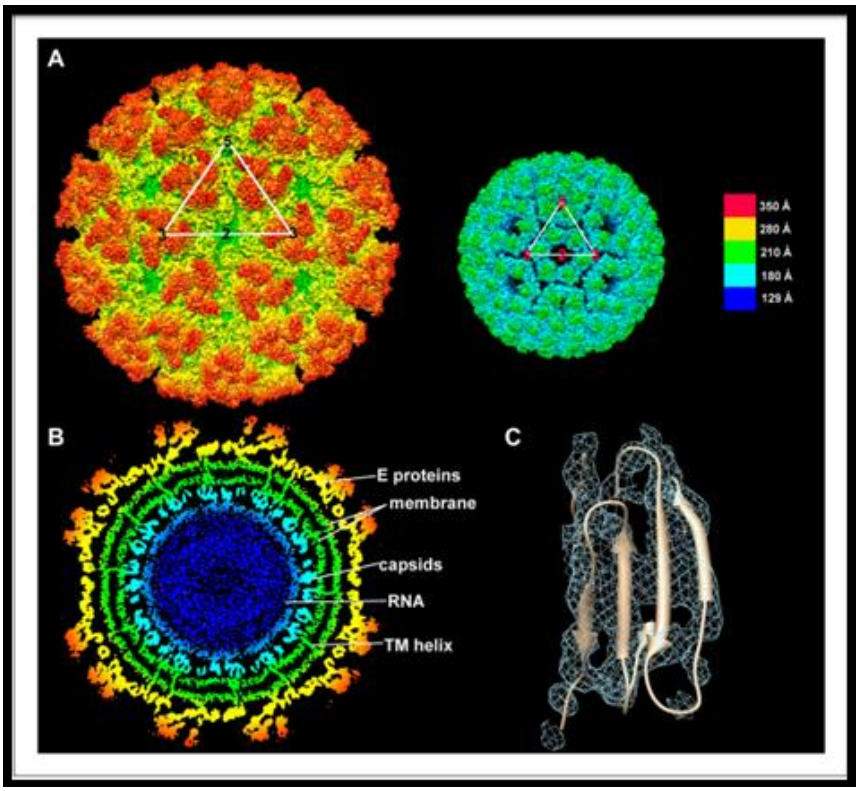
uma incidência de 42,1 casos/100 mil hab.; destes, 68.962 (78,6 %) foram confirmados. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de CHIKV (52.966 casos; 60,4%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Centro-Oeste (13.862 casos; 15,8 %), Nordeste (11.287 casos; 12,9 %), Norte (9.315 casos; 10,6 %) e Sul (257 casos; 0,3 %) (BRASIL, 2019).

2.2.2. Agente etiológico

CHIKV é envelopado e apresenta RNA de fita simples (**Figura 2**). O gênero *Alphavirus* é um conjunto de vírus de RNA de cadeia simples de sentido positivo e são transmitidos por artrópodes (GRIFFIN, 2007). O genoma do *Alphavirus* codifica quatro proteínas não estruturais e cinco estruturais. As proteínas não estruturais estão envolvidas na replicação do vírus e antagonismo imunitário, ou seja, citocinas que apresentam efeito contrário durante um processo de resposta imune. As proteínas estruturais (capsideo-E3-E2-6K-E1) são sintetizadas como uma poliproteína a partir de um promotor subgenômico, e são clivados pós-traducionalmente em proteínas separadas por uma autoproteinase e uma sinalização. A glicoproteína E1 participa na fusão celular (LESCAR et al. 2001), enquanto a glicoproteína E2 se liga a receptores celulares (SMITH et al. 1995, ZHANG et al. 2005) e inicia endocitose dependente de clatrina (SOLIGNAT et al. 2009). A montagem do núcleo de vírus é iniciada por interações entre o RNA genômico e a proteína do capsídeo nuclear (NCP) (TELLINGHUISEN et al. 1999; TELLINGHUISEN & KUHN 2000; LINGER et al. 2004) no citoplasma. A proteína E3 é essencial para a dobragem correta de p62, o precursor A E2 e a formação do heterodímero p62-E1 (MULVEY & BROWN 1995; CARLETON et al. 1997).

Embora o E3 permaneça parte do vírus da Semliki Forest (SFV) e da encefalite equina venezuelana (VEEV), aparentemente, não é um componente de CHIKV maduro (SIMIZU et al. 1984). A Proteína 6K, associa-se com o heterodímero p62-E1 e é transportada para a membrana plasmática antes da montagem. A proteína 6K facilita a morfogénese das partículas, mas não é incorporada em virions (GAEDIGK-NITSCHKO & SCHLESINGER 1990; 1991).

Figura 2. Estrutura das partículas virais de CHIKV por microscopia eletrônica.



(A) Figura sombreada de ectodomínio (esquerda) e superfície sombreada de nucleocapsideo (direita), corada de acordo com a distância radial do centro do vírus. Os triângulos brancos indicam uma unidade assimétrica icosaédrica. (B) Secção transversal do vírus mostrando densidade acima de 1,5 σ também colorida de acordo com a distância radial do centro do vírus. (C) Resolução de cadeias β no domínio E1 III. (SUN et al., 2013).

Durante os primeiros estudos, dois padrões de transmissão distintos foram descritos, um silvestre e periurbano na África (*Aedes* sp.) e outro urbano na Ásia (*Ae. aegypti*). Outros estudos indicaram que existem três genótipos circulando mundialmente (África Central, Sul e Leste - ECSA, África Ocidental - WA e Ásia) (WEAVER 2014).

Mais tarde, a transmissão autóctone ocorreu na Itália (REZZA et al. 2007) e na França (GRANDADAM et al. 2011), iniciada por viajantes infectados da Índia, derivado de pequenas mutações na proteína E1 e no E2 do envelope viral na variante ECSA, permitindo melhor adaptação viral a um novo vetor cosmopolita, *Ae. albopictus* (DONALISIO & FREITAS 2015). Assim como o ocorreu com a linhagem asiática, a do Oceano Índico (IOL) foi novamente identificada como descendente de uma estirpe enzoótica ECSA (SCHUFFENECKE et al. 2006). Essas mutações permitiram que as

novas cepas epidêmicas de IOL usassem tanto *Ae. aegypti* quanto *Ae. albopictus* como vetores, resultando em milhões de casos humanos.

2.2.3. Manifestações clínicas

CHIKV apresenta três fases no desenvolvimento da doença, sendo elas: aguda; subaguda e crônica. Os sinais e sintomas se apresentam de forma mais intensa entre as crianças e idosos, embora possa afetar indivíduos de qualquer idade ou sexo (BRASIL, 2017).

A fase aguda tem início súbito, com febre alta, exantema e artralgia, acometendo principalmente as pequenas e grandes articulações. A intensidade da dor e a incapacidade resultante dessa deram origem ao nome Chikungunya que, de acordo com o idioma africano Makonde, significa “andar curvado”. A fase aguda, com duração de até 14 dias, pode progredir para fase subaguda, caracterizada pelo agravamento da artralgia, com duração de 15 dias a 3 meses, e a remissão da febre. Em alguns casos, a doença pode evoluir para um processo crônico (acima de 3 meses), em que o acometimento articular é persistente ou recidivante, afetando as mesmas articulações atingidas na fase aguda. As articulações são doloridas, podem ou não apresentar edema, tem limitação de movimento e deformidade. O acometimento é poliarticular e simétrico, e alguns pacientes podem evoluir com artropatia destrutiva semelhante a artrite reumatoide (BRASIL, 2017; PAHO/WHO, 2017).

A apresentação clínica do CHIK, em crianças, idosos e em pacientes com comorbidades, pode evoluir com gravidade, sendo necessária uma observação diferenciada (BRASIL, 2017). As manifestações consideradas atípicas têm sido relatadas com maior frequência e incluem alterações cardíacas, renais, oculares e neurológicas (JOSSERAN et al. 2006; RENAULT et al. 2007; BEESOON et al. 2008).

A infecção durante o parto, em alguns casos, está relacionada à encefalopatia neonatal e a relatos de abortamento (GERARDIN et al. 2008, 2014; GUPTA et al. 2015). Contudo, encefalite está relatada com maior frequência em recém-nascidos de mães com infecção recente com CHIKV, no período intraparto (BRASIL, 2015c).

2.3. TRANSMISSÃO DOS ARBOVÍRUS

Os arbovírus são mantidos em um ciclo de transmissão entre hospedeiros

vertebrados e artrópodes (GUBLER, 2001). Os hospedeiros artrópodes geralmente referidos como vetores, são mosquitos que realizam repasto sanguíneo. Ao invés de uma simples alternância dentro de um único par, hospedeiro-vetor, a transmissão de arbovírus frequentemente ocorre por meio de redes de transmissão altamente complexas que incluem vários hospedeiros e vetores (DIAZ et al. 2013). Os seres humanos em particular, não estão necessariamente no centro da rede de transmissão e podem ser apenas hospedeiros acidentais (por exemplo, vírus do Nilo Ocidental).

As condições climáticas são fatores que interferem na atividade reprodutiva dos dos mosquitos vetores durante todo o ano. Na estação seca, em áreas tropicais, ou na estação fria, em regiões temperadas, ocorre uma baixa na densidade desses mosquitos adultos, interrompendo a transmissão contínua de hospedeiros para vetores e dos vetores para os hospedeiros (LEAKE, 1984; RUBEL & KOTTEK 2010).

Com isso, a sobrevivência dos mosquitos durante a estação seca e fria abrange diferentes mecanismos fisiológicos e/ou comportamentais, que interferem na transmissão do vírus de maneira diferente. A Transmissão Horizontal (TH) engloba todos os outros modos de transmissão não parental, incluindo transmissão sexual e transmissão vetorial (RUBEL & KOTTEK 2010).

A transmissão transovariana (TTO) ou vertical, refere-se à transmissão de um patógeno através da fêmea infectada, sendo ela capaz de transmitir o vírus durante toda sua vida e também para a sua prole, uma vez que a infecção atinge os tecidos germinativos. A combinação dos dois modos de transmissão permite que os patógenos persistam sob condições que levariam, de outro modo, à sua extinção (RUBEL & KOTTEK 2010). De fato, as mudanças demográficas e epidemiológicas das populações hospedeiras levam a diferentes oportunidades de transmissão de um modo ou de outro (RUBEL & KOTTEK 2010).

Quando a densidade de hospedeiros suscetíveis é baixa, a TTO se torna um elo essencial na cadeia de transmissão ou re-introdução do vírus, podendo ocorrer também pela existência de hospedeiros reservatórios (LIPSITCH et al. 1996; REEVES, 2004).

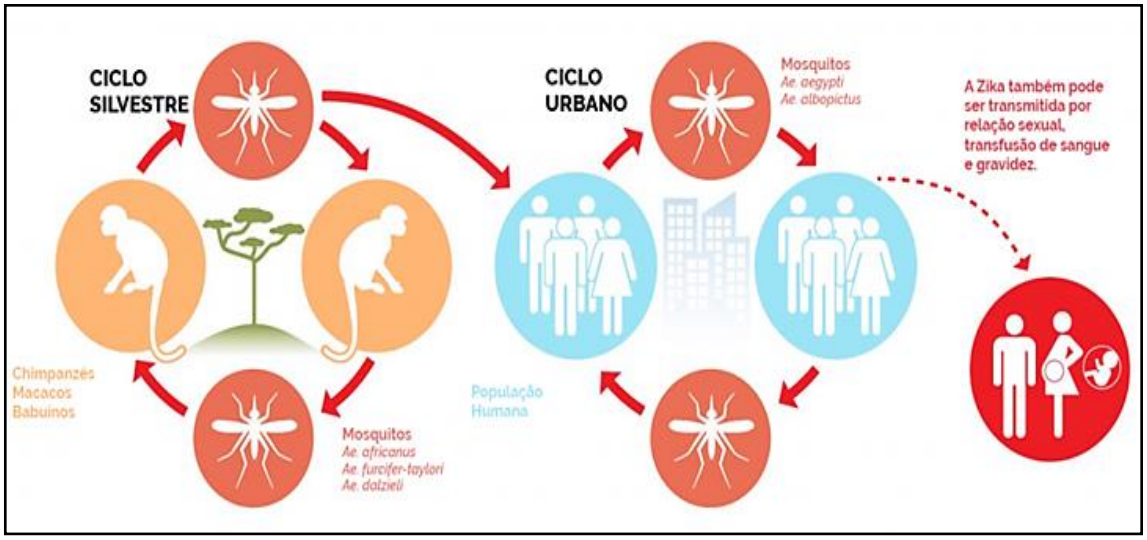
O ZIKV apresenta dois ciclos: um silvestre, envolvendo primatas não humanos e mosquitos que habitam a floresta; e outro urbano/suburbano envolvendo humanos e *Ae. aegypti* e, em menor escala, *Ae. albopictus.* Estes ciclos são compartilhados por outros três arbovirus transmitidos ao homem (DENV, CHIKV e YFV) (MONATH, 2001; VASILAKIS & WEAVER 2008; WEAVER & REISEN 2010; PETERSON et al. 2016; MUSSO & GUBLER 2016) (Figura 3). O ZIKV pode ser transmitido pelas vias

sexual, perinatal e transfusional (WHO, 2016).

Enquanto primatas não humanos têm sido, geralmente, considerados os principais reservatórios anfitriões para o ciclo de transmissão silvestre de DENV, ZIKV, CHIKV e YFV, este paradigma é baseado em escassa evidência, sobre o qual pesquisadores alertaram repetidamente que outras espécies animais podem desempenhar papéis-chave na dinâmica de transmissão desses vírus (CHEVILLON et al. 2008; HAYES, 2009; HANLEY et al. 2013; DIALLO et al. 2013).

O ancestral selvático dos ciclos de YFV, CHIKV e ZIKV ocorrem na África, enquanto o ciclo ancestral de DENV ocorre no sudeste da Ásia com posterior transporte para a África Ocidental e estabelecimento enzoótico (WANG et al. 2000). No Brasil, em 2018, foi relatada a transmissão silvestre de ZIKV em um estudo que examinou experimentalmente duas espécies de primatas neotropicais do novo mundo, podendo eles servir como hospedeiro reservatório (VANCHIERE et al. 2018; TERZIAN et al. 2018). Recentemente, um estudo com ZIKV em saguis demonstrou que os animais apresentaram as características da infecção por ZIKV em humanos. Neste caso os saguis machos não apresentaram sinais de doença clínica mesmo com viremia detectada, sendo então, soroconvertida, acarretando a proteção contra infecção subsequente pelo ZIKV (CHIU et al. 2017). O mesmo ocorreu com as saguis fêmeas grávidas, como observado anteriormente em humanos (DRIGGERS et al. 2016; TERZIAN et al. 2017) demonstrando, que ocorre replicação viral via placentária (SEFEROVIC et al. 2018).

Figura 3. Representação esquemática dos ciclos de transmissão de ZIKV.



Fonte: CDC, PLOS, Reuters. Créditos: David Foster, Laurie Garret, Doug Hasley e Gabriela Meltzer.

DENV, em contraste, não estabeleceu um ciclo de transmissão silvestre nas Américas, apesar da disseminação pela circulação do vírus nas Américas através do ciclo humano-endêmico (HANLEY et al. 2013). Atualmente, a maioria das infecções humanas pela circulação de DENV ocorre exclusivamente em ambientes domésticos e peridomiciliares ao longo dos trópicos, onde o homem serve como único hospedeiro de amplificação. Neste ciclo humano, *Ae. aegypti* é o principal vetor que transmite o DENV, enquanto outros *Aedes* spp, como por exemplo, *Ae. albopictus* e *Ae. polynesiensi,* servem como vetores secundários (CHEN & VASILAKIS 2011).

Em 2015 e 2016, a distribuição de casos de CHIKV ocorreu em locais próximos ao interior e em áreas florestais, resultando em uma sobreposição com a área do ciclo de transmissão silvestre do YFV (PAHO, 2017). Assim, é provável que o *Ae. aegypti* tenha realizado repasto sanguíneo em primatas infectados em florestas vizinhas ou em seu entorno, indo então realizar o ciclo urbano, onde o *Aedes* transmite o CHIKV para humanos. Esses mosquitos são competentes e podem iniciar um ciclo silvestre de CHIKV, como ocorre com a YFV e foi demonstrado por Lourenço de Oliveira e Failloux (2017). Com isso, o ciclo de transmissão silvestre no Novo Mundo, teria consequências imediatas na saúde pública, já que é difícil controlar a circulação enzoótica do CHIKV (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA & FAILLOUX 2017).

2.4. DISPERSÃO VETORIAL

A partir da década de 50, o Brasil passou a apresentar um processo de urbanização cada vez mais acelerado, principalmente pela intensidade da industrialização, mais especificamente, a partir da segunda metade do século XX. O crescimento urbano impactado pelo desenvolvimento econômico afetou negativamente a saúde da população, essencialmente pelo planejamento inadequado de novas áreas habitacionais que foram surgindo ao longo dos anos, favorecendo assim a emergência de potenciais vetores geradores de arboviroses na população nacional (DE MELO-SANTOS et al. 2009).

Com o passar dos anos, em meados dos anos 70, a América do Sul, além de abrigar boa parte da população mundial, também foi caracterizada por uma área propícia a potenciais criadouros de vetores, como *Ae. aegypti*. Isto restabeleceu a incidência da DEN no país, o que tem sido até hoje um problema de saúde pública

(HORTA et al. 2013). A rápida urbanização na América Latina e na Ásia favoreceu a dispersão dos principais vetores da DEN, CHIK e ZIK. Outro fator que também ajudou muito nesse processo foi o aumento do número de viajantes para América do Norte, Austrália e Japão (SCHWARTZ et al. 2008; STREIT et al. 2011).

Oriundo das florestas do sudeste asiático, *Ae. albopictus* se expandiu nas últimas três décadas para vários países das Américas, da África Central, da Europa, nas Ilhas dos Oceanos Pacífico e Índico e ainda no continente australiano. Essa dispersão tão rápida se deu pela facilidade do transporte dos seus ovos e pela habilidade que os mesmos apresentam em entrar em diapausa (RAMASAMY et al. 2011).

No ano de 1986, no estado do Rio de Janeiro, ocorreu o primeiro registro do *Ae. albopictus,* seguido no mesmo ano em São Paulo e Minas Gerais, e o ano seguinte no Espírito Santo, disseminando-se em apenas um ano para todos os estados da região Sudeste. A partir dessa caracterização, observa-se a crescente e desordenada expansão deste vetor em todo o país, que vem se adaptando mais e melhor às regiões urbanizadas (CASTRO et al. 2004; FERNANDES et al. 2004).

Uma grande infestação territorial de *Ae. aegypti* nas ilhas caribenhas, no final dos anos 70, culminou no aumento de casos de CHIK, que foi relacionado a três fatores: 1) a epidemia ocorreu na estação chuvosa, aumentando a população de vetores; 2) níveis elevados de transporte comercial na região, bem como uma grande população transitória temporariamente empregada nestas áreas; e 3) decréscimo na implementação de medidas de controle que levou a um aumento na infestação de vetores (FERNÁNDEZ-SALAS et al. 2015).

2.5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

As manifestações clínicas da DEN, ZIK e CHIK, na maioria dos casos, se apresentam de forma muito parecida, dificultando o diagnóstico clínico diferencial entre estas três arboviroses. Desta forma, os exames complementares são imprescindíveis para determinação de um diagnóstico conclusivo (**Figura 4**).

A técnica de imunodiagnóstico utilizada nesse estudo foi o ELISA, que baseia-se na identificação de antígenos ou anticorpos, marcados com uma enzima que age sobre um substrado e a reação que ocorre, muda o cromógeno de cor. Essa reação imunoenzimática é realizada dentro de microplacas com 96 poços, onde são adicionados os reagentes. O método utilizado nesse estudo foi o indireto, onde são detectados

anticorpos presentes no soro do paciente. Nesse caso, o antígeno fica aderido aos poços da placa, e ao colocar o soro seguido de um anticorpo com marcação da enzima que reage com o substrato, ocorre a mudança na coloração, indicando a presença do anticorpo indicando que a amostra é positiva e os poços que não mudarem de cor, indicam amostra negativa devido a ausência do anticorpo.

Nos casos de DENV, a secreção da proteína viral não estrutural NS1 de células infectadas pelo vírus possibilita o diagnóstico precoce, pois NS1 pode ser detectada em amostras de sangue e de tecidos em até nove dias após o início da febre (SIMMONS et al., 2012). O diagnóstico definitivo das infecções por DENV, CHIKV e ZIKV é realizado com a detecção viral por meio da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) durante a fase aguda da infecção, que ocorre desde o primeiro até o quinto dia do início dos sintomas. Essa análise molecular possibilita a diferenciação destas arboviroses, resultando em diagnóstico conclusivo. Faye et al. (2014) relataram que o PCR em tempo real, em contraste com os ensaios sorológicos convencionais, tem muitas vantagens, incluindo a rapidez, especificidade, avaliação quantitativa, baixa taxa de contaminação e facilidade de padronização, permitindo a otimização do diagnóstico diferencial das infecções arbovirais em locais onde estes arbovírus cocirculam. Contudo, os testes de biologia molecular ainda são mais caros, não estão amplamente disponíveis e limitam-se ao diagnóstico na curta fase de viremia, dessas arboviroses.

A confirmação laboratorial da etiologia viral para as três condições exantemáticas (DENV, CHIKV e ZIKV) tem sido realizada por meio de teste sorológico específico (ELISA) para cada vírus. Esse teste é preconizado a partir do 6º dia de infecção, após o estabelecimento do quadro clínico. A soroconversão para IgM caracteriza a fase aguda da infecção, assim como o aumento em 4 vezes sobre título de IgG em amostras pareadas do soro do paciente, indica que houve uma infecção prévia.

Devido à reação cruzada do DENV com outros flavivírus, como o ZIKV, os resultados sorológicos não apresentam uma especificidade confiável, enfatizando a necessidade de se priorizar o diagnóstico diferencial na fase aguda da doença (BRASIL, 2015). Por isso, os testes moleculares são mais confiáveis e são utilizados comumente para confirmar casos suspeitos (CAMPOS et al.,2015; MALAKAR et al., 2016), em paralelo alguns pesquisadores também utilizam a cultura celular com o vírus inoculado que é o padrão ouro para diagnóstico, porém é um procedimento que demanda tempo e além disso deve ser realizado em laboratório com nível de segurança biológico 3.

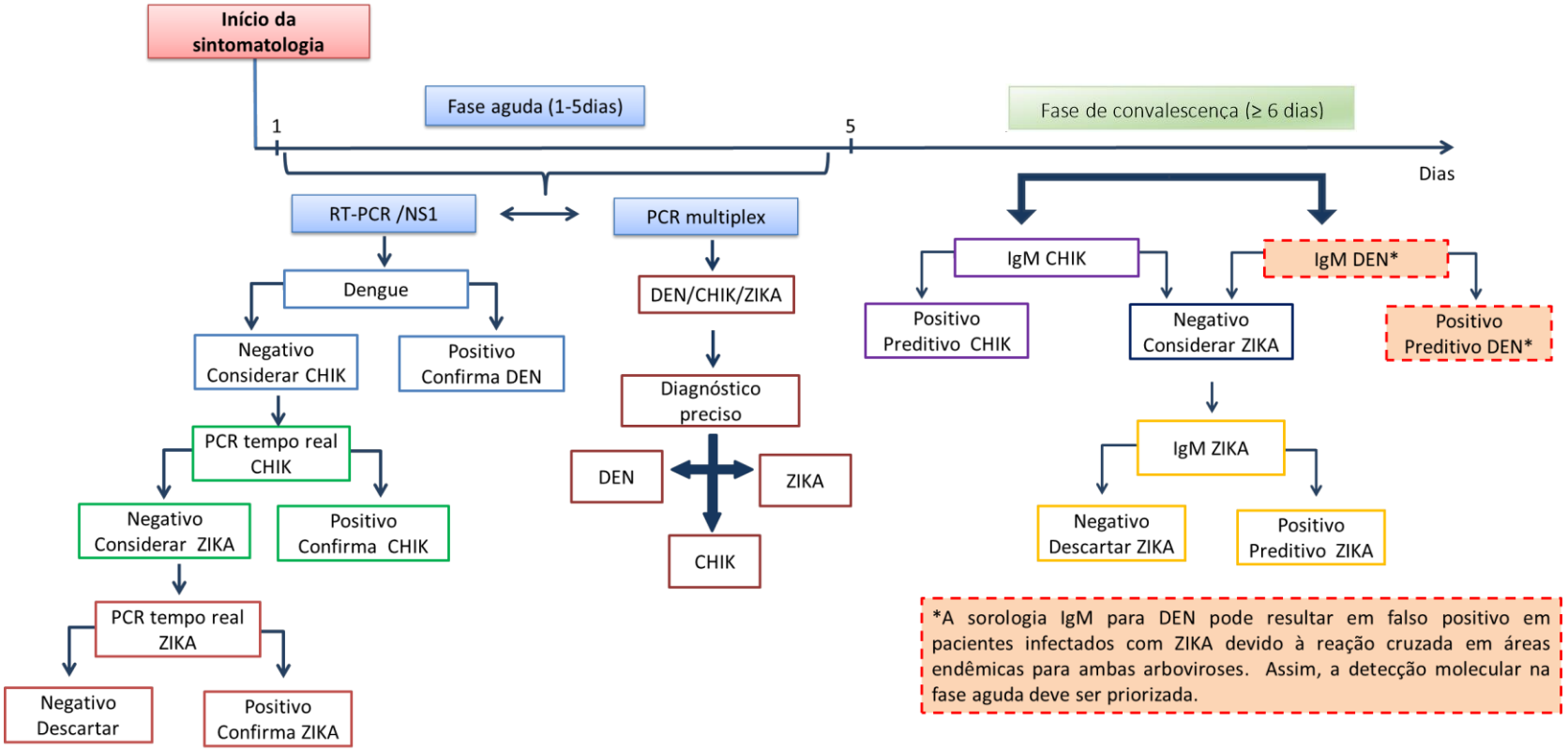


Figura 4. Organograma para diagnóstico laboratorial, de fase aguda e convalescença, para as arboviroses DENV, CHIKV e ZIKV. Adpatado de Rodriguez-Morales (2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes atendidos em uma unidade de emergência na Baixada Fluminense, com diagnóstico sugestivo de arboviroses.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, através dos sinais e sintomas, os pacientes suspeitos de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK) atendidos na unidade de saúde estudada, através de um formulário de coleta de dados estruturado;
- Correlacionar os sinais e sintomas identificados nos prontuários com a faixa etária e gênero, de acordo com a arbovirose (DEN, ZIK e CHIK);
- Realizar o diagnóstico laboratorial para o CHIKV, por meio do imunodiagnóstico (ELISA) e biologia molecular (RT-qPCR), das amostras dos pacientes com suspeita clínica de arboviroses;
- Avaliar a acurácia do diagnóstico clínico/epidemiológico de CHIK frente ao diagnóstico laboratorial (Biologia Molecular e Imunodiagnóstico).

4. METODOLOGIA

4.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

A fundamentação teórica foi realizada durante todo período de desenvolvimento da pesquisa, com base em revisão bibliográfica de materiais já publicados na literatura científica e em manuais de domínio público divulgados por órgãos governamentais nacionais e internacionais. Estão sendo utilizados para a pesquisa bibliográfica os termos de indexação: arboviroses; imunodiagnóstico; diagnóstico clínico e Chikungunya, disponíveis nas principais bases de dados científicos, dentre elas: Bireme; MEDLINE; LILACS; e Scielo.

4.2. ÉTICA DA PESQUISA

Conforme resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UNIGRANRIO) e aprovada sob CAAE 54544316.3.0000.5283 **(Anexo 2)**, parecer nº 2.743.874 . Todos os participantes tomaram ciência da pesquisa, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) **(Anexo 3)** que foi disponibilizado antes do procedimento de coleta de sangue dos mesmos.

4.3. ÁREA DE ESTUDO

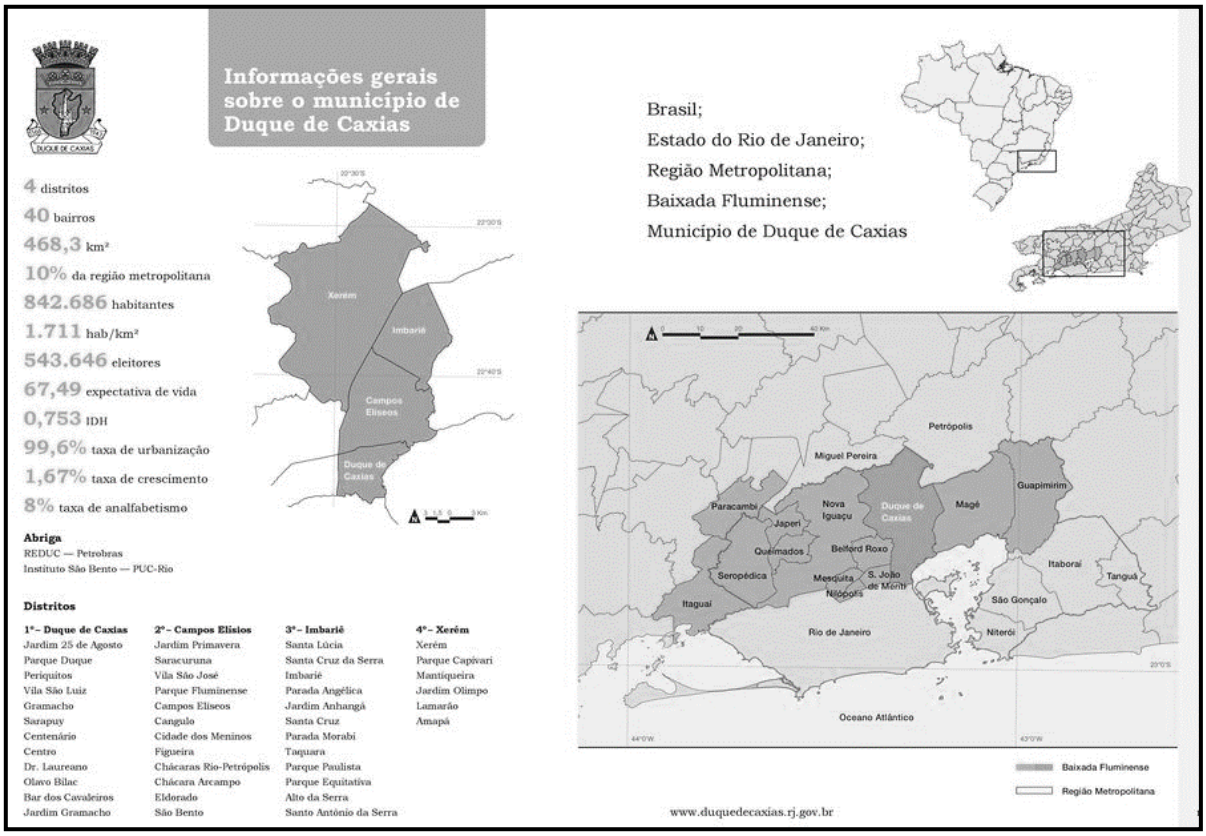
Inicialmente em 1950, o município de Duque de Caxias foi dividido de dois distritos: Duque de Caxias e Imbariê. Quatro anos depois, foram criados os distritos de Campos Elyseos e Xerém, ambos desmembrados do distrito de Imbariê e anexados ao município de Duque de Caxias. Atualmente são considerados quatro distritos: Duque de Caxias, Campos Elyseos, Imbariê e Xerém **(Figura 5)**.

Duque de Caxias é um município brasileiro do interior estado do Rio de Janeiro, integrante da Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, situado na região da Baixada Fluminense, figurando como o terceiro município mais populoso do estado, depois da capital e de São Gonçalo. Com uma população de 855.048 habitantes, é dividida em 443.974 (51.92%) de mulheres e 411.074 (48.08%) de homens (IBGE, 2010) e possui um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,711.

A Unidade de Pronto Atendimento (UPA) Beira Mar, *locus* da pesquisa, localizada na

mesma área do Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo, 1º distrito de Duque de Caxias, é o principal estabelecimento de saúde pública deste município. Esta Unidade funciona 24 horas e é responsável pelo atendimento diurno de cerca de 600 pacientes por dia.

Figura 5. Mapa do Município de Duque de Caxias dividido em distritos.



Fonte: http://www.nima.puc-rio.br/sobre_nima/projetos/caxias/mapas.html

4.4. ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

A análise dos prontuários foi realizada de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pelo OMS (WHO, 2009) e ratificada pelo Ministério da Saúde (BRASIL 2018), tendo um perfil de estudo quantitativo e descritivo realizado em parceria com a SMS-PMDC, na UPA Beira Mar (Hospital Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo), localizada em Duque de Caxias, RJ. Os prontuários foram fotografados e armazenados em formato JPG e em seguida salvos em pastas com identificação das iniciais ou por numeração para serem analisados *a posteriori* por meio de um formulário estruturado **(Anexo 1)**.

Aqueles prontuários que apresentaram sintomatologia que direcionavam para uma das arboviroses estudadas foram alocados nas categorias DEN; ZIK ou CHIK **(Tabela 1)**

Tabela 1. Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK.

CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AVALIAÇÃO		
DEN	**CHIK**	**ZIK**
Discrasia	Artralgia moderada a intensa	Hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido
Eventos sistêmicos	Artrite	Exantema pruriginoso

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão e exclusão dos prontuários médicos obtidos:

- *Critérios de inclusão:* pacientes, sem distinção de gênero e idade, que tinham diagnóstico clínico-epidemiológico de DEN, CHIK ou ZIK; pacientes que apresentassem endereço no município de Duque de Caxias, RJ.; pacientes atendidos de Janeiro a Junho de 2018.
- *Critérios de exclusão:* pacientes com sintomatologia que não caracterizasse as arboviroses (DEN, CHIK e ZIK); morador de área diferente aquela do presente estudo; pacientes cujos prontuários não tivesse os dados avaliados no estudo preenchidos corretamente ou ilegíveis.

As variáveis colhidas foram: idade, gênero e tempo de início dos sintomas (TIS). Além dos sinais e sintomas, como descritos na **Tabela 1**.

4.5. COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Foram coletadas amostras sanguíneas de pacientes que deram entrada na UPA Beira Mar no período de Janeiro a Junho de 2018, com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). A equipe responsável pela coleta foi composta por estudantes de pós-

graduação (PPGBIOTRANS) e de graduação da UNIGRANRIO, bolsistas de iniciação científica. Os estudantes foram divididos em duplas, de forma a cumprirem as atividades de coleta, de segunda a sexta-feira, nos turnos manhã (8h às12h) e tarde (13h às 17h).

A coleta de sangue total (10 - 15 mL) foi feita através de venupuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugado para retirada do soro, de acordo com as diretrizes de coleta de sangue da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). As amostras de soros foram identificadas, aliquotados e armazenados em tubos plásticos tipo *Eppendorf* e congelados em *freezer* a -20^{o}C, no laboratório de análises clínicas do Hospital Moacyr Rodrigues do Carmo, por no máximo três dias. Posteriormente, foram transportadas congeladas em caixas específicas para transporte de amostra biológicas em carro particular, até o freezer -80^{o}C localizado no Laboratório de Genética Humana (LABGEN) da UNIGRANRIO, onde permaneceram até a realização das análises laboratoriais diagnósticas (sorologia e biologia molecular).

4.6. IMUNODIAGNÓSTICO

Para a realização do diagnóstico sorológico, as amostras de soro foram submetidas aos testes imunológicos que permitem identificar, separadamente, a presença de anticorpos IgM e IgG para CHIKV. Os testes de imunodiagnóstico foram realizados no Laboratório de Pesquisas Multidisciplinares em Odontologia (LAMP), localizado na UNIGRANRIO. Os kits utilizados para detecção de anticorpos IgM e IgG deste arbovirus são da XGEN (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil). As reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, e se baseiam em testes de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para verificar as reações antígeno-anticorpo, que acabam por se tornar detectáveis através de reações enzimáticas. As microplacas utilizadas neste kit são revestidas com antígeno sintético imunodominante derivado da região ENV de CHIKV. Na primeira incubação, a fase sólida é tratada com amostras diluídas diretamente nos poços e se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo. Após a lavagem, todos os componentes presentes nos poços são descartados, mantendo apenas a ligação antígeno-anticorpo. Na segunda incubação, a ligação antígeno-anticorpo é detectada através da adição de anticorpos dirigido contra imunoglobulinas da espécie anti hlgM marcados com peroxidase (HRP). A enzima capturada na fase sólida, que atua sobre a mistura de substrato/cromogênio, gera um sinal óptico que é proporcional à quantidade de anticorpos

anti-CHIKV (IgM ou IgG) presentes na amostra.

As amostras foram consideradas positivas para CHIKV quando os valores se mostraram maiores do que o *cut-off*, de forma que após a leitura da densidade ótica no final do teste, foi feito um cálculo do ponto de corte, a partir de onde os resultados foram interpretados como reagentes. Já os negativos, foram baseados nos resultados abaixo do *cut-off*, como não reagentes ou indeterminados **(Quadro 2)**. Também foram consideradas positivas as amostras cujo valor do *cut-off* foi 4 vezes maior para IgM quando comparado com IgG.

Quadro 2. Interpretação dos resultados imunodiagnósticos para CHIKV.

CHIKV	
S/Co	**Interpretação**
<0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Indeterminado
>1,1	Positivo

S/Co – Valor de corte

4.7. IDENTIFICAÇÃO VIRAL EM SORO

4.7.1. Extração do RNA viral

Para extração do RNA viral de cada amostra de soro, foi utilizado o kit *QIAamp*® Viral Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. O mesmo permitiu que a amostra fosse lisada, em excelentes condições. Dessa forma, o pH da solução, após ajuste, promove a ligação do RNA na membrana de sílica-gel, em seguida ocorram lavagens, para o descarte dos contaminantes. Com isso, o RNA purificado foi diluído em um tampão livre de RNases (FAYE et al. 2013).

A quantificação do RNA foi realizada com o espectrofotômetro *NanoDrop*®. Os RNAs eluídos foram mantidos em freezer -80°C (COSTA et al. 2009) até a amplificação através da reação de transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-

PCR) em tempo real. A extração foi realizada no Laboratório de Virologia Molecular (LVM) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.7.2. Reação da transcriptase reversa e da polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)

Para detecção da presença de ácido nucléico de CHIKV, cada amostra de RNA obtida pela extração foi submetida à uma reação de transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR). Para isso, foi utilizado um kit de RT-PCR *One Step*, contendo reagentes capazes de realizar a reação da transcrição reversa utilizando oligonucleotídeos específicos para a região alvo gerando um cDNA complementar específico para a região de amplificação. Para investigar a presença do CHIKV foram utilizados iniciadores e sondas específicos para a região de interesse do genoma viral. Os iniciadores e sondas utilizados foram sintetizados numa estratégia de *Primetime* qPCR® (IDT, Integrated DNA Technologies). Nessa metodologia, a sonda e oligonucleotídeos específicos foram adicionados numa mistura contendo todos os reagentes necessários para amplificação da região de interesse (LANCIOTTI et al. 2007). O kit One-step RT-PCR utilizado foi o kit *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix*, (Thermofisher Scientific).

Os valores limites de ciclo (*Cicle thresholds* [CT]) abaixo de 38,5 foram considerados positivos seguindo as diretrizes do CDC (LANCIOTII et al. 2008). Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas, incluindo controles negativos e positivos.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações obtidas dos prontuários (idade, gênero e sintomas), assim como o cálculo das médias e medianas foram planilhadas utilizando o programa computacional *Microsoft® Excel*. A análise estatística descritiva quali-quantitativa foi realizada pelo uso do programa *Bioestat®* versão 5.0, aplicando o teste do chi-quadrado e teste exato de Fisher. Valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo (AYRES, 2007).

Para a definição de caso suspeito de CHIK, de acordo com a OMS, foram calculadas medidas de precisão, sensibilidade, especificidade, valor predito positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) e seus correspondentes intervalos de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Entre os meses de Janeiro e Junho de 2018 foram coletadas 172 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar (Hospital Municipal Moacir Rodrigues do Carmo) com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). Destas amostras, 47 (27.32%) foram classificadas como DEN, 31 (18.02%) como ZIK e 94 (53.71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugere um quadro epidêmico de CHIK no período estudado.

Na última estimativa demográfica para a região estudada (IBGE, 2016), foi observado um quantitativo total da população do município de Duque de Caxias de 914.383 habitantes, sendo 444.445 (49,6%) do gênero masculino e 469.938 (51,4%) do gênero feminino.

O calculo da idade mediana dos pacientes do presente estudo foi de 41 anos (intervalo entre 01 e 73 anos). O gênero feminino corresponde a 90/172 (52.32%).

Na análise individual das arboviroses observou-se diferença significativa (p=0,0263), entre ambos os gêneros, apenas para os casos prováveis de ZIK **(Tabela 3)**.

Levando em consideração a população estimada da região estudada, estratificada nas faixas etárias de <20 e ≥60 anos (392.201) e 20 a 59 anos (522.182), observou-se diferença significativa (p=0,002) para ZIK e CHIK **(Tabela 3)**. Tal diferença foi impulsionada pela quantitativo de casos prováveis do gênero feminino para ZIK e masculino para CHIK.

Com relação aos dados demográficos, entre o total de casos de DEN, ZIK e CHIK, a incidência de CHIK foi de 10/100.000 hab., sensivelmente maior do que as observadas para ZIK (3/100.000 hab.) e DEN (5/100.000 hab.). Na determinação da incidência das arboviroses por gênero, observou-se semelhança entre homens e mulheres, que apresentaram um quantitativo de 18/100.000 hab. e 19/100.000 hab., respectivamente. Porém, as chances de ocorrer (*odds ratio*) DEN e CHIK foi maior para os homens, já ZIK apresentou uma maior possibilidade de ocorrer nas mulheres. Dentro das faixas etárias, a incidência foi maior na de 20 a 59 anos, para as três arboviroses. Contudo, as chances de ocorrer (*odds ratio*) ZIK nesta faixa etária foi mais que o dobro quando comparada as demais arboviroses estudadas **(Tabela 3)**.

Tabela 2. Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de Janeiro a Junho/2018.

	Janeiro a Junho/2018		
	DEN	**ZIK**	**CHIK**
Gênero	n = 47 (%)	n = 31 (%)	n = 94 (%)
Masculino	25 (53.2)	8 (25.8)	49 (52.1)
Feminino	22 (46.8)	23 (74.2)	45 (47.9)
p-values (α=0.05)*	0,6274	**0,0263**	0,5620
Faixa etária			
<20 e ≥60	15 (31.2)	4 (13.0)	25 (26.6)
20 a 59	32 (68.8)	27 (87.0)	69 (73.4)
p-values (α=0.05)*	0,1481	**0,002**	**0,002**
Sintomas			
Febre <38.5 C	20 (44,4)	14 (46,7)	36 (38,3)
Febre >38.5C	25 (55,6)	16 (53,3)	58 (61,7)
Exantema	2 (4,4)	30 (100)	23 (24,5)
Prurido	1 (2,2)	27 (90)	2 (2,1)
Mialgia	29 (64,4)	20 (66,7)	72 (76,6)
Artralgia leve	30 (66,7)	15 (50)	3 (3,2)
Artralgia mod/int.	1 (2,2)	13 (43,3)	91 (96,8)
Artrite	0 (0)	12 (40)	77 (81,9)
Conjuntivite	2 (4,4)	12 (40)	34 (36,2)
Cefaléia	35 (77,8)	22 (73,3)	74 (78,7)
Gânglio	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Discrasia	4 (8,8)	0 (0)	0 (0)
Neurológico	1 (2,2)	0 (0)	3 (3,2)

DEN - Dengue; ZIK - Zika; CHIK - Chikungunya; *Teste Qui-quadrado; mod/int. – moderada/intensa.

Quanto aos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, entre os 45 casos suspeitos de DEN, a mialgia (29/45; 64.4%), artralgia leve (30/45; 66.7%) e cefaleia (35/45; 77.8%) foram os mais observados, além de 4/45 (8,8%) pacientes que apresentaram sintomas de discrasia. O exantema (30/30; 100%) e o prurido (27/30; 90%) foram observados principalmente nos pacientes suspeitos de ZIK, que apresentaram ainda hiperemia conjuntival em 12/30 (40%). Os pacientes suspeitos de CHIK apresentaram a artralgia moderada/intensa

(91/94; 96,8%), artrite (77/94; 81,9%) e conjuntivite (34; 36,2%) como sintomas mais relevantes **(Tabela 2)**.

Tabela 3. Dados demográficos dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (RJ) no período de Janeiro a Junho/2018.

	Incidência por 100.000 hab.			**Chances de Ocorrer (*Odds Ratio*)**		
Gênero	**DEN**	**ZIK**	**CHIK**	**DEN**	**ZIK**	**CHIK**
Masculino	05	02	11	0,83	2,60	0,87
Feminino	04	05	10			
Total	05	03	10	-	-	-
Faixa Etária						
<20 e >=60	04	01	06	1,66	4,88	2,07
20-59 anos	06	05	13			
Total	05	03	10	-	-	-

DEN - Dengue; ZIK - Zika; CHIK - Chikungunya; hab. - habitantes.

5.2. BIOLOGIA MOLECULAR (RT-qPCR)

Todas as 172 amostras sanguíneas coletadas de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK) foram avaliadas pelo teste de biologia molecular, por meio do RT-qPCR, para identificação viral (CHIKV) em fase aguda de infecção. Destas, 92 (53.48%) foram consideradas positivas para CHIKV o que determina que esses pacientes estavam no curto estagio de viremia **(Tabela 4)**. Este percentual sugere um quadro epidêmico de CHIK no período e local estudado.

Das 92/172 (53.48%) amostras positivas, 65/92 (70,6%) apresentaram clínica sugestiva para CHIK e 27/92 (29,4%) tinham clínica sugerida para outra arbovirose (DEN ou ZIK). Quando avaliado o TIS dos pacientes com ou sem clínica sugestiva, observou-se uma média de 2,27 dias **(Tabela 4)**. Este TIS esta condizente com o período de viremia para esta arbovirose, que varia de 0 a 6 dias após a infecção.

Tabela 4. Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para CHIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho/2018			
	CHIKV			
	TIS (dias)	Clínica	CT	RT-qPCR
7	-	NP	30,66	POS
10	-	NP	23,55	POS
11	-	P	22,48	POS
14	-	NP	30,37	POS
37	-	NP	15,49	POS
39	3	P	28,67	POS
43	7	P	22,2	POS
46	1	P	20,31	POS
49	-	P	25,53	POS
50	1	P	21,74	POS
52	-	P	30,68	POS
53	-	P	19,45	POS
54	4	P	27,3	POS
57	-	P	18,97	POS
60	2	P	17,86	POS
61	1	NP	18,75	POS
65	4	NP	31,47	POS
66	-	P	14,73	POS
71	1	NP	18,78	POS
72	-	P	25,41	POS
75	4	NP	29,92	POS
76	2	P	21,84	POS
78	1	P	18,42	POS
79	2	P	17,08	POS
81	-	P	19,32	POS
82	3	P	30,13	POS
83	2	P	19,84	POS
85	1	P	22,05	POS
87	-	NP	25,57	POS
89	1	P	20,08	POS
90	3	NP	33,04	POS
91	2	P	16,74	POS
92	1	P	19,19	POS
93	2	P	26,7	POS
94	1	P	32,01	POS

CHIKV – vírus Chikungunya; POS – positivo; NP – não provável; P – provável; TSI – tempo de início dos sintomas, "–" sem informação.

Tabela 4 ***(CONTINUAÇÃO).*** Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para CHIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho/2018			
	CHIKV			
	TIS (dias)	Clínica	CT	RT-qPCR
96	1	P	24,97	POS
97	2	P	19,35	POS
99	3	NP	19,91	POS
101	2	P	24,94	POS
106	2	P	17,84	POS
107	-	P	19,57	POS
110	1	P	20,46	POS
111	-	P	24,19	POS
112	-	NP	25,95	POS
114	1	P	20,04	POS
115	1	P	25,23	POS
116	0	P	19,62	POS
117	1	P	23,45	POS
118	3	P	25,14	POS
119	1	P	24,57	POS
120	4	P	18,07	POS
121	2	NP	22,82	POS
124	3	NP	33,1	POS
126	3	P	23,02	POS
128	-	P	21,72	POS
129	-	P	30,22	POS
130	2	P	18,47	POS
132	2	P	24,72	POS
133	-	P	32	POS
134	1	P	22,77	POS
135	2	P	20,01	POS
136	2	NP	26,36	POS
143	-	NP	23,22	POS
145	-	NP	30,09	POS
147	-	NP	18,05	POS
148	-	NP	19,57	POS
149	-	P	23,77	POS
150	-	NP	25,62	POS
152	-	NP	24,85	POS
153	-	P	21,72	POS
154	1	P	19,72	POS
155	-	NP	24,84	POS
157	1	P	21,03	POS
158	1	NP	20,22	POS

CHIKV – vírus Chikungunya; POS – positivo; NP – não provável; P – provável; TSI – tempo de início dos sintomas, "–" sem informação.

Tabela 4 ***(CONTINUAÇÃO).*** Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para CHIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho/2018			
	CHIKV			
	TIS (dias)	Clínica	CT	RT-qPCR
159	2	P	24,37	POS
161	1	NP	24,73	POS
163	-	P	21,74	POS
164	1	P	18,1	POS
165	-	P	18,83	POS
166	-	P	22,01	POS
167	1	P	16,27	POS
168	2	P	21,8	POS
170	3	NP	24,08	POS
171	5	NP	32,01	POS
174	2	P	14,76	POS
176	-	NP	23,66	POS
179	1	P	16,45	POS
180	-	P	15,64	POS
181	3	P	18,75	POS
184	6	P	27,61	POS
185	4	P	27,66	POS
187	3	P	25,22	POS

CHIKV – vírus Chikungunya; POS – positivo; NP – não provável; P – provável; TSI – tempo de início dos sintomas, "–" sem informação.

5.3. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)

Foram submetidas ao imunodiagóstico, para detecção de IgM e IgG para CHIKV, um total de 80 amostras com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK) e diagnóstico negativo na biologia molecular (80/172; 46.5%). Isto porque o teste de biologia molecular (RT-qPCR) é considerado "padrão ouro" para detecção viral em fase aguda.

De acordo com os critérios sorológicos de detecção de anticorpos foi observado um total de 18/80 (22,5%) amostras soro reagentes para IgM, enquanto que 14/80 (17,5%) foram soro reagentes para IgG. Foram observadas ainda 03/80 (3,75%) como indeterminadas para IgM **(Tabela 5)**.

Tabela 5. Imunodiagnóstico das amostras negativas no teste de biologia molecular (RT-qPCR), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho/2018					
	CHIKV					
	TIS (dias)	Clínica	*Cut-off*	IgM	*Cut-off*	IgG
3	-	NP	0,535	NEG	0,501	NEG
4	-	NP	0,555	NEG	0,528	NEG
5	-	NP	0,28	NEG	0,139	NEG
6	-	P	**4,818**	**POS**	**12,861**	**POS**
8	-	NP	0,361	NEG	0,152	NEG
9	-	NP	0,341	NEG	0,132	NEG
12	-	P	0,277	NEG	0,149	NEG
13	-	NP	0,311	NEG	0,152	NEG
15	-	NP	0,571	NEG	0,139	NEG
16	-	NP	0,318	NEG	0,176	NEG
17	-	NP	0,564	NEG	0,28	NEG
18	-	NP	0,304	NEG	0,152	NEG
19	-	NP	0,301	NEG	0,152	NEG
21	-	NP	0,267	NEG	0,145	NEG
22	-	NP	0,314	NEG	0,491	NEG
23	-	NP	0,322	NEG	0,402	NEG
24	-	NP	0,475	NEG	0,518	NEG
25	-	NP	0,934	INDET	0,62	NEG
26	-	NP	0,368	NEG	0,57	NEG
27	-	NP	0,311	NEG	0,419	NEG
28	-	NP	0,453	NEG	0,528	NEG
29	-	NP	0,376	NEG	0,481	NEG
31	1	NP	0,699	NEG	0,607	NEG
35	4	NP	0,368	NEG	0,567	NEG
38	3	P	0,291	NEG	0,603	NEG
40	5	P	0,365	NEG	0,534	NEG
41	15	P	**5,555**	**POS**	**2,092**	**POS**
42	9	P	0,566	NEG	**1,237**	**POS**
45	-	P	0,388	NEG	0,557	NEG
47	3	NP	0,651	NEG	0,58	NEG
48	5	P	0,549	NEG	0,521	NEG
51	14	NP	0,351	NEG	1,062	INDET
55	-	P	**2,997**	**POS**	**1,897**	**POS**
56	-	NP	**5,705**	**POS**	**12,29**	**POS**
58	3	NP	0,368	NEG	0,514	NEG
59	-	NP	0,371	NEG	0,63	NEG
62	2	P	0,334	NEG	0,531	NEG
63	2	NP	0,291	NEG	0,518	NEG
64	-	P	**7,186**	**POS**	**12,369**	**POS**

CHIKV – vírus Chikungunya; NEG – negativo; POS – positivo; IND – indeterminado, NP – não provável; P – provável; " – " sem informação.

Tabela 5 (CONTINUAÇÃO). Imunodiagnóstico das amostras negativas no teste de biologia molecular (RT-qPCR), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TSI) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho/2018					
	CHIKV					
	TIS (dias)	Clínica	*Cut-off*	IgM	*Cut-off*	IgG
67	5	NP	0,286	NEG	0,537	NEG
68	7	NP	0,447	NEG	0,455	NEG
69	3	NP	0,365	NEG	0,557	NEG
70	4	P	0,362	NEG	0,745	NEG
73	9	P	**2,093**	**POS**	**3,521**	**POS**
74	3	NP	0,421	NEG	0,522	NEG
77	6	NP	**2,56**	**POS**	0,584	NEG
80	1	NP	0,371	NEG	0,485	NEG
86	15	P	**2,252**	**POS**	**5,363**	**POS**
88	5	NP	0,478	NEG	0,537	NEG
95	3	P	0,325	NEG	0,537	NEG
98	-	P	0,475	NEG	**2,036**	**POS**
100	1	P	0,368	NEG	0,554	NEG
102	6	P	**1,439**	**POS**	0,462	NEG
103	6	NP	0,444	NEG	0,561	NEG
104	3	P	**2,449**	**POS**	0,647	NEG
108	5	P	0,39	NEG	0,514	NEG
109	-	NP	0,373	NEG	0,537	NEG
113	2	P	0,371	NEG	0,57	NEG
122	5	NP	0,422	NEG	0,666	NEG
123	15	P	0,362	NEG	0,514	NEG
125	11	P	**3,705**	**POS**	**2,128**	**POS**
127	14	NP	**4,481**	**POS**	**12,267**	**POS**
131	-	P	**8,852**	**POS**	**12,963**	**POS**
137	3	P	1,047	INDET	**10,897**	**POS**
138	5	NP	0,444	NEG	0,726	NEG
139	2	NP	0,985	INDET	0,514	NEG
140	-	P	**3,328**	**POS**	0,485	NEG
141	6	NP	**3,309**	**POS**	0,646	NEG
142	2	NP	0,529	NEG	0,561	NEG
144	-	NP	0,478	NEG	0,534	NEG
146	5	NP	0,43	NEG	0,617	NEG
151	-	NP	0,866	NEG	0,544	NEG
172	1	NP	0,382	NEG	0,485	NEG
173	1	NP	0,337	NEG	0,646	NEG
175	6	NP	0,756	NEG	0,561	NEG
177	5	P	**1,15**	**POS**	0,386	NEG
178	14	NP	0,509	NEG	0,603	NEG
182	7	NP	**9,504**	**POS**	0,587	NEG
183	10	P	**8,249**	**POS**	**2,217**	**POS**
186	3	P	0,311	NEG	0,465	NEG

CHIKV – vírus Chikungunya; NEG – negativo; POS – positivo; IND – indeterminado, NP – não provável; P – provável; " – " sem informação.

Das amostras soro reagentes para IgM, 12/18 (66,6%) também foram soro reagentes para IgG. Destas nenhuma apresentou o cálculo de *cut-off* quatro vezes maior para IgM, quando comparado com o IgG. Isto indica que todas as 18 amostras soro reagentes para IgM, de fato estavam relacionadas a fase aguda da doença **(Tabela 5)**. Este achado aumenta o quantitativo de amostras relacionadas a fase aguda da infecção por CHIKV de 92/172 (53.48%) para 110/172 (63,9%), ratificando o direcionamento ainda mais contundente do quadro epidêmico, sugerido nos resultados da biologia molecular.

Quando avaliado os pacientes soro reagentes apenas para IgM, com ou sem clínica sugestiva, frente ao TIS foi observado um TIS médio de 6 dias. Já os pacientes soro reagentes para IgM e IgG apresentaram um TIS médio de 8.73 dias **(Tabela 5)**.

5.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO *vs* LABORATORIAL

Durante o período do estudo 172 pacientes foram rastreados para doença arboviral após seu consentimento para participar. A prevalência de infecção aguda por CHIK confirmada em laboratório foi de 110/172 (64%) e 62/172 (36%) tiveram outra doença febril aguda.

Uma comparação de características clínicas para pacientes com CHIK e outras doenças febris agudas foi demonstrada na **Tabela 6**. Os pacientes confirmados para CHIK apresentaram o TIS menor em comparação aos demais (2 [1-4] vs. 3,5 [2,5-5], p = 0,007) e relataram mais frequentemente artrite (61,8% vs. 33,9%, p <0,0001), artralgia (96,4% vs. 79%, p <0,0001) e conjuntivite (35,5% vs. 16,1%, p = 0,007) em comparação para indivíduos negativos para CHIK, respectivamente. Outros preditores clínicos, como artrite/artralgia [OR: 6 (IC95% 1,8-19,7)] e presença de conjuntivite [OR: 2,3 (IC95% 1-5,2)] também foram positivamente associadas à infecção por CHIK, confirmada em laboratório.

Tabela 6. Características clínicas de pacientes com diagnóstico laboratorial para CHIKV frente a pacientes com clínica de arbovirose, atendidos na UPA Beira Mar de janeiro a junho de 2018.

Características	CHIKV n = 110	Outras DFA n = 62	OR [95% IC]
Idade (anos), média±DP	40 (15.2)	37 (16)	-
Feminino - n (%)	54 (49)	36 (58)	0.70 [0.37 – 1.30]
TIS, média [IQR]	2 [1-4]	3.5 [2.5-5]	-
Febre > 38.5° C	98 (89)	21 (33.8)	**15.94 [7.18 – 35.40]**
Exantema - n (%)	37 (33.6)	20 (32.3)	1.06 [0.54 - 2.06]
Mialgia - n (%)	78 (70.9)	45 (72.6)	0.92 [0.46 - 1.84]
Prurido - n (%)	16 (14.5)	14 (22.6)	0.58 [0.26 - 1.29]
Artralgia leve – n (%)	25 (22.7)	25 (40.3)	0.43 [0.22 - 0.85]
Artralgia moderada/severa - n (%)	81 (73.6)	24 (38.7)	**4.42 [2.27 - 8.59]**
Artrite - n (%)	68 (61.8)	21 (33.9)	**3.16 [1.64 - 6.06]**
Conjuntivite - n (%)	39 (35.5)	10 (16.1)	**2.85 [1.30 - 6.24]**
Dor de cabeça - n (%)	87 (79.1)	47 (75.8)	1.20 [0.57 - 2.53]
Manifestações hemorrágicas - n (%)	3 (2.7)	1 (1.6)	1.71 [0.17 - 16.80]

DFA: doença febril aguda; CHIKV: chikungunya; TIS: tempo de início dos sintomas; IQR: intervalo interquartil; OR: odds ratio; DP: desvio padrão.

Cento e dez pacientes atenderam à atual definição clínica de CHIK. A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo foram 85,4% (77,4-91,4), 38,7% (26,6-51,9), 71,2% (66,6-75,3) e 60% (46,3-72,2), respectivamente. Quando avaliado a definição de CHIK da OMS no presente estudo, observou-se uma precisão dentro das expectativas (AUC: 0,68 [IC 95% 0,61-0,75]).

Figura 6. Fórmulas para calcular sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{VP}{(VP + FN)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{VN}{(FP + VN)}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{VP}{(VP + FP)}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{VN}{(VN + FN)}$$

$$\text{Acurácia} = \frac{(VP + VN)}{(VP + FN + FP + VN)}$$

Fonte:http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72722016000200002&lng=p&nrm=iso&tlng=p

Tabela 7. Resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia do trabalho.

Sensibilidade	**85,4%**
Especificidade	**38,7%**
VPP	**71,2%**
VPN	**60%**
ACU	**0,68**

6. DISCUSSÃO

6.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO

No presente estudo foram avaliadas 172 amostras clínicas (soro) de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, de janeiro a junho de 2018, com diagnóstico sugestivo de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK).

O maior desafio encontrado em períodos de epidemias em áreas endêmicas para arboviroses tem sido definir um diagnóstico preciso e de baixo custo. A Portaria GM/MS nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 estabelece DEN, CHIK e ZIK como doenças de notificação compulsória semanal e os óbitos suspeitos como de notificação compulsória imediata (BRASIL, 2016). Contudo, em situações de surto ou epidemias, os primeiros casos suspeitos devem ser confirmados laboratorialmente e os demais seguem o padrão de diagnóstico clínico-epidemiológico (BRASIL, 2015c; 2016a; 2016c; 2017; 2019).

As manifestações clínicas da CHIK estão bem descritas em estudos e relatórios anteriores sobre surtos na África (SISSOKO et al. 2010; NKOGHE et al. 2012), Europa (REZZA et al. 2007) e Ásia (LAKSHMI et al. 2008; LEE et al. 2012). Dos surtos nas Américas, apenas os surtos da CHIK na Colômbia, Trinidad e Granada foram descritos em detalhes (MATTAR et al. 2015; MACPHERSON et al. 2016). A definição clínica dos casos de CHIK utilizada no presente estudo foi condizente com aquelas descritas por outros autores, que se basearam na síndrome clínica de febre alta, dor em múltiplas articulações e artrite (STAPLES et al. 2009; THIBERVILLE et al. 2013; KHATUN et al. 2015; BURT et al. 2017). A febre é geralmente o primeiro sintoma a aparecer; os outros sintomas seguem dentro de alguns dias. A artralgia geralmente afeta mais de uma articulação; e as articulações mais afetadas são os joelhos, tornozelos, mãos e pulsos. Os sintomas geralmente desaparecem dentro de 7 a 10 dias, embora as dores nas articulações possam durar semanas, meses ou anos. A variação clínica pode ser explicada por respostas imunopatogênicas únicas dos dois genótipos de CHIKV. Evidências da menor virulência e patogenicidade da linhagem do Caribe (genótipo asiático) em comparação com a linhagem do Oceano Índico, que evoluiu a partir do genótipo da África Oriental / Central / do Sul (ECSA), foram obtidas recentemente usando um modelo de infecção por camundongo (TEO et al. 2015).

No Rio de Janeiro, durante a epidemia de ZIK em 2016, os sintomas mais frequentes foram: exantema, prurido e conjuntivite (BRASIL et al. 2016), esses dados foram os pilares clínicos para determinação dos casos de ZIK no presente estudo. O estudo feito por Braga et

al. (2017) avaliou os critérios clínicos para arboviroses, onde foram incluídos apenas os pacientes que tiveram resultados de RT-PCR para DENV, ZIKV e CHIKV durante o período do estudo (2014 a 2016) e concluíram que os sintomas citados acima são os mais fortemente encontrados em pacientes com ZIK. A presença de erupção cutânea com prurido ou hiperemia conjuntival, sem outras manifestações clínicas gerais como febre, petéquias ou anorexia, também foi achada a melhor definição de caso do ZIK para Lanciotti et al. (2008) e Zanluca et al. (2015), com maior sensibilidade e especificidade, de 86% e 78%, respectivamente. A infecção pelo DENV é sistêmica e apresenta características clínicas inespecíficas (PAHO 2017). Tais características foram consideradas na definição dos casos de DEN no presente estudo.

A distribuição etária dos casos suspeitos de arboviroses mostrou de forma significativa um maior número de pacientes adultos com suspeita de ZIK e CHIK. Estes resultados corroboram com os observados em outros estudos, relacionados com essas mesmas arboviroses (CARDOSO et al. 2015; BRASIL et al. 2016). Na diferenciação por patologia, foi observado uma distribuição dos casos de DEN e ZIK de forma homogenia, demonstrando uma tendência à endemicidade. Contudo, o quantitativo de casos de CHIK foi sensivelmente maior, acompanhando o quadro epidêmico observado desta arbovirose no Rio de Janeiro em 2018. No que tange ao gênero não houve diferença significativa no número de casos suspeitos entre os homens com DEN e CHIK. No entanto, quanto nota-se apenas os casos suspeitos de ZIK percebe-se que as mulheres foram mais afetadas, principalmente na faixa etária adulta (20-59 anos). Vale ressaltar que estudos relataram que as mulheres são mais propensas a infecções por DEN, ZIK e CHIK (DOKE et al. 2011; BRAGA et al. 2014; BRASIL et al. 2016), provavelmente por se dedicarem mais as atividades domiciliares, se expondo aos focos residenciais dos vetores. Outros fatores estariam relacionados às diferenças no uso de roupas, entre homens e mulheres, em relação à exposição da pele, em particular tornozelos e pernas, permitindo um maior contato com os vetores (RENAULT et al. 2007; KANNAN et al. 2009). Não se pode descartar o comportamento de buscar o médico que é mais frequente em mulheres, além da percepção de risco de grave acometimento fetal por ZIK, que também pode ter exacerbado ainda mais a busca delas pela assistência à saúde. Coelho et al. (2016), utilizando dados sobre a incidência entre os anos de 2015 a 2016 para DEN e ZIK, na cidade do Rio de Janeiro, concluíram que mulheres em idade reprodutiva tinham 90% mais chances de adquirir ZIK do que os homens neste mesmo perfil. Este foi um estudo epidemiológico importante em uma área de transmissão ativa de ZIKV, que descartou que o comportamento de maior procura ao atendimento à saúde pelo gênero feminino ou

testes sistemáticos em mulheres grávidas como a causa de mais relatos de ZIK em mulheres em idade fértil.

A rápida dispersão do ZIKV no Brasil, nos anos de 2015 e 2016, acabou indicando outras vias de transmissão, como aquela através de mucosas na transmissão sexual (MUSSO et al. 2015; MOREIRA et al. 2017) e também através de fluídos (saliva e urina) (MUSSO et al. 2015; GOURINAT et al. 2015), ainda não descritas para o DENV e o CHIKV.

6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A introdução do CHIKV no Caribe em 2013 resultou em grandes surtos nas Américas (STAPLES et al. 2009; CASSADOU et al. 2014). A semelhança clínica do CHIKV com outras infecções por arbovírus dificulta o diagnóstico apenas com base nos sintomas clínicos, principalmente porque os arbovírus, como o DENV e ZIKAV, podem co-circular nas mesmas regiões geográficas e são transmitidos pelas mesmas espécies de mosquitos (KUNO et al. 2015; MUSSO et al. 2015). É provável que em um futuro próximo, devido a dispersão do CHIKV, grandes surtos venham a ocorre e muitas cidades se tornem endêmicas para este arbovirus. Os laboratórios de saúde pública nas Américas precisarão criar e manter uma capacidade de testes de diagnóstico de alto volume e precisarão de ensaios de diagnóstico comercial confiáveis e validados para o CHIKV para responder a esse aumento do número de casos. Assim como neste estudo científico, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo CHIKV no Brasil, ainda esta limitado a laboratórios de pesquisa ou de saúde pública.

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo CHIKV tem sido realizado por métodos sorológicos, isolamento de vírus e detecção de RNA viral por RT-PCR. O teste desenvolvido no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para diagnosticar infecções pelo CHIKV, baseia-se nas características da infecção e no momento da coleta das amostras. O CHIKV se replica rapidamente para altos títulos no hospedeiro, e o RNA viral geralmente pode ser detectado por RT-qPCR na primeira semana após o início da doença clínica. Em um estudo com viajantes da Índia infectados pelo CHIKV, o RNA viral foi detectado por RT-qPCR em amostras coletadas até 8 dias após o início dos sintomas (LANCIOTTI et al. 2007). Os anticorpos (IgM) desencadeados na resposta imune são normalmente detectáveis no soro nos dias 5 a 7 após o início dos sintomas. Neste mesmo estudo, a IgM específica do CHIKV foi detectada em 1 paciente no dia do início da doença, mas não foi detectada no restante até 9 dias após o início da doença (LANCIOTTI et al. 2007). Tais resultados estão de acordo com aqueles observados no presente estudo, no que tange o diagnóstico pelo RT-

qPCR, onde o TIS dos pacientes com ou sem clínica sugestiva, com diagnóstico positivo para CHIKV, foi em média de 2,27 dias. Já os pacientes com imunodiagnóstico reagente para IgM anti-CHIKV apresentaram TIS médio de 6 dias, demonstrando que tal imunoglabulina pode ser detectada no soro de 4 a 7 dias (CHEN et al. 2012; AHMED et al. 2019).

A detecção de RNA viral durante a infecção aguda por RT-PCR ou outros testes de amplificação de ácido nucléico (NAATs) fornece resultados mais específicos, mas o CHIKV é detectável apenas durante a curta fase de viremia (LANCIOTTI et al. 2007; AHMED et al. 2019). Isto foi observado nos resultados deste estudo para 92 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses, que por meio do diagnóstico molecular foram confirmados para CHIKV. No entanto, no caso do ZIKV, a utilidade do teste molecular para o diagnóstico de infecção aguda é limitada, porque cerca de 80% dos pacientes não apresentam sintomas para alertar quanto à infecção e, portanto, nenhum quadro clínico de referência para que seja buscado o diagnóstico é observado (SINGH, 2018).

A especificidade e sensibilidade dos kits de imunodiagnóstico utilizados no presente estudo foram avaliadas por meio de um painel de amostras derivadas de pessoas que tiveram sinais clínicos de infecção pelo CHIKV. Para a sensibilidade foram avaliadas cerca de 44 amostras positivas e a especificidade foi determinada por meio da análise de 400 amostras negativas coletadas de pacientes normais e doadores de sangue. Os referidos kits apresentaram sensibilidade e especificidade acima de 98%. Estes resultados são semelhantes com os resultados relatados para ensaios semelhantes. Por exemplo, o ELISA desenvolvido por Wasonga et al. (2015) apresentou sensibilidade de 97,6% e especificidade de 81,3% em comparação com o ELISA desenvolvido pelo CDC. Blacksel et al. (2011) avaliaram um ELISA comercial da Standard Diagnostics, Inc. (Yongin-si, Gyeonggi-do, República da Coréia), usando como referência um método desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa em Ciências Médicas das Forças Armadas (Bangkok, Tailândia). Obtiveram sensibilidade e especificidade de 84% e 91%, respectivamente, em amostras coletadas de pacientes na fase de convalescença (BLACKSEL et al. 2011).

6.3. ACURÁRIA DO DIAGNÓSTICO DE CHIK

Os critérios de diagnóstico clínico foram estudados em relação à CHIK, a fim de diferenciá-la de outras doenças (SISSOKO et al. 2010, LEE et al. 2012, THIBERVILLE et al. 2013, GODAERT et al. 2017, CAVALCANTE et al. 2019), especialmente DEN, que é endêmica no Brasil.

No presente estudo, a febre foi observada em 89% de todos os casos confirmados laboratorialmente para o CHIKV de pacientes atendidos na UPA Beira Mar. A dor articular grave foi uma característica regular nos pacientes sintomáticos com CHIK, onde 81 (73,6%) dos casos confirmados laboratoriais de CHIK apresentaram artralgia moderada a grave, em comparação com 24 (38,7%) pacientes que apresentaram outra doença febril aguda, com acurácia de 4,42. Van Genderen et al. (2016), estudando 180 pacientes ambulatoriais em um surto de CHIKV no Suriname em 2014, descobriram que aproximadamente 70% de 121 pacientes com CHIKV diagnosticados pelo RT-qPCR apresentaram dor moderada a intensa; além disso, a artralgia foi significativamente mais comum nos pacientes RT-qPCR positivos vs nos RT-qPCR negativos (84,4% vs 65,7%, p = 0,02).

Apesar da frequência e gravidade da dor nas articulações, no presente estudo, os critérios da OMS para caso provável de CHIK (início agudo de febre > 38,5 °C e artralgia / artrite grave não explicada por outras condições médicas no contexto epidemiológico de transmissão) tiveram precisão de 68,6%. No estudo de Sissoko et al. (2010), o critério da OMS "febre + artralgia" estava presente em 83,4% dos 318 casos confirmados por anticorpos de CHIKV e em 86,9% dos 107 casos negativos em laboratório, ou seja, não foi capaz de discriminar clinicamente os pacientes. Por outro lado, os critérios febre + poliartralgia, sugeridos por eles, a chamada "ferramenta de Mayotte", em 440 pacientes diagnosticados sorologicamente por IgM e IgG, em um estudo retrospectivo de tipo populacional, tipo recordação de sintomas, apresentaram 84% de sensibilidade e 89% de especificidade. A avaliação dos critérios deste estudo é muito limitada pela retrospectiva e recordação dos sintomas. Em contrapartida, Thiberville et al. (2013), em uma investigação ambulatorial semelhante ao presente estudo, propuseram um refinamento do escore, utilizando artralgia do punho e da articulação metacarpofalângica, mialgia ausente ou de baixa intensidade e linfopenia como os melhores preditores de CHIK, que atingiram 87% de VPP em sua população de pacientes agudos de 18 a 60 anos. Lee et al. (2012), em um estudo com adultos hospitalizados, compararam 117 pacientes positivos para CHIK por RT-PCR, com 917 pacientes confirmados para DEN por RT-PCR e descobriram que mialgia e artralgia eram mais comuns em CHIK, enquanto que a contagem de plaquetas abaixo de 118 x 109 / L foram os melhores preditores para DEN.

Os casos do presente estudo, confirmados para CHIK apresentaram conjuntivite duas vezes mais frequente em comparação com outras doenças febris agudas (35,5% vs 16,1%, respectivamente, OR de 2,85); a frequência de conjuntivite foi semelhante à publicada por Souza Costa et al. (2019), onde ocorreu em 15/40 (37,5%) pacientes confirmados

laboratorialmente com CHIKV, em uma cidade vizinha ao Rio de Janeiro, em 2016. Curiosamente, neste artigo, todas as cepas estudadas se agruparam filogeneticamente com o genótipo ECSA. Em um estudo recente no México com 95 pacientes confirmados em laboratório para CHIK, a conjuntivite estava presente em 15% dos casos (DANIS-LOZANO et al. 2017). A conjuntivite foi considerada um critério diagnóstico importante para a infecção pelo ZIKV (BRAGA et al. 2017), mas novamente a sobreposição de características clínicas é proeminente.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

I. o diagnóstico clínico-epidemiológico foi uma boa ferramenta para determinação dos casos de CHIK em período epidêmico, contudo os testes laboratoriais são necessários para aumentar a fidedignidade epidemiológica;

II. foi caracterizado, a partir dos dados obtidos da biologia molecular (RT-qPCR), um suposto quadro epidêmico de CHIKV na população e período estudados. Quadro este ratificado pelo imunodiagnóstico;

III. O tempo de início dos sintomas dos pacientes cujo as amostras foram submetidas aos testes de imunodiagnóstico e biologia molecular foram condizentes com os períodos estabelecidos de produção de IgM e viremia, respectivamente;

IV. Além da febre alta (>38,5ºC) e da presença de artrite/artralgia, a conjuntivite foi um importante sintoma observado nos pacientes com diagnóstico conclusivo para CHIK;

V. A definição de caso de CHIK da OMS precisa ser refinada, com melhor precisão, especialmente em áreas epidêmicas com co-circulação de arbovírus, uma vez que foi observado baixa especificidade e a acurácia foi considerada dentro de um padrão razoável.

8. BIBLIOGRAFIA

AHMED, M., et al. **Dilemma in laboratory diagnosis of Dengue, Chikungunya and Zika viruses**. Bangladesh Journal of Medicine, 30 (2), 83-92, 2019.

ALENCAR, CHM., et al. **Potencialidades do *Aedes albopictus* como Vetor de Arboviroses no Brasil: um desafio para a atenção primária**. Revista de Atenção Primária à Saúde. Juiz de Fora, v. 11, n. 4. p 459-467, out/dez. 2008.

AYRES, JRCM., et al. **A hermeneutical concept of health**. Physis. vol. 17, n.1, p. 43-62. 2007.

BEESOON S, et al. **Chikungunya Fever, Mauritius, 2006**. Emerging Infectious Diseases. v. 14, n. 2, p. 337-338, 2008.

BRAGA JCD, et al. **Clinical, Molecular and Epidemiological Analysis of Dengue Cases during a Major Outbreak in the Midwest Region of Minas Gerais, Brazil**. J Trop Med. v. 2014, p.59-70, 2014.

BRAGA JU, et al. **Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics.** PLoS ONE. v. 12, n. 6, p. e0179725, 2017.

BRASIL, P. et al. **Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection**.The Lancet; London 387.10026 (Apr 2, 2016): 1482.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue**. – Brasília: Ministério da Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos) p.160, 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia**. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia. Acesso em 24 de fevereiro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Levantamento Rápido de Índices para Aedes Aegypti (LIRAa) para vigilância entomológica do Aedes aegypti no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 88 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. **Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central (snc) emergência de saúde pública de importância internacional - espII**. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Disponível em: http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf. Acessado em 02 de maio de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45**. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 36, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 03**. Boletim Epidemiológico, v. 47, n. 06, p. 1-7, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2016**. Boletim Epidemiológico, v. 48, n. 2, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12**. Boletim Epidemiológico, v. 48, n. 12, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016**. Boletim Epidemiológico, v. 48, n. 3, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 10, 2017**. Boletim Epidemiológico, v. 48, n. 9, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2018**. Boletim Epidemiológico, v. 50, n. 4z, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 34, 2019**. Boletim Epidemiológico, v. 50, n. 22, 2019.

BROECKEL, R. et al. **Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model).** *Pathogens.* v. 4, 662-681, 2015.

BURT FJ., et al. **Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen**. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (4): e107–e17. pmid:28159534.

CAMPOS, GS, BANDEIRA AC, SARDI SI. **Zika virus outbreak, Bahia, Brazil.** Emerging Infectious Diseases v. 21, p. 1885-6. 2015.

CARDOSO CW, et al. **Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil**. Emerging infectious diseases. v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.

CARLETON M., et al. **Role of glycoprotein PE2 in formation and maturation of the Sindbis virus spike**. J Virol 71:1558–66.1997.

CASSADOU, S., et al. **Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013.** Eurosurveillance, Vol 19, Issue 13, 2014.

CASSEB, et al. **Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira.** ***Veterinária e Zootecnia.*** São Paulo, v. 20, n. 3: 391-403, set. 2013.

CASTRO MG, et al. **Dengue virus detection by using reverse transcriptionpolymerase chain reaction in saliva and progeny of experimentally infected Aedes albopictus from Brazil**. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004. 99: 809-814.

CAVALCANTI LPdG, et al. **Competência de peixes como predadores de larvas de Aedes aegypti, em condições de laboratório**. Rev Saúde Pública. v. 41, n. 4, p. 638-44, 2007.

CHEN R & VASILAKIS N. **Dengue-Quo tu et quo vadis?** Viruses. v. 3, p. 1562-1608. 2011.

CHEVILLON C, et al. **The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective**. Trends in microbiology. v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.

COELHO, FC, et al. **Higher incidence of Zika in adult women than adult men in Rio de Janeiro suggests a significant contribution of sexual transmission from men to women**. International Journal of Infectious Diseases. v. 51, p. 128–132, 2016.

DANIS-LOZANO et al. **Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S. Mexico: A cross sectional study**. PLoS One. 2017; 12(10): e0186923.

DE MELO-SANTOS MAV, et al. **Long lasting persistence of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis larvicidal activity in Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) breeding places is associated to bacteria recycling**. Biological Control, v. 49, n. 2, p. 186-191, 2009

DE RANITZ, et al. **Clinical impressions of chikungunya in Vellore gained from study of adult patients.** Indian J Med Res. 1965 Aug;53(8):756-63.

DE SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p. 56, 2010.

DECIT - Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Rev Saúde Pública. v. 44, n. 1, p. 200-2, 2010.

DIALLO D, et al. **Blood feeding patterns of sylvatic arbovirus vectors in southeastern Senegal. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 3, p. 200-203, 2013.

DIAZ LA, et al. **Intertwined arbovirus transmission activity: reassessing the transmission cycle paradigm**. Frontiers in physiology, v. 3, p. 493, 2013.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*). Responding to Neglected Patients' Needs Through Innovation. **Annual Report**, 2017. https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2018/08/DNDi_AR_2017.pdf . Acessado em março de 2019.

DOKE PP, et al. A clinico-epidemiological study of Chikungunya outbreak in Maharashtra State, India. Indian J Public Health. v. 55, n. 4, p. 313–6, 2011.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. **Chikungunya no Brasil: um desafio emergente.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 18 n.1, 2015.

DOS SANTOS, TP., et al. **Potential of Aedes albopictus as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil.** Emerging Microbes & Infections (2018) 7:191.

DRIGGERS, RW., et al. **Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities.** N. Engl. J. Med. v. 374, 2142–51, 2016.

FAYE O. et al. **One-step RT-PCR for detection of Zika virus**. J Clin Virol. 2008; 43: 96-101.

FAYE, O. et al. **Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century** PLoS Negl Trop Dis, 8 (2014), p. e2636

FAYE, O. et al. **Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes.** Virology Journal. v. 10, p.311.2013.

FERNANDES Z, et al. **Susceptibility of urban and rural populations of Aedes albopictus from Sao Paulo State, Brazil, to infection by dengue-1 and −2 viruses.** J. Med. Entomol. v. 41, p. 961–96, 2004.

FERNÁNDEZ-SALAS I, et al. **Historical inability to control Aedes aegypti as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America**. Antiviral Res. v. 124, p. 30-42, 2015.

GAEDIGK-NITSCHKO K, SCHLESINGER M.J. **Site-directed mutations in Sindbis virus E2 glycoprotein's cytoplasmic domain and the 6K protein lead to similar defects in virus assembly and budding**. Virology 183: 206–14. 1991.

GERARDIN P, et al. **Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion**. PLoS Med. v. 5, p. e60, 2008.

GIOVANELLA L, STEGMULLER K. **The financial crisis and health care systems in Europe: universal care under threat? Trends in health sector reforms in Germany, the United Kingdom, and Spain.** Cad Saude Publica. 2014 Nov;30(11):2263-2281.

GRANDADAM M, et al**. Chikungunya virus, southeastern France**. Emerg Infect Dis 17: 910–913. 2011

GRIFFIN D.E. **Alphaviruses.** In: Knipe DM, Howley PM, editors. , editors. Fields virology. 5th ed.Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.2007.

GODAERT MDL, et al. **Atypical Clinical Presentations of Acute Phase Chikungunya Virus Infection in Older Adults.** Journal of the American Geriatrics Society. Volume 65, Issue 11, 2017 Pages 2510-251

GOURINAT AC, et al. **Detection of Zika virus in urine.** Emerging infectious diseases. v. 21, n. 1, p. 84–6, 2015.

GUBLER, DJ. **Human arbovirus infections worldwide.** Annals of the New York Academy of Sciences, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2001.

GUPTA D, et al. **Acquired Neonatal Chikungunya Encephalopathy Indian.** J Pediatr v. 82, p. 1065, 2015.

HANLEY KA, et al. **Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus**. Infection, Genetics and Evolution, v. 19, p. 292-311, 2013.

HAYES EB. **Zika virus outside Africa**. Emerging infectious diseases, v. 15, n. 9, p. 1347, 2009.

HORTA MAP, et al. **Os efeitos do crescimento urbano sobre a dengue**. Rev Bras Promoc Saude, Fortaleza, v. 26, n. 4, p. 539-547, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo brasileiro 2010**. Disponível em https://censo2010.ibge.gov.br/ Acessado em 09 de agosto de 2018.

JOHNSTON, R. E.; PETERS, C. J. **Alphaviruses**. Fields virology, v. 1, p. 843-98, 1996.

JOSSERAN, L, et al. **Chikungunya disease outbreak, Reunion Island.** Emerg Infect Dis. 2006 Dec; 12(12): 1994–1995. PMCID: PMC3291364.

KANNAN M, et al. **A study on chikungunya outbreak during 2007 in Kerala, south India**. Indian J Med Res. v. 129, n. 3, p. 311–5, 2009.

KARIUKI NJENGA M, et al**. Tracking epidemic chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa**. J Gen Virol. v. 89, p. 2754-60, 2008

KHATUN S, Chakraborty A, Rahman M, Nasreen Banu N, Rahman MM, Hasan SM, et al. **An Outbreak of Chikungunya in Rural Bangladesh**, 2011. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9 (7): e0003907. pmid:26161995; PubMed Central PMCID: PMC4498910.

KRIEGER, N. **Epidemiology and the People's Health: Theory and Context.** Oxford University Press. 2011.

KUNO, G. **A Re-Examination of the History of Etiologic Confusion between Dengue and Chikungunya.** PLoS Negl Trop Dis. 2015 Nov; 9(11): e0004101. PMCID: PMC4643049

LAKSHMI V., et al. **Clinical features and molecular diagnosis of Chikungunya fever from South India.** Clin Infect Dis. 2008; 46: 1436–42. pmid:18419449

LANCIOTTI RS., et al. **Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic**, Yap State, Micronesia, 2007. Emerging Infectious Diseases. 2008;14(8):1232-1239. doi:10.3201/eid1408.080287.

LANCIOTTI RS, et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** Emerg Infect Dis. v. 14, n. 8, p. 1232-9, 2008.

LEAKE CJ. **Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes.** Special publications of the Society for General Microbiology, 1984.

LEE VJ., et al. **Simple clinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults.** PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2012; 6: e1786. pmid:23029573

LESCAR J, et al. **The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH**. Cell 105:137–48. 2001.

LINGER BR, et al. **Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization.** RNA Society, 2004. doi:10.1261/rna.5127104RNA 2004. 10: 128-138

LIPSITCH M, et al. **The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission**. Evolution, v. 50, n. 5, p. 1729-1741, 1996.

LOPES, N. et al. **Características Gerais e Epidemiologia dos Arbovírus Emergentes no Brasil.** Rev. Pan-Amazônica de Saúde, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA R & FAILLOUX AB. **High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas**. PLoS Negl Trop Dis. v. 29, n. 11, p. e0005698, 2017.

MACPHERSON C., et al. **Clinical and serological insights from the asian lineage Chikungunya outbreak in Grenada, 2014: An observational study**. Am J Trop Med Hyg. 2016; 95: 890–893. pmid:27527629

MALAKAR, J., et al. **Zika Virus Associated with Microcephaly**. New England Journal of Medicine. 374(10): 951-958.2016.

MATTAR S., et al. **Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis.** J Infect Dev Ctries. 2015; 9: 1126–32. pmid:26517488.

MONATH TP. **Yellow fever: an update.** Lancet. v. 1, p. 11–20, 2001.

MOREIRA, J. et al. **Sexually acquired Zika virus: a systematic review**. Clinical Microbiology and Infection. v. 23, n. 5, p. 296 – 305, 2017.

MULVEY M, BROWN DT. **Involvement of the molecular chaperone BiP in maturation of Sindbis virus envelope glycoproteins**. J Virol 69:1621–7.1995.

MUSSO D, et al. **Detection of Zika virus in saliva**. J Clin Virol. v. 68, p. 53–5, 2015.

MUSSO D & GUBLER DJ. **Zika virus**. Clin Microbiol Rev. v. 29, p. 487–524, 2016.

NKOGHE D, et al. **No clinical or biological difference between Chikungunya and Dengue Fever during the 2010 Gabonese outbreak.** Infect Dis Rep. 2012 Jan 2; 4(1): e5. PMCID: PMC3892642.

NUNES MR, et al. **Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.** BMC Med. v. 13, p. 102, 2015.

OLIVEIRA ECA, et al. **Investigação sobre os casos e óbitos por esquistossomose na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil, 2005-2013.** Epidemiol. Serv. Saúde 27 (4) 29 Nov 2018.

PAHO. Pan American Health Organization. **Case Definitions**. Zika virus. Availableat: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11117%3A2015-zika-case-definitions-&catid=8424%3Acontents&Itemid=41532&lang=en accessed 02 maio 2017.

PETERSON LP, et al. **Zika virus**. N Engl J Med. v. 374, p. 1552–1563, 2016.

RAMASAMY R, et al. **Larval development of Aedes aegypti and Aedes albopictus in peri-urban brackish water and its implications for transmission of arboviral diseases**. PLoS Negl Trop Dis. v. 5, n. 11, p. e1369, 2011.

REEVES WK. **Oviposition by Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in relation to conspecific larvae infected with internal symbiotes**. Journal of Vector Ecology. v. 29, p. 159-163, 2004.

RENAULT P, et al. **A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Réunion Island, France, 2005–2006**. Am J Trop Med Hyg. v. 77, n. 4, p. 727–31, 2007.

REZZA G., et al. **Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region.** Lancet. 2007; 370: 1840–6. pmid:18061059

RODRIGUEZ-MORALES A.J. **No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika**. Archivos de Medicina, v. 11, n. 2-3, p. 1-4, 2015.

ROTH, A. et al. **Concurrent outbreaks of dengue, Chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014**. Euro Surveill. n. 19, p. 209-229, 2014.

RUBEL, F & KOTTEK, M. **Observed and projected climate shifts 1901–2100 depicted by world maps of the Köppen-Geiger climate classification.** Meteorologische Zeitschrift, v. 19, n. 2, p. 135-141, 2010.

SCHWARTZ E, et al. **Seasonality, annual trends, and characteristics of dengue among ill returned travelers, 1997-2006.** Emerg Infect Dis. v. 14, n. 7, p. 1081-8, 2008.

SCHUFFENECKER I, et al. **Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak.** IV HV, ed. *PLoS Medicine*. 2006;3(7):e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263.

SEFEROVIC, M., et al. Experimental Zika Virus Infection in the Pregnant Common Marmoset Induces **Spontaneous Fetal Loss and Neurodevelopmental Abnormalities**. Scientific Reports, 8(1), 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-018- 25205-1, 2018.

SES. SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Boletim Epidemiológico arboviroses 008/2016. **Cenário Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika no Estado RJ**. Pag 1-16; 2016.

SES. SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Boletim Epidemiológico arboviroses 015/2017. **Cenário Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika no Estado RJ**. 2017.

SES. SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Boletim Epidemiológico arboviroses 018/2019. **Cenário Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika no Estado RJ**. 2019.

SIMIZU B. et al. **Structural proteins of Chikungunya virus**. J Virol 51:254–8. 1984.

SIMMONS C.P. **Dengue**. *The New England Journal of Medicine*. v. 15, n. 366, p. 1423-1432, 2012.

SINGH RK., et al**. Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update.** ***Front Microbiol***. 2018;8:2677. Published 2018 Jan 19. doi:10.3389/fmicb.2017.02677

SINKINS, S.P. et al. **The potential application of inherited symbiont systems to pest control**. In: O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., Werren, J.H. (Eds.). Influential Passengers. Oxford University Press, New York, pp. 155–175, 1997.

SISSOKO D., et al. **Field evaluation of clinical features during chikungunya outbreak in Mayotte, 2005–2006.** Trop Med Int Health. 2010; 15: 600–7. pmid:20214759

SMITH T.J., et al. **Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy**. Proc Natl Acad Sci USA 92:10648–52. 1995.

SOLIGNAT M, et al. **Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus**. Virology 393:183–97. 10.1016/j.virol.2009.07.024.2009.

STAPLES, et al. **Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.** Clinical Infectious Diseases. v. 49, n.6, p. 942-8, 2009.

STREIT JA, et al. **Upward trend in dengue incidence among hospitalized patients, United States**. Emerg Infect Dis. v. 17, n. 5, p. 914-6, 2011.

TELLINGHUISEN T.L, et al. **In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in Escherichia coli**. J Virol 73:5309–19.1999.

TELLINGHUISEN T.L, KUHN RJ. **Nucleic acid-dependent cross-linking of the nucleocapsid protein of Sindbis virus**. J Virol 74:4302–9. 2000.

TEO TH., et al. **Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint**

Pathology. J Virol. 2015; 89: 7955–69. pmid:25995257

TERZIAN ACB, et al. **Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus–Infected Patients**. Clinical Infectious Diseases, Volume 65, Issue 8, 15 October 2017, Pages 1260 – 1265.

TERZIAN ACB, et al. **Evidence of natural Zika virus infection in neotropical nonhuman primates in Brazil.** Sci Rep. v. 8, n. 1, p. 16034, 2018

THIBERVILLE SD., et al. **Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy**. Antiviral Res. 2013; 99 (3): 345–70. pmid:23811281.

TSETSARKIN KA, et al. **Multi-peaked adaptive landscape for Chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in Aedes albopictus mosquitoes**. Nat Commun. v. 5, p. 4084, 2014.

VAN DEN BERG B. et al. **Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis.** Nat Rev Neurol 2014; 10: 469–82.

VANCHIERE JA, et al. **Experimental Zika Virus Infection of Neotropical Primates**. Am J Trop Med Hyg. v. 98, n. 1, p. 173-177, 2018.

VASILAKIS N. & WEAVER SC. **The history and evolution of human dengue emergence**. Adv Virus Res. v. 72, p. 1–76, 2008.

VOLK, S.M. et al. **Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates**. J. Virol. v. 84, p. 6497-6504, 2010.

WANG, E. et al. **Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses**. J Virol. v. 74, p. 3227–3234, 2000.

WASONGA C., et al. **Development and Evaluation of an in-house IgM-capture ELISA for the detection of chikungunya and its application to a dengue outbreak situation in**

Kenya in 2013. Jpn J Infect Dis. 2015; 68 (5): 410–4.

WEAVER SC. **Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health**. PLoS neglected tropical diseases. 8(6), e2921.2014.

WEAVER SC & REISEN WK. **Present and future arbovirus threats.** Antiviral Res. v. 85, p. 328–345, 2010.

WHO. World Health Organization. **Zika: Public Health Emergency of International Concern**. Available at: www.who.int/emergencies/zika-virus/en/ accessed 19 Feb 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Regional Office for South-East Asia. (2009). **Guidelines for prevention and control of chikungunya fever**. WHO Regional Office for South-East Asia. https://apps.who.int/iris/handle/10665/205166 (Acessado em 20 de fevereiro de 2020)

ZANLUCA, C. et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZHANG W., et al. **Heparin binding sites on Ross River virus revealed by electron cryo-microscopy**. Virology 332:511–8. 10.1016/j.virol.2004.11.043.2005.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1. Ficha de investigação para Flavivírus (SMS-PMDC)

ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PREFEITURA MUNICIPAL DE DUQUE DE CAXIAS
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE -Coordenadoria de Epidemiologia

Ficha de Investigação para Flavivírus - Duque de Caxias

Nº SINAN | Data início dos sintomas | Data da notificação

Nome do Paciente

Sexo | Data de Nascimento | Idade | Gestante

Endereço

Número | Complemento | Telefone de contato

Ponto de referência

Bairro | Município

Data de início dos sintomas

Sinais e Sintomas

- Febre
- Artralgia
- Exantema
- Cefaléia
- Hiperemia conjuntival
- Prurido
- Diarréia
- Mialgia
- Poliartrite
- Manifestações hemorrágicas
- Sintomas respiratórios
- Edemas de membros
- Outros

Dados de atendimento

Data de atendimento

Local de atendimento

Município de atendimento

UF

Contato com casos semelhantes

Ação | Endereço | Telefone

Deslocamento (30 dis antes) do início dos sintomas

Data	Município	UF	País	Meio de transporte

9.2. ANEXO 2. Aprovação do Projeto junto ao CEP-Unigranrio.

UNIVERSIDADE UNIGRANRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Duque de Caxias, 16 de fevereiro de 2018.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para pesquisador Principal: Raphael Rangel das Chagas

Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa **"PEPTÍDEOS E LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA ZIKA VÍRUS",** protocolado sob o **número de CAAE 70324417.1.0000.5283,** encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. Sª., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.

Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO

Andreia Peter Christo Gomes
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO
Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – 25 de Agosto – Duque de Caxias – CEP: 25071-202
Tel.: 21 2672-7733 – E-mail: cep@unigranrio.com.br

9.3. ANEXO 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: **Peptídeos e lipossomos funcionalizados para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico sorológico para Zika vírus**
Pesquisador Responsável: **Sergian Vianna Cardozo**

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.
A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.
OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo
O objetivo geral do estudo é: **Propor o desenvolvimento em laboratório de um teste sorológico, de alta especificidade e sensibilidade, para o diagnóstico de Zika vírus.**

Duração do Estudo
A duração total do estudo é de 12 meses.

Descrição do Estudo
Este estudo será realizado na **Unidade Pré-Hospitalar Álvaro dos Santos Simões Figueira/PMDC**
O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque foi diagnosticado, pelos seus sinais e sintomas, com suspeita de dengue, Chikungunya, febre amarela ou Zika vírus.

Procedimento do Estudo
Após entender e concordar em participar, será realizada a coleta de sangue total (10 - 15 mL) através de venupuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugado para retirada do soro, de acordo com as diretrizes de coleta sanguínea determinadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010).
Os resultados dos exames serão disponibilizados à Unidade Pré-Hospitalar Álvaro dos Santos Simões Figueira assim que foram processados no laboratório.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto
Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local de coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer. Serão tomados os cuidados cabíveis para minimizar estes riscos.
Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios para o participante
Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo experimental em laboratório que busca um método diagnóstico eficiente para a rápida detecção de Zika vírus em pacientes que apresentam sintomatologia compatível com esta virose.
Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a na detecção de um teste diagnóstico eficiente para o Zika Vírus.

Compensação
Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo
Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.
A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão

pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidos a você por escrito. Se você decidir continuar nesse estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.
Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.
Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Você terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O responsável pelo estudo nesta instituição é o Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo que poderá ser encontrado no Núcleo de Pesquisa em Parasitologia da Universidade do Grande Rio (Unigranrio) ou nos respectivos telefones: 21 2672-7812 ou 21 98737-3532.

Declaração de Consentimento

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.
Eu autorizo a coleta de sangue e a utilização dos meus registros médicos (prontuários) pelo pesquisador, em prol desta pesquisa.

Sujeito de Pesquisa	Data
Representante Legal do Sujeito de Pesquisa	Data
Membro da equipe obtendo o Consentimento	Data
Pesquisador responsável	Data

9.4. ANEXO 4. Laudo disponibilizado ao Hospital Moacyr Rodrigues do Carmo à ser encaminhado aos pacientes que participaram da pesquisa.

BIOTRANS
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado
UNIGRANRIO UEZO

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS INFECCIOSAS
Av. Perimetral Prof. José de Souza Herdy, 1160 -
Jardim Vinte e Cinco de Agosto, Duque de Caxias - RJ, 25071-202
Pesquisador responsável: Profº Dr. Sergian Vianna Cardozo

Nome:	Data de nascimento:
Nº do prontuário:	Nº do BAM:
Data de atendimento:	

REAÇAO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (PCR-qRT)

	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
CHIKUNGUNYA VIRUS		NEGATIVO
ZIKA VIRUS		NEGATIVO
DENGUE VIRUS		NEGATIVO

Data da liberação:
Material: Sangue / Método: RT-qPCR

Analisado por:

Mestrandos Responsáveis
Hury Hellen
André Frederico
Raphael Rangel

O resultado de laboratório sofre influência de estados fisiológicos e patológicos.
Este laudo não é oficial e tem caráter exclusivamente informativo dos dados obtidos na pesquisa pela qual o paciente se prontificou a participar.