



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DEBORA BEZERRA SILVA

**COCIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA DURANTE A EPIDEMIA DE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ EM 2017**

FORTALEZA

2020

DEBORA BEZERRA SILVA

COCIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA DURANTE A EPIDEMIA DE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ EM 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Miyajima

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579c Silva, Débora Bezerra.
Cocirculação dos vírus Dengue e Zika durante a epidemia de Chikungunya no Estado do Ceará em 2017.
/ Débora Bezerra Silva. – 2020.
119 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Fábio Miyajima.

Coorientação: Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti.

1. Vírus Chikungunya. 2. Vírus da Dengue. 3. Zika vírus. 4. Coinfecção. 5. Epidemias. I. Título.

CDD 571.9

DEBORA BEZERRA SILVA

COCIRCULAÇÃO DOS VÍRUS DENGUE E ZIKA DURANTE A EPIDEMIA DE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ EM 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Aprovada: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Miyajima (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti (Co-Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo

Unichristus

Dra Izabel Letícia Cavalcante Ramalho

LACEN-CE

Dedico este trabalho aos meus pais, Wagner e Conceição, ao meu esposo, companheiro e um dos meus maiores incentivadores Edegar Pereira, e aos meus filhos Gabriela e Eduardo que juntos são a minha Fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a DEUS por toda proteção recebida, por ter me dado a oportunidade e a força para perseverar e permitir que eu concluísse mais uma etapa, de muitas, em minha vida.

Aos meus pais, Wagner Teixeira e Maria da Conceição Bezerra por terem sido sempre meus maiores incentivadores.

Ao meu esposo, Edegart Pereira por ser meu ponto de apoio, pela paciência, amor, pelos incentivos diários, por acreditar tanto no meu potencial e nunca me deixar desistir diante dos obstáculos.

Aos meus filhos Gabriela e Eduardo (meus tesouros) pela paciência, e compreensão durante essa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Miyajima pelo incentivo, apoio, parceria e por ter acreditado desde o início que tudo daria certo.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de estudo, por seus ensinamentos, pelo imenso apoio e valiosas colaborações em várias etapas deste mestrado.

À Dra Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo e Dra Izabel Letícia Cavalcante Ramalho pelo tempo a mim dispensado, pelas preciosas colaborações, sugestões, pelo empenho, carinho e atenção que a mim dispensaram nessa trajetória e pela gentileza em aceitarem participar da banca examinadora.

À Dra Juliana Navarro Ueda Yaochite pela delicadeza em participar da banca examinadora e pelas colaborações que certamente virão.

À Dra. Liana Perdigão Mello, diretora do LACEN-CE, Dra. Maria do Carmo Vidal Gadelha Lima, chefe da Divisão de Biologia Médica e Dra Ana Carolina Barjud Máximo, chefe da Virologia (LACEN-CE), pelo apoio, compreensão e atenção a mim concedidos durante todo o período do mestrado.

Aos docentes do programa da Pós-Graduação em Patologia pela imensa contribuição em minha formação.

Aos colegas de turma do mestrado 2018.1, pela parceria, coleguismo, companheirismo e troca de experiências diversas, que fizeram a nossa turma ser muito especial.

As minhas queridas amigas da “BANCA”: Alessandra Café (Alê), Dayse Aparecida, Dorotheia Teixeira (Tekka) e Mariana Costa (Mari) pela parceria, pelas risadas, pelos cafés e

pelo legado que cada uma de vocês deixou comigo. Um verdadeiro “encontro de almas” que tornou nosso mestrado muito melhor.

À Valéria Cordeiro (secretária da PPG Patologia) por sua extrema competência, disponibilidade e simpatia com que sempre me tratou.

Ao grupo de estudo “Orientandos Pamplona” onde em cada reunião era um novo aprendizado.

A minha parceira de mestrado, amiga de fé e irmã camarada Vânia Angélica Feitosa Viana por tudo.

As minhas “madrinhas” Leda Maria Simões Mello e Shirlene Telmos Silva de Lima pela enorme parceria em todas as etapas, principalmente nas análises moleculares.

A minha amiga e parceira de bancada Sônia Maria Macedo de Santana que sempre torceu e rezou por mim nos momentos mais difíceis e que por tantas vezes que segurou a rotina para que eu pudesse me dedicar as aulas e a pesquisa e junto a ela, Maria Cristina Rodrigues (Cristal), o nosso “braço direito”.

As colegas do laboratório de doenças exantemáticas: Izabel Letícia Cavalcante Ramalho, Jaqueline Souto Vieira Burgoa, Maria Elisabeth Lisboa de Melo e Rita Amanda Chaves de Lima por toda contribuição e apoio.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pelo financiamento por meio do edital 01/2017-SUS / PPSUS-CE FUNCAPSESA-Decit/SCTIE/MS-CNP.

À CAPES, pelo apoio financeiro à várias pesquisas nas diversas áreas científicas que ela proporciona.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

RESUMO

Nos últimos anos, vírus como o Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) produziram um grande número de surtos epidêmicos ocasionando significativo incremento nas taxas de morbidade e mortalidade. A cocirculação entre arbovírus constitui um desafio adicional, não apenas para o diagnóstico e a assistência terapêutica aos pacientes, mas para vigilância epidemiológica. Objetivou-se aqui realizar um estudo soropidemiológico e molecular de chikungunya no estado do Ceará referente ao período epidêmico de 2017, identificando possíveis casos de codeteção e/ou coinfeção de CHIKV com DENV e/ou ZIKV. Através de um estudo transversal, 370 amostras foram selecionadas a partir da soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), composta por amostras encaminhadas para o diagnóstico de chikungunya entre abril e setembro de 2017 que tiveram sorologia reagente para IgM anti CHIKV e que estavam até o 10^o dia de sintomas no momento da coleta. Essas amostras foram testadas por sorologia (ELISA) para IgG anti CHIKV, IgM e IgG anti DENV e anti ZIKV e antígeno NS1-DENV e por biologia molecular (qRT-PCR) para CHIKV, DENV e ZIKV. Os dados sócio-demográficos foram obtidos através das fichas epidemiológicas e do sistema de gerenciamento de ambiente laboratorial (GAL) e juntamente com os resultados laboratoriais foram compilados e analisados em programa estatístico (Stata, v. 14.0). Das 370 amostras selecionadas, 11 foram excluídas por critérios técnicos e 359 mantidas no estudo. Os resultados apontaram o predomínio do sexo feminino (64,9%), da faixa etária entre 30-59,9 anos (49,6%) com mediana de 37,9 anos. Amostras com auto-relato de início de sintomas compreendidos entre 6 e 10 dias foram a maioria (76,9%), com mediana de 6 dias, e quanto à origem do encaminhamento, o maior número de casos foram do município de Fortaleza (18,6%). Em aproximadamente 1 de cada 4 amostras analisadas (24,8%, 89/359) foi observado codeteção de CHIKV com as outras arboviroses estudadas, a mais frequente delas foi entre CHIKV/DENV (88,8%, 79/89), com significância estatística quando comparada à CHIKV/ZIKV (7,8%, 7/89). A tripla detecção (CHIKV/DENV/ZIKV) foi demonstrada em 3,4% desse total (3/89). A frequência de IgG anti-CHIKV foi de 29,2%, IgG anti-DENV 82,6% e IgG anti-ZIKV 49,3%; 59,4% tiveram sorologia reativa para ambos (IgG anti-DENV/ZIKV). O antígeno NS1-DENV foi reagente em 1,76% das amostras, enquanto que a detecção por qRT-PCR para CHIKV foi confirmada em 14,8% (53/359) destas. A coinfeção foi demonstrada em 3,8% (2/53) das amostras. Os resultados deste estudo confirmam a cocirculação arboviral durante o surto epidêmico de chikungunya em 2017 e de forma inédita revelam uma alta taxa de codeteção, particularmente com DENV. A identificação da coinfeção entre CHIKV e

DENV merece destaque entre os resultados, por comprovar a cocirculação desses arbovírus em um surto epidêmico de grande predominância de chikungunya. Ressalta-se aqui a relevância da realização de testes laboratoriais complementares para o diagnóstico diferencial em áreas de cocirculação de arbovírus, podendo contribuir decisivamente para medidas mais efetivas de vigilância e de monitoramento de epidemias.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya, Vírus da Dengue, Zika vírus, Coinfecção, Epidemias

ABSTRACT

In recent years, viruses such as dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) have produced a large number of epidemic outbreaks causing a significant increase in morbidity and mortality rates. Cocirculation between arboviruses is an additional challenge, not only for diagnosis and assistance to patients, but for epidemiological surveillance. The objective here was to conduct a seroepidemiological and molecular study of chikungunya in the state of Ceará during the epidemic season of 2017, identifying possible cases of codetection and / or coinfection of CHIKV with DENV and / or ZIKV. Through a cross-sectional study, 370 were selected from the biorepository at the Central Laboratory of Public Health of Ceará (LACEN-CE), consisting of samples referred for chikungunya diagnosis between April and September of 2017 that were reactive for IgM anti-CHIKV and that was up to 10⁰ days of symptoms at the time of collection. These samples were additionally tested by ELISA for IgG anti-CHIKV, both IgM and IgG anti-DENV and anti-ZIKV and NS1 antigen of dengue, as well as by molecular biology (qRT-PCR) for each CHIKV, DENV and ZIKV. Sociodemographic data were obtained from both epidemiological records and laboratory environment management system (GAL) and then compiled with laboratory results generated by this study for statistical analyses (Stata, v. 14.0). Of these 370 selected samples, 11 were excluded due to technical issues and 359 kept in the study. The results showed a predominance of females (64.9%), aged between 30-59.9 years (49.6%) with a median of 37.9 years. Samples with self-reported onset of symptoms between 6 and 10 days were the majority (76.9%), with a median of 6 days, and regarding the origin of the referral, the largest number of cases were from the city of Fortaleza (18, 6%). Remarkably, in approximately 1 out of 4 samples examined (24.8%, 89/359) codetection of CHIK was observed with other studied arboviruses, the most frequent of which was between CHIKV / DENV (88.8%, 79/89), with statistical significance when compared to CHIKV / ZIKV (7.8%, 7/89). A triple detection (CHIKV / DENV / ZIKV) was demonstrated in 3.4% of that total (3/89). The frequency of IgG anti-CHIKV was 29.2%, IgG anti-DENV (82.6%) and IgG anti-ZIKV (49.3%); 59.4% had reactive serology for both (anti-DENV / ZIKV IgG). The NS1-DENV antigen was reactive in 1.76% of the samples, while the detection by qRT-PCR for CHIKV was confirmed in 53 of the 359 samples (14.8%), however there was no significant associations of these parameters with the time of symptoms reported. The results of this study confirmed that arboviral co-circulation during the chikungunya epidemic period in 2017 and revealed an elevated co-detection rate, particularly with DENV, in patients with a primary

diagnosis of chikungunya. It also highlights the importance of undertaking complementary laboratory tests for establishing differential diagnosis in areas of endemic cocirculation of arboviruses, thus crucially contributing towards more effective surveillance measures to monitoring outbreaks.

Keywords: Chikungunya virus, Dengue Virus, Zika Virus, Coinfection, Outbreak

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Mapa da Dengue, Zika e Chikungunya no mundo.....	26
Figura 02	Dados epidemiológicos de dengue, chikungunya e Zika, até SE 52, Ceará, 2018-2019.....	33
Figura 03	Distribuição dos casos confirmados de chikungunya, Zika e dengue, com a introdução dos respectivos sorotipos, Ceará, 1986-2019.....	34
Figura 04	Ciclo de transmissão silvestre e urbana do CHIKV.....	36
Figura 05	Períodos de incubação extrínseca e intrínseca para o CHIKV.....	37
Figura 06	Mapa da propagação histórica do CHIKV para a Ásia, Europa e Américas a partir do ciclo enzoótico na África.....	39
Figura 07	Distribuição geográfica das linhagens do CHIKV associadas aos surtos de 1953-2000 e 2001-2018.....	40
Figura 08	Representação da estrutura do CHIKV.....	41
Figura 09	Organização do genoma do vírus Chikungunya e suas proteínas Não Estruturais e Estruturais.....	42
Figura 10	Mecanismo de infecção por CHIKV.....	44
Figura 11	Esquema da Resposta Imune ao CHIKV.....	47
Figura 12	Viremia e resposta imune seguida de infecção por vírus Chikungunya.....	47
Figura 13	Métodos de identificação laboratorial utilizados no diagnóstico das arboviroses.....	51
Figura 14	Aplicabilidade dos diferentes métodos no diagnóstico por CHIKV.....	53
Figura 15	Aplicabilidade dos diferentes métodos no diagnóstico por DENV.....	53
Figura 16	Fluxo do Estudo.....	60
Figura 17	Fluxo de Resultados.....	68
Figura 18	Municípios responsáveis pelo maior número de encaminhamentos das amostras do estudo, Ceará, 2017.....	70

Figura 19	Municípios com maior frequência de codetecções entre CHIKV/DENV que fizeram parte da população do estudo, Ceará, 2017.....	77
Figura 20	Diagrama evidenciando as codetecções de IgM anti CHIKV, DENV ZIKV, Ceará, 2017(N=89)	85
Figura 21	Interseção dos resultados de RT-PCR CHIKV ⁺ e NS1 evidenciando a coinfeção CHIKV/DENV, Ceará, 2107.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características dos estudos que investigaram CHIKV, DENV e ZIKV.....	55
Quadro 2	Ensaio de Oligonucleotídeos contendo iniciadores e sondas específicos para detecção molecular de CHIKV, DENV e ZIKV.....	66
Quadro 3	Resultados de testes ELISA apontando tripla detecção entre IgM anti CHIKV/ DENV/ZIKV, relatando IgG anti CHIKV/DENV/ZIKV e NS1, de acordo com o sexo, idade e dias de sintomas na população em estudo, Ceará, 2017. N=3.....	85
Quadro 4	Resultados de testes apontando coinfeção entre CHIKV e DENV, relatando IgM e IgG Anti CHIKV/DENV/ZIKV, NS1-DENV e RT-PCR para CHIKV, de acordo com o sexo e dias de sintomas na população em estudo, Ceará, 2017.N=2.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sócio-demográficas e epidemiológicas dos pacientes do estudo, confirmados laboratorialmente com chikungunya IgM, Ceará, 2017 (N = 359)	69
Tabela 2	Média e mediana das idades e de tempo de sintomas relatados na coleta dos pacientes do estudo, confirmados laboratorialmente com chikungunya IgM, Ceará, 2017 (N = 359)	69
Tabela 3	Resultado das sorologias por ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017 (N = 359/345)	71
Tabela 4	Resultados de sorologia IgM e IgG anti CHIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N = 359)	71
Tabela 5	Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo para o perfil IgM/IgG anti CHIKV ⁺ , Ceará, 2017 (N = 105)	72
Tabela 6	Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta de amostras dos pacientes do estudo com IgG anti CHIKV ⁺ , Ceará, 2017. (N = 105)	72
Tabela 7	Resultados de codetecções entre CHIKV e DENV por sorologia IgM, Ceará, 2017(N=359)	74
Tabela 8	Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com o perfil IgM anti CHIKV ⁺ e IgM anti DENV ⁺ , Ceará, 2017 (N = 82)	75
Tabela 9	Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta de amostras dos pacientes do estudo com codetecção IgM anti CHIKV/DENV, Ceará, 2017 (N = 82)	75
Tabela 10	Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo confirmados laboratorialmente com IgG anti DENV ⁺ , Ceará, 2017 (N = 285)	78
Tabela 11	Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta das amostras dos pacientes do estudo com codetecção IgM anti CHIKV/IgG anti DENV, Ceará, 2017 (N = 285)	78
Tabela 12	Perfil IgM/IgG anti DENV de pacientes do estudo confirmados laboratorialmente com IgM anti CHIKV, Ceará, 2017 (N = 341)	79

Tabela 13	Resultados de codeteccões entre IgM anti CHIKV e DENV NS1.....	80
Tabela 14	Resultados de codeteccões entre CHIKV e ZIKV por sorologia IgM, dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N = 359)	81
Tabela 15	Características sóciodemográficas e epidemiológicas de pacientes com perfil IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ⁺ do estudo Ceará, 2017. (N =10)	82
Tabela 16	Características sóciodemográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com perfil IgM CHIK ⁺ /IgG ZIKV ⁺ , Ceará, 2107 (N =177)	83
Tabela 17	Distribuição dos resultados de NS1-DENV e sorologias IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N= 91)	86
Tabela 18	Características sóciodemográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com CHIKV ⁺ por qRT PCR, Ceará, 2017 (N = 53)	88
Tabela 19	Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta dos pacientes do estudo com CHIKV ⁺ por qRT PCR, Ceará, 2107 (N = 53)	88
Tabela 20	Resultado de qRT-PCR CHIKV ⁺ e deteccões IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV, NS1-DENV, pacientes do estudo, Ceará, 2107 (N=53)	90

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Soropositividade IgM/IgG anti CHIKV de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017 (N = 339)	73
Gráfico 2	Histograma perfil IgM/IgG anti CHIKV em relação aos dias de sintomas, Ceará, 2017(N=339)	73
Gráfico 3	Perfil de IgM/IgG anti CHIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas.....	74
Gráfico 4	Soropositividade de IgM anti CHIKV x IgM anti DENV, de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017(N=355)	76
Gráfico 5	Perfil de IgM CHIKV/DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N= 355)	76
Gráfico 6	Perfil de IgG anti DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N=344)	79
Gráfico 7	Perfil de IgM/IgG Anti DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N= 341)	80
Gráfico 8	Perfil de NS1-DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=341)	81
Gráfico 9	Perfil de IgM anti CHIKV/ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=358)	82
Gráfico 10	Perfil de IgG anti ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N=35)	84
Gráfico 11	Resultado das sorologias evidenciando as codetecções entre IgM anti CHIKV, anti DENV e anti ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359)	86
Gráfico 12	Perfil de NS1-DENV e IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359)	87
Gráfico 13	Resultados de qRT-PCR CHIKV de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359)	89
Gráfico 14	Resultados de qRT-PCR CHIKV ⁺ e IgM/IgG anti CHIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N=53)	89

Gráfico 15	Perfil de codeteccões entre IgM CHIKV, DENV e ZIKV com detecção de RT-PCT CHIKV, de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017 (N =359)	90
------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Alanina (Aminoácido)

Ae. - *Aedes*

CD – Células Dendríticas

CD94- Grupamento de diferenciação 94 (Cluster of Differentiation 94)

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention)

CHIK – Chikungunya

CHIKV – Vírus da Chikungunya

COVIG – Coordenadoria de Vigilância em Saúde

CUT-OFF – Ponto de corte

DENV- Vírus da Dengue

DENV1- Vírus da Dengue sorotipo 1

DENV2 – Vírus da Dengue sorotipo 2

DENV3 – Vírus da Dengue sorotipo 3

DENV4 - Vírus da Dengue sorotipo 4

E1 - Proteína 1 do envelope viral

E2- Proteína 2 do envelope viral

ECISA – Genótipo Leste/Centro/ Sul Africano

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

GAL – Gerenciador de Ambiente Laboratorial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFI - Imunofluorescência Indireta

IFN – Interferon

IFN γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina da classe G

IgM – Imunoglobulina da classe M

IL-7 – Interleucina 7

IL-12- Interleucina 12

IOL – Linhagem do Oceano Indico

K – Lisina (Aminoácido)

kb - Quilobase

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

LIRAA - Levantamento Rápido de Índice para Aedes aegypti

M.S – Ministério da Saúde

MAYV - Mayaro vírus

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1

Min – Minutos

NK - Células Natural Killer ou células matadoras naturais

NKG2C - Proteína de membrana integral NKG2-C tipo II

nm – Nanômetro (unidade de comprimento de onda)

NS1- Proteína não estrutural 1 (Vírus da Dengue)

nsP1 – Proteína não estrutural 1

nsP2 - Proteína não estrutural 2

nsP3 - Proteína não estrutural 3

nsP4 - Proteína não estrutural 4

NUVEP – Núcleo de Vigilância Epidemiológica

ONNV - Vírus O'nyong nyong

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

OROV - Oropouche vírus

P1234 - Poliproteína não estrutural 1234

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase.

pH – Potencial hidrogeniônico

POC – Teste Imunocromatográfico tipo teste rápido (Point-of-Care)

PRNT – Teste de Neutralização de Redução de Placas

qRT-PCT – Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em tempo real

RMF – Região Metropolitana de Fortaleza

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm - Ácido Ribonucléico mensageiro

RRV – Ross River Vírus

RT-PCT – Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa

Seg- Segundos

SESA CE – Secretaria de Saúde do Estado do Ceará

SGB - síndrome de Guillain-Barré

SINAN – Sistema de Agravos e Notificações

SISLAB - Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública

TCD4⁺ - Linfócitos TCD4⁺

TCD8⁺ - Linfócitos TCD8⁺

V – Valina (Aminoácido)

Waf - Genótipo Ocidental ou Oeste Africano

ZIKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVÍRUS	24
1.2 CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	25
1.2.1 Dengue	26
1.2.2 Zika	28
1.2.3 Chikungunya	30
1.3 DINÂMICA DA TRANSMISSÃO DO CHIKV	34
1.3.1 Vetor e reservatório	34
1.3.2 Transmissão	36
1.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DO CHIKV	37
1.5 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	40
1.6 REPLICAÇÃO VIRAL	42
1.7 PATOGÊNESE	43
1.8 RESPOSTA IMUNE.....	45
1.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	48
1.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	50
1.11 COCIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS.....	53
2 JUSTIFICATIVA	56
3 OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL.....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS.....	58
4.2 TIPO DE ESTUDO	58
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	58
4.4 LOCAL DO ESTUDO	58
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	59
4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	59
4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E DEFINIÇÕES DIAGNÓSTICAS.....	59
4.8 DESENHO DO ESTUDO	60
4.9 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	60

4.9.1 Diagnóstico sorológico para IgG Anti CHIKV	61
4.9.2 Diagnóstico sorológico IgM Anti DENV	61
4.9.3 Diagnóstico sorológico IgG Anti DENV	62
4.9.4 Diagnóstico sorológico IgM Anti ZIKV	63
4.9.5 Determinação sorológica IgG Anti ZIKV	64
4.9.6 Determinação do antígeno NS1-dengue	65
4.10 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	65
4.10.1 Extração do RNA viral	65
4.10.2 qRT-PCR para detecção de DENV, CHIKV e ZIKV	66
4.11 ANÁLISE DE DADOS	67
5. RESULTADOS	68
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ARBOVÍRUS

Arbovírus, termo que deriva da expressão inglesa “*arthropod born viruses*” (vírus transmitidos por artrópodes) são assim designados não somente pela sua veiculação, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos. São transmitidos aos seres humanos e outros animais através da picada de artrópodes hematófagos, sendo causadores importantes de doenças humanas em todo mundo (RUST.R.S, 2012).

São estimadas mais de 545 espécies de arbovírus, das quais, mais de 150 relacionam-se com doenças em seres humanos. Com capacidade de desenvolver estratégias de sobrevivência a longo prazo, esses vírus contam, ainda, com grande variedade de espécies de artrópodes potencialmente capazes de serem infectadas, principalmente mosquitos e carrapatos (cerca de 300 espécies de mosquito podem transmitir arbovírus). Os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* são os mais frequentemente associados à transmissão de arbovírus (CALISHER, 1998; GUBLER, 2001; LOPES et al., 2014; LIANG et al., 2015).

Os arbovírus circulam entre animais silvestres, e muitos deles causam doenças (após transmissão) em humanos e/ou animais domésticos, que são os hospedeiros incidentais ou terminais (DONALISIO et al., 2017).

Vírus como Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) que perderam a necessidade de amplificação enzoótica, agora produzem epidemias extensas em centros urbanos tropicais. Muitos arbovírus que evoluíram e se diversificaram nos trópicos produziram cepas virulentas e invasivas que causaram grandes surtos em latitudes temperadas. A capacidade desses vírus de causar doenças humanas depende de fatores que variam da epidemiologia, nível de imunidade da população à genética viral (WEAVER S.C, REISEN WK., 2009; LOPES et al., 2014; LIANG et al., 2015).

Os arbovírus incluem uma ampla variedade de vírus de RNA, agrupados em diferentes famílias, onde as principais de interesse para a saúde pública são: *Togaviridae* (contemplando o *alfavírus*), *Flaviviridae* (contemplando os *flavivírus*), *Reoviridae* e *Bunyaviridae* (Go YY, BALASURIYA UB; LEE CK, 2014). Estes grupos de vírus contam com uma variedade de tipos de genomas de RNA e de estratégias de replicação (WEAVER,S.C; REISEN,W.K. 2009).

As infecções por arbovírus nem sempre são clinicamente evidentes, muitas geram um quadro assintomático, e quando se manifestam, geralmente desaparecem espontaneamente após 1 a 2 semanas com um período de viremia relativamente curto. O espectro clínico das

arboviroses em seres humanos pode variar desde doença febril indiferenciada, moderada ou grave, com sintomas de gripe como febre, cefaleia, dor retro-orbital e mialgia; erupções cutâneas como exantema ou rash maculopapular; artralgia; síndrome neurológica e síndrome hemorrágica caracterizada por petéquias, hemorragia e choque combinado com uma redução intensa de plaquetas, causando assim, um grande ônus social e econômico (CLETON et al., 2012; LIANG et al., 2015; DONALISIO et al., 2017; MANSUY et al., 2018).

Apesar da distribuição global, a maioria dos arbovírus tende a ter uma distribuição geográfica e climática mais restrita, como parte de um subsistema ecológico especial, representado pelos vírus, vetores, hospedeiros amplificadores e reservatórios. A ocorrência destes vírus associados a doenças humanas e animais ocorre em regiões tropicais e subtropicais. Porém, muitos também circulam entre espécies selvagens nas regiões temperadas. O único continente onde os arbovírus não são endêmicos é o Antártico (LIANG et al., 2015; LOPES et al., 2014).

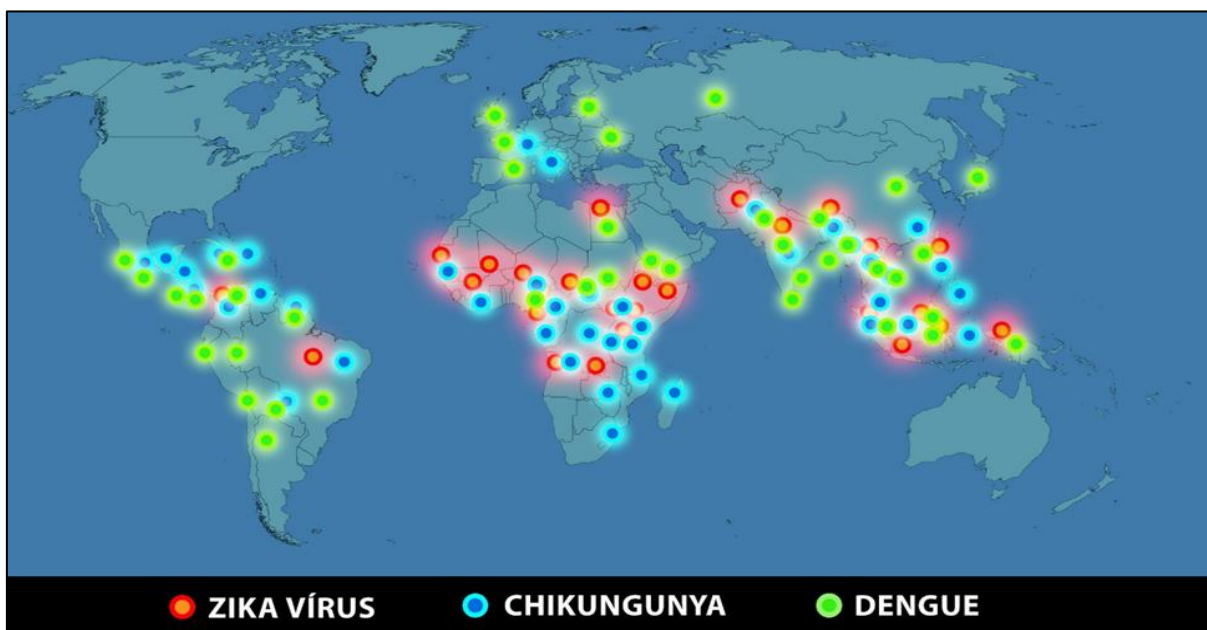
A mudança no comportamento antropológico, mudanças climáticas e a alta frequência de mutações evolutivas são fatores determinantes na emergência de arboviroses (LIANG et al., 2015). Arbovírus emergentes ou invasores podem amplificar-se a níveis epidêmicos porque os sistemas naturais foram alterados por modificações na genética viral, na composição ou dinâmica da população hospedeira ou vetorial e /ou na estrutura ambiental (LIANG et al., 2015).

Assim sendo, os surtos por arboviroses emergentes podem estar relacionados a mudanças relativamente pequenas na genética viral ou à introdução de novas variantes com diferentes níveis de virulência e viremia, alcançando hospedeiro e aumentando o potencial de amplificação (WEAVER; REISEN, 2010). Além disso, os arbovírus desenvolveram diferentes estratégias evolutivas (como mutações e recombinação genética) decorrentes de pressões seletivas que aumentaram a competência viral de novas variantes com potencial epidêmico e favoreceram sua adaptação a novos ambientes e a diferentes vetores e hospedeiros (GUBLER, 2001; COFFEY et al., 2014).

1.2 CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

Nos últimos anos os vírus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) produziram um grande número de epidemias em todo o mundo, causando significativa morbidade e mortalidade em diversas partes do mundo (MERCADO-REYES *et al.*, 2019). (Figura 01).

Figura 01 - Mapa da Dengue, Zika e Chikungunya no mundo.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

Esses arbovírus emergentes responsáveis por epidemias recentes cocirculam em regiões geográficas semelhantes, tropicais e subtropicais, utilizam-se do mesmo vetor e mecanismo de transmissão, são extremamente adaptados ao ambiente urbano e apresentam similaridade em seus sinais e sintomas (COFFEY et al., 2014).

Sendo o Brasil um país de clima tropical com uma vasta área de floresta e outros ecossistemas naturais, oferece condições ideais para a reprodução de vetores responsáveis pela disseminação arboviral (VASCONCELOS et al., 2001; FIGUEIREDO, 2007). Atualmente, diferentes arbovírus causadores de doenças em humanos, como DENV, ZIKV, CHIKV, Mayaro vírus (MAYV) e Oropouche vírus (OROV) cocirculam pelo país (CASSEB *et al.*, 2013; FIGUEIREDO, 2015; MOTA *et al.*, 2016; DONALÍSIO et al., 2017).

1.2.1 Dengue

O DENV, arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, é considerado o causador da doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida (WHO, 2013). Medindo cerca de 40-50 nm, é esférico, com o envelope lipídico. O genoma tem aproximadamente 11.000 bases de comprimento e é composto de três proteínas estruturais e sete não estruturais (GUBLER, 1998). As três proteínas estruturais codificadas pelo genoma são a proteína da membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína da cápside (C); as

proteínas não estruturais (NS) são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (GUZMAN et al., 2016). Apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4, que estão amplamente distribuídos em diversas regiões tropicais do mundo, sendo responsáveis por surtos e epidemias em diferentes países.

A identificação do DENV1 e DENV2 ocorreu por volta de 1940, enquanto o DENV3 e o DENV4 foram primeiramente isolados durante epidemias nas Filipinas em 1956 (LINDENBACH, 2007). As primeiras notificações de epidemias de dengue ocorreram em 1779 e 1780 na Ásia, África e América do Norte. As ocorrências simultâneas e próximas de epidemias nos três continentes indicam que o vírus e o vetor estão distribuídos nos trópicos há mais de 200 anos. As epidemias iniciadas no sudeste Asiático nas décadas de 1940 e 1950 se expandiram para o resto do mundo nas décadas subsequentes e após a Segunda Guerra Mundial, pareciam estar sob controle na América Central e do Sul por conta da campanha contra febre amarela iniciada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), que foi interrompida em 1970. A partir de então, a dengue tornou-se uma das principais causas de internação e morte de crianças em alguns países (MURRAY; QUAM, 2013).

Grande parte das infecções é assintomática e quando sintomática pode evoluir para a cura ou para quadros hemorrágicos/neurológicos. A gravidade da doença está associada a diversos fatores, dos quais se destacam: a resposta imunológica produzida diante de infecções sequenciais e coinfeções por diferentes sorotipos, a virulência apresentada por alguns genótipos e características genéticas do hospedeiro (HALSTEAD, 2007; GUZMAN e HARRIS, 2015). Atualmente, essa doença ainda afeta a maioria dos países da Ásia e representa uma das principais causas de hospitalização e mortalidade infantil (MACIEL; SIQUEIRA JUNIOR; MARTELLI, 2008).

No Brasil, a primeira epidemia de dengue documentada clínica e laboratorialmente aconteceu em 1981-1982, em Boa Vista-RR, causada pelo DENV-1 e DENV- 4. Em 1986 ocorreram as primeiras epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste. Desde então, a dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada intercalando-se com epidemias. No período entre 2002 e 2014 consolidou-se como um dos maiores desafios da saúde pública no Brasil (BRASIL, 2017). A doença afeta principalmente a população adulta, mas os sistemas de vigilância detectaram também uma tendência crescente à hospitalização, gravidade da doença e incidência em crianças e adolescentes. Hodiernamente no país circulam os quatro sorotipos da doença: DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4. Essas variantes apresentam um complexo pleomorfismo em suas manifestações clínicas e epidemiológicas e a infecção por um sorotipo não confere imunidade para outro. (TEIXEIRA, BARRETO; GUERRA, 1999). Desta

forma, configura-se como um preocupante problema de saúde pública tendo em vista elevada incidência anual, o que ocasiona uma acentuada busca aos serviços de saúde por parte da população (MACIEL; SIQUEIRA JUNIOR; MARTELLI,2008).

No Ceará, casos de dengue são notificados desde 1986 e os quatro sorotipos já foram isolados (DENV-1 1986, DENV-2 1994, DENV-3 2002 e DENV-4 2011). A doença desde então tem apresentado períodos endêmicos e epidêmicos com o registro de pelo menos 14 períodos epidêmicos nos anos de 1987, 1994, 2001, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2011, 2012 2013, 2014, 2015 e 2016; todos com incidência superior a 300 casos/100.000 habitantes (CEARÁ, 2019; CAVALCANTI, 2018). Um estudo, referente a 2012, revelou a cocirculação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) e a identificação do DENV Genótipo II pela primeira vez no estado (RAMALHO, 2018).

Desde 2015 Dengue apresenta circulação simultânea com mais dois arbovírus importantes, Zika e Chikungunya. (CAVALCANTI, 2018).

Em 2017, foram notificados 80.768 casos de dengue no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), correspondendo a uma taxa de incidência no Estado de 279,0 casos por 100 mil habitantes, distribuídos nos 184 municípios. (CEARÁ, 2019) (Figuras 2 e 3).

Em 2018, até a SE 52, foram notificados 14.966 casos suspeitos e 3.698 (24,7%) confirmados. (CEARÁ, 2019) (Figura 2).

Em 2020, até a SE 36, foram notificados 34.694 casos suspeitos, com 17.108 (49,3%) casos confirmados (CEARÁ, 2020).

1.2.2 Zika

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, causador de uma doença exantemática aguda que ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo. O genoma consiste em uma molécula de RNA, de cadeia simples e de sentido positivo. São reconhecidas duas linhagens, a africana e a asiática, e três genótipos, o oeste africano, o leste africano e o asiático, sendo este último o responsável pelo surto ocorrido no Brasil (LOWE, 2018). A transmissão, na maioria dos casos, ocorre pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* (RIBEIRO 2018).

ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir do sangue de um macaco rhesus (*Macaca mulatta*) utilizado como “sentinela” num estudo sobre febre amarela na floresta de Zika, Uganda. A primeira caracterização da doença humana após infecção por ZIKV (2 casos baseados em soroconversão e um caso baseado no isolamento do vírus a partir do soro de uma

menina febril) ocorreu na Nigéria em 1954. De 1952 a 1981, várias evidências sorológicas de infecção pelo vírus foram reportadas em países da África e em regiões da Ásia (LANCIOTTI, 2017; BRASIL/M.S, 2017; WEAVER *et al.*, 2016). A primeira detecção direta de ZIKV na Ásia, bem como a primeira evidência de transmissão por um vetor urbano ocorreu quando o vírus foi isolado de mosquitos *A. aegypti* coletados na Malásia em 1966. Onze anos depois, as primeiras infecções humanas na Ásia foram diagnosticadas na Indonésia, por soroconversão (WEAVER *et al.*, 2016).

As infecções por ZIKV em humanos eram raras até 2007, quando ocorreu a primeira epidemia por este vírus, em Yap, Micronésia (LANCIOTTI, 2017) que atingiu cerca de três quartos da população e onde se verificou um curso benigno e autolimitado da infecção. Os diagnósticos iniciais por meio de testes laboratoriais com análises rápidas, se confundiram com o DENV, onde este era considerado o provável agente causador. No entanto, novas análises imunológicas e moleculares, incluindo o sequenciamento de ácidos nucleicos realizadas em amostras do surto, indicaram aproximadamente 90% de identidade com o ZIKV (CABRAL-CASTRO, 2016). Em 2013, o ZIKV alcançou a Polinésia Francesa, expandindo-se para várias outras ilhas da Oceania, incluindo Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa. Estima-se que o surto polinésio francês tenha afetado aproximadamente 11% da população (HORWOOD *et al.*, 2013). Coincidentemente, durante esse surto, é descrita pela primeira vez a síndrome de Guillain-Barré como complicação associada a esta infecção (CABRAL-CASTRO, 2016). Durante esse surto, foram documentadas as primeiras evidências de risco de transmissão através dos bancos de sangue e a detecção de ZIKV (ou RNA viral) no sêmen, saliva e urina (WEAVER *et al.*, 2016).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, a circulação autóctone do ZIKV nas Américas foi confirmada em fevereiro de 2014. Em fevereiro de 2015, Ministério da Saúde começou a monitorar o registro de casos de síndrome da erupção cutânea indefinida, nos estados do nordeste do Brasil. O primeiro caso de ZIKV no Brasil foi detectado em abril de 2015, e posteriormente, em maio do mesmo ano, o Ministério da Saúde confirmou laboratorialmente a circulação autóctone do ZIKV. Os primeiros registros ocorreram nos estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA), posteriormente, em outros estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste, atingindo 19 estados brasileiros (CABRAL-CASTRO, 2016; WEAVER, 2016; ARAÚJO, *et al.*, 2016) e afetando mais gravemente a região Nordeste do país, onde especialistas observaram associação de malformações congênitas, o que até então não havia sido descrito em outros países que apresentaram surto da doença (BRASIL/M.S, 2017). No final de 2015, foi verificada a associação entre microcefalia e a

infecção por vírus Zika, cuja relação causal, bem como ligação com outras malformações que compõem esta síndrome congênita, ainda estão sendo elucidadas (BROGUEIRA; MIRANDA, 2017). Isso levou o Brasil a declarar uma emergência nacional de saúde pública em novembro de 2015, seguida por uma decisão semelhante da Organização Mundial da Saúde (LOWE et al., 2018).

No Ceará, a partir de abril de 2015, ocorreu o surto de doença caracterizada por erupção maculopapular, prurido e febre leve, hiperemia conjuntival, dor e inchaço nos pulsos e tornozelos. Uma unidade sentinela localizada no Hospital São José, referência para doenças infecciosas, coletou amostras para exames virais de pacientes com essas características e as enviou para o LACEN-CE, onde foram testadas e encaminhadas, para testagens complementares, ao Instituto Evandro Chagas, laboratório de referência em arbovírus, o qual identificou em algumas das amostras a infecção pelo ZIKV (ARAÚJO, et al., 2016).

Em 2017, no Ceará, foram registrados 3.495 casos notificados de Zika em 55,4% dos municípios do Estado. Destes, 581 (16,7%) foram confirmados (CEARÁ, 2019) (Figuras 2 e 3).

Em 2018, até a SE 52, foram notificados 590 casos suspeitos e 37 (6,3%) confirmados (CEARÁ, 2019). Em 2020, até a SE 36, foram notificados 535 casos suspeitos, com 86 (16,1%) casos confirmados (CEARÁ, 2020).

1.2.3 Chikungunya

Doença febril aguda causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), um arbovírus pertencente à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. Originário da África, onde circula em ciclos silvestres envolvendo vetores do gênero *Aedes* e primatas não humanos (Burt *et al.*, 2012). De ampla distribuição mundial e que tem causado grande preocupação, principalmente pelas debilitantes e duradouras manifestações clínicas que deixam os pacientes impossibilitados de executarem suas atividades diárias ocasionando sérios impactos econômicos devido à redução da produtividade. (CHIA et al., 2010; MOHAN et al., 2010; DONALÍSIO; FREITAS, 2015; KRUTIKOV; MANSON, 2016).

A denominação “Chikungunya” provém da língua *Makonde* do povo Bantu e significa “*Aquele que se curva*”, relacionando-se à postura curvada do paciente devido à poliartralgia intensa, debilitante e incapacitante relacionada aos que foram acometidos por essa enfermidade (ROBINSON, 1955; PETERSEN, 2015).

Em 1823, a chikungunya clássica, um exantema viral em humanos, ocorreu em Zanzibar, África Oriental, onde era conhecido como kidengapepo, que significa "febre de

quebrar osso" (CARREY, 1971). A doença foi descrita pela primeira em 1952 nas Planícies Makonde, ao longo das fronteiras entre Tanzânia e Moçambique (África Oriental). Surgiu como uma doença febril aguda com exantema e artralgia, mas que se diferenciava dos relatos anteriores de dengue por se apresentar com uma dor articular intensa (ROBISON, 1955). Em 1953, uma epidemia que ocorreu em Newala, distrito da Tanzânia, permitiu, pela primeira vez, o isolamento do vírus a partir do soro de um paciente febril e esclareceu também algumas questões relacionadas à patogenia viral (ROSS, 1956). A partir de então CHIKV foi responsável por surtos emergentes e reemergentes em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo (BRASIL /MS, 2014; LO PRESTI et al., 2014).

Na Ásia, o CHIKV foi relatado pela primeira vez em Bangkok, na Tailândia, em 1958 (YANG et al., 1981). Durante as décadas de 1960 a 1990, foram registrados surtos na República Democrática do Congo, República Centro-Africana, Malawi, Uganda, Burundi, Angola, Guiné, África do Sul e Nigéria (RENAULT, 2012).

O vírus manteve-se restrito em algumas regiões tropicais do mundo até 2004 e 2005 quando reemergiu. Um surto na costa do Quênia, onde cerca meio milhão de casos foram registrados em 2004 no Atol de Lamu, propagou o vírus para Comores, Maurício, Ilhas Reunião e outras ilhas do Oceano Índico em 2005, chegando em 2006 a Índia, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Cingapura, Malásia e Indonésia. No período, foram registrados aproximadamente 1,9 milhão de casos, a maioria na Índia (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; RAMIREZ-ARROYO, 2018).

Outras epidemias ocorreram em todas as ilhas do sudoeste do Oceano Índico, exceto Madagascar, no biênio 2005 – 2007 (BORGHERINI, et al., 2007; RAMFUL, et al., 2007; SERGON et al., 2008).

Em 2006, foi observado aumento significativo no número de complicações neurológicas associadas ao CHIKV, na taxa de mortalidade e em infecções fetais (BORGHERINI, et al., 2007; RAMFUL, et al., 2007; SERGON et al., 2008).

Na Europa, o primeiro surto autóctone foi relatado em Emilia-Romagna, Itália em 2007. Em 2010, há relato de casos na Índia, Indonésia, Mianmar, Tailândia, Ilhas Maldivas, Ilhas Reunião e Taiwan, todos com transmissão sustentada. França e Estados Unidos também registraram casos em 2010 (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; RAMIREZ-ARROYO, 2018). A França relatou um número significativo de casos autóctones confirmados em laboratório em 2010, 2013 e 2014. Em 2014, ocorreu um surto de casos autóctones na França, Porto Rico, Miami e Haiti (DELISLE et al., 2015).

Nas Américas, o início do CHIKV ocorreu em dezembro de 2013, na ilha caribenha de Saint Martin, após investigação de doença febril com resultados laboratoriais negativos para a

dengue (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). O CHIKV emergente pertencia ao genótipo asiático e se espalhou para 17 países da América do Sul até dezembro de 2014. Desde seu primeiro relatado, a transmissão autóctone foi identificada em 45 países no Caribe, na América do Norte, na América do Sul e na América Central (YACTAYO, S. et al., 2019 e HENRY, M et al., 2017).

A condição de uma população vulnerável ao CHIKV, a distribuição dos vetores competentes *A. aegypti* e *A. albopictus* e o intenso movimento de pessoas dentro e entre as ilhas foram fatores que provavelmente contribuíram para a rápida disseminação do CHIKV nas Américas (Central, do Sul e do Norte), onde mais de 1,2 milhão de casos autóctones foram relatados à Organização Pan-Americana da Saúde nas Américas no período de 2013 a 2014 (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016).

No Brasil, em 2010, foram notificados os três primeiros casos importados de chikungunya (ALBUQUERQUE et al., 2012) e a transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque/AP e posteriormente em Feira de Santana/BA (NUNES et al., 2015). Não houve identificação da mutação A226V nos casos registrados; (SILVA et al., 2018b) Análises filogenéticas e epidemiológicas identificaram o genótipo asiático como responsável pela transmissão autóctone no Amapá, já em Feira de Santana foi isolado o genótipo ECSA, cuja introdução foi resultante da imigração de um paciente proveniente de Angola, o caso índice que desenvolveu sintomas da doença na cidade da Bahia (NUNES et al. 2015). Em 2015 o vírus atingiu o Sudeste, sendo identificado o primeiro caso de transmissão autóctone do vírus no estado do Rio de Janeiro. Através de análises filogenéticas e caracterização molecular identificou-se o genótipo ECSA como responsável pela epidemia de CHIKV na cidade do Rio de Janeiro em 2016 (SOUZA et al., 2017). No Brasil, a correlação entre Chikungunya e o Sistema Nervoso Central também foi observada após a constatação do CHIKV em amostras de tecido cerebral e líquido cefarraquidiano, coletadas na epidemia de Chikungunya no estado do Ceará em 2017 (LIMA STS, SOUZA WM, CAVALCANTE JW, et al., 2020).

No Ceará, foram registrados os primeiros casos importados de Chikungunya em meados de 2014 e início de 2015. Em julho de 2014 foi relatado o primeiro caso de chikungunya importado no município de Brejo Santo. Tratava-se de um seminarista residente em Pernambuco, cuja provável fonte de infecção foi da República Dominicana, para onde ele havia sido deslocado. No mesmo período ocorreram os primeiros casos importados de indivíduos residentes em municípios do Estado do Ceará. Esses indivíduos estiveram de férias na República Dominicana. Em setembro foi relatado um caso importado no município de

Aracoiaba e em dezembro um na cidade de Fortaleza (SIMIAO, et al., 2019). A ocorrência do primeiro caso autóctone deu-se em novembro de 2015, com a confirmação de um caso residente no município de São Gonçalo do Amarante, município do principal complexo portuário do Estado (Pecém). O segundo caso autóctone ocorreu em Fortaleza, em dezembro de 2015, este associado ao contato com caso confirmado laboratorialmente importado do estado do Pernambuco. Desde então, a doença apresentou caráter explosivo, levando milhares de pessoas às unidades de saúde para tratamento das dores poliarticulares (CEARÁ, 2017).

Em 2016, houve transmissão sustentada da chikungunya no Estado do Ceará, caracterizando um cenário epidêmico, com 44.149 casos suspeitos, sendo que 28.706 (65,02%) foram confirmados (CEARÁ, 2017).

Em 2017, foram notificados 139.501 casos suspeitos de chikungunya, destes, 105.232 (75,4%) foram confirmados por critérios clínico epidemiológicos e/ou laboratoriais e 194 (0,14%) foram óbitos. (Figuras 2 e 3). Houve predomínio em indivíduos do sexo feminino, bem como da faixa etária compreendida entre 20-59 anos (CEARÁ, 2019).

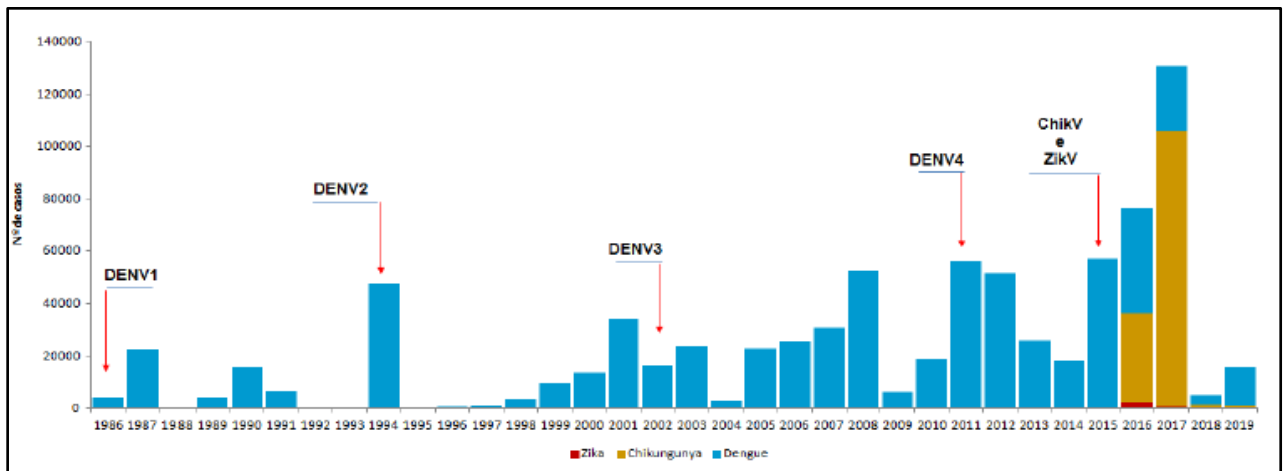
O cenário epidemiológico em 2018 foi bem distinto, com características de endemia. O número de casos notificados foi de 5.217, onde 14,4% (1.413/5.217) foram confirmados, com taxa de incidência de 15,8/100.000 habitantes (CEARÁ/SESA, 2019). Em 2020, até a SE 36, foram notificados 3.014 casos suspeitos, com 19,1% (575/3.014) confirmados (CEARÁ, 2020).

Figura 2 - Dados epidemiológicos de dengue, chikungunya e Zika, até SE 52, Ceará, 2018-2019

ESTADO DO CEARÁ		Até 52/2017	Até 52/2018*
DENGUE	CASOS NOTIFICADOS	80.768	14.966
	CASOS CONFIRMADOS	25.012	3.698
	TX DE INC.CONF. (por 100 mil)	279,0	41,2
	Nº DE ÓBITOS	26	11
CHIKUNGUNYA	CASOS NOTIFICADOS	139.501	5.217
	CASOS CONFIRMADOS	105.232	1.413
	TX DE INC.CONF. (por 100 mil)	1.174,0	15,8
	Nº DE ÓBITOS	194	1
ZIKA	CASOS NOTIFICADOS	3.495	590
	CASOS CONFIRMADOS	581	37
	TX DE INC.CONF. (por 100 mil)	5,3	0,4
	Nº DE ÓBITOS	0	0

Fonte: Sinan. Dados exportados em 15/01/2019.

Figura 3 - Distribuição dos casos confirmados de chikungunya, Zika e dengue, com a introdução dos respectivos sorotipos, Ceará, 1986-2019



Fonte: SESA/COVIG/NUVEP/Sinan. Dados exportados em 22/07/2019.

Desse modo, as arboviroses representam um grave problema de saúde pública para o Brasil. Isto ocorre principalmente porque, dentre outros fatores, o país apresenta condições favoráveis para reprodução dos vetores responsáveis pela dispersão arboviral no meio urbano. Atualmente, dentre os diferentes arbovírus em circulação, CHIKV vem merecendo maior destaque pelo relevante aumento da incidência em regiões não endêmicas e pela debilitante e duradoura e, muitas vezes incapacitante artralgia e agravos reumáticos relatados pelos pacientes acometidos (SIMON et al., 2007; FIGUEIREDO, 2015; MOTA et al., 2016; DONALÍSIO et al., 2017).

1.3 DINÂMICA DA TRANSMISSÃO DO CHIKV

1.3.1 Vetor e reservatório

Aedes aegypti (*Ae. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*Ae. albopictus*), são os principais vetores associados à transmissão do CHIKV quando se trata do ciclo urbano. Ambos os mosquitos amplamente distribuídos, habitam principalmente regiões tropicais e temperadas do mundo (BRASIL, 2014). O *Ae. aegypti* é considerado o vetor primário para transmissão do CHIKV. Em 2006 *Ae. albopictus* foi identificado como o segundo maior vetor do vírus em locais onde o *Ae. aegypti* é considerado raro (Ilha da Reunião) e em locais onde ambos os mosquitos são prevalentes. A emergência do *Ae. albopictus* como vetor do CHIKV se deu por

uma mutação (E1A226V) na proteína E1 CHIKV, o que facilitou a captação, replicação e transmissão do vírus pelo vetor (THIBOUTOT et al., 2010; TSETSARKIN et al., 2011).

O *Aedes aegypti* tem comportamento que propicia a transmissão epidêmica, porque a fêmea adulta se alimenta de sangue humano e durante um ciclo gonotrófico ela faz vários repastos, deposita seus ovos em reservatórios de água que são locais de preferência para desenvolvimento das larvas e repousa dentro do domicílio com fácil acesso ao homem como hospedeiro (GALAN-HUERTA et al., 2015). *Aedes albopictus* é zoofílico e antropofílico, agressivo, silencioso, ativo durante todo o dia e tem uma vida mais longa que outros mosquitos (acima de 8 semanas). Presume-se que a maioria das novas introduções do *Aedes albopictus* seja pela presença dos ovos em madeiras e pneus que são exportados da Ásia para o resto do mundo. Os ovos do *Aedes albopictus* resistem às temperaturas baixas do inverno e eclodem no verão, porém as temperaturas baixas são desfavoráveis para o mosquito adulto (GALAN-HUERTA et al., 2015).

No Brasil *Ae. aegypti* afeta predominantemente regiões tropicais do país (Norte, Nordeste e CentroOeste) enquanto *Ae. albopictus* é mais comum nas áreas mais frias, como o Sul. Ambos os vetores combinados colocam cerca de 99% da população do Brasil em risco de aquisição de CHIKV (MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, 2016).

Outras espécies de vetores do gênero *Aedes* (*Ae. furcifer-taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. vittatus*, *Ae. fulgens*, *Ae. vigilax*, *Ae. camptorhynchites*, *Ae. Neoafricanus*) participam da transmissão no ciclo silvestre, que, apesar de não estar envolvido diretamente na transmissão do vírus para os humanos, pode promover a infecção de indivíduos que vivem nas proximidades de florestas (JUPP & MCINTOSH, 1990, DIALLO et al., 1999).

A determinação da competência vetorial das populações de mosquitos é um parâmetro fundamental na avaliação do risco de transmissão e disseminação do CHIKV (VEGA-RUA et al., 2014).

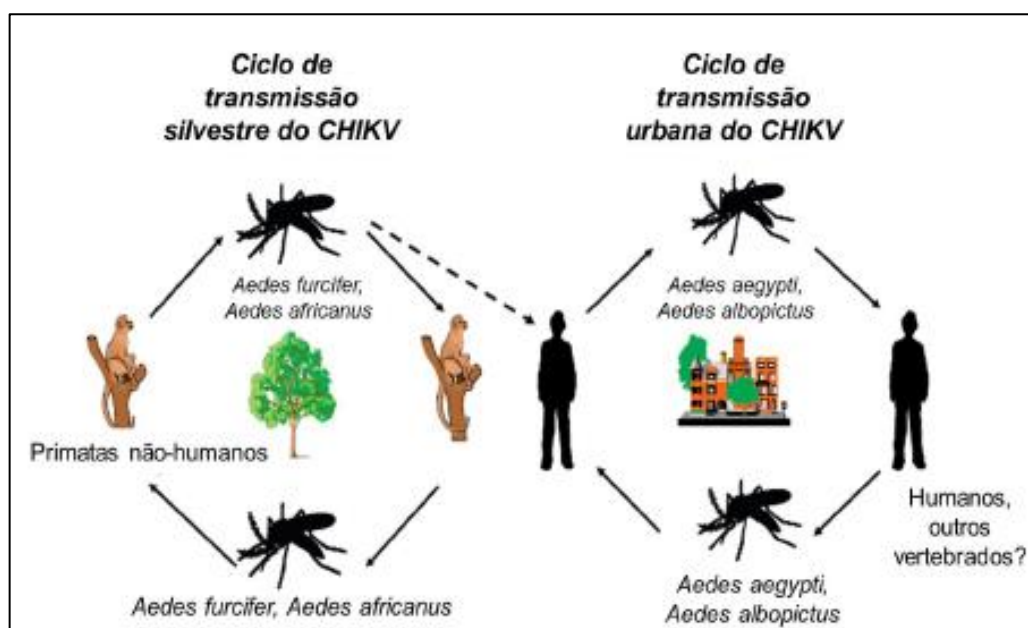
Os humanos servem como o principal reservatório do CHIKV em períodos epidêmicos (BRASIL, 2014). Durante períodos inter-epidêmicos, diversos vertebrados são destacados como reservatórios em potencial para o vírus, tais como primatas não humanos, roedores, pássaros e outros pequenos mamíferos (GALÁN-HUERTA et al., 2015; THIBERVILLE et al., 2013).

1.3.2 Transmissão

O CHIKV pode ser transmitido de forma silvestre ou urbana através de vetores principalmente do gênero *Aedes*, distribuídos em diversas partes do mundo (JULIANO e LOUNIBOS, 2005; CHARREL et al., 2007; HIGGS e VANLANDINGHAM, 2015).

De modo geral, o ciclo de transmissão humano-mosquito-humano tem início quando um vetor artrópode, devido à necessidade de as fêmeas realizarem a hematofagia para maturação dos seus ovos, se alimenta de um hospedeiro vertebrado em estado virêmico (BRASIL/MS, 2014, ROUGERON et al., 2015). Durante o período extrínseco uma gama de mecanismos é ativada no mosquito para combater a infecção viral. Entretanto, os arbovírus possuem estratégias para superar essas barreiras no mosquito e se multiplicam até atingir as glândulas salivares do mesmo, onde serão excretados durante o repasto sanguíneo, infectando assim um novo hospedeiro susceptível. Nos seres humanos picados por um mosquito infectado, os sintomas da doença geralmente ocorrem após o período intrínseco de incubação (CONWAY et al., 2014; LIANG et al., 2015, PALOMARES et al., 2018). Após esse período, a viremia no hospedeiro viabiliza a renovação do ciclo, a partir de um repasto sanguíneo de um vetor susceptível (LUM; NG, 2015) (Figura 4).

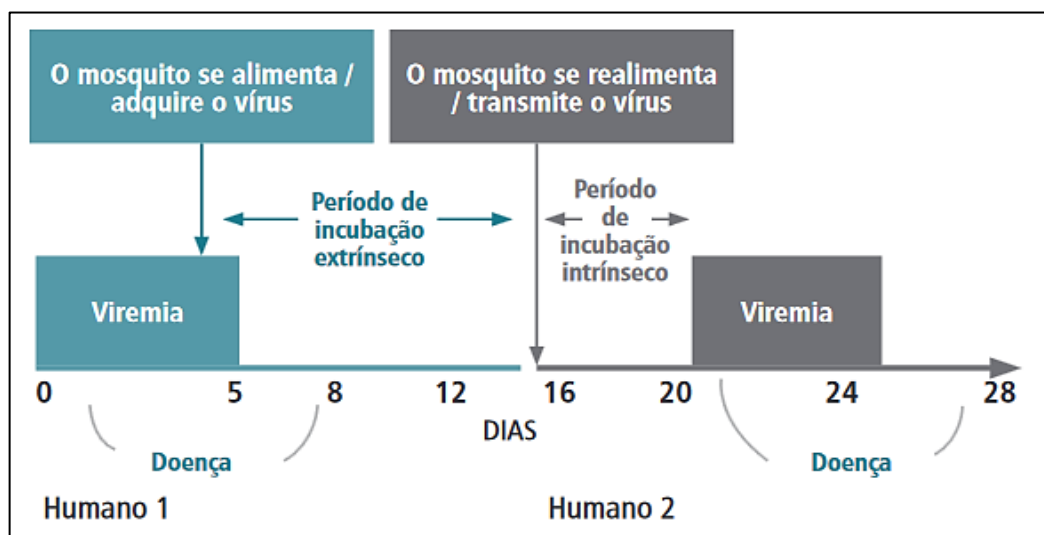
Figura 4 - Ciclo de transmissão silvestre e urbana do CHIKV.



Fonte: Powers, 2010.

O período de incubação extrínseco dura em média 10 dias e, após este, o vetor pode infectar um hospedeiro susceptível, como os seres humanos. O período de incubação intrínseco pode durar de 1-12 dias, porém mais comumente é observada uma duração de 3-7 dias (BRASIL, 2014) (Figura 5).

Figura 5 - Períodos de incubação extrínseca e intrínseca para o CHIKV



Fonte: Centres for Disease Control and Prevention/CDC e Organização Pan-Americana da Saúde.

Embora pouco comum, há relatos na literatura de outros tipos de transmissão do CHIKV, como transmissão vertical por via transplacentária e perinatal (LENGLET et al., LAOPRASOPWATTANA et al., 2016) e através do transplante de córnea (COUDERC et al., 2012). Em contrapartida, não há evidências de que o parto cesariano altere o risco de transmissão, nem que o vírus seja transmitido pelo aleitamento materno (BRASIL, 2014).

1.4 DIVERSIDADE GENÉTICA DO CHIKV

CHIKV apresenta um único sorotipo e, acredita-se, que confere imunidade protetora ao longo da vida dos indivíduos recuperados (SAHADEO et al., 2015).

Estudos de análise filogenética baseados em características genóticas e antigênicas demonstram a existência 3 genótipos e 1 linhagem, que foram denominados de acordo com o primeiro local de isolamento: genótipo Ocidental ou do Oeste Africano (Waf), genótipo Oriental ou do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), genótipo Asiático e a Linhagem do Oceano Índico (IOL), que emergiu a partir do genótipo ECSA (CHOMPOOSRI et al., 2016; NUNES

et al., 2015; VOLK et al., 2010; SUDEEP e PARASHAR, 2008; ARANKALLE et al., 2007; POWERS e LOGUE, 2007; TSETSARKIN et al., 2007).

Os genótipos Oeste Africano e ECSA tiveram origem na África, evoluíram de um mesmo ancestral selvagem e divergiram há aproximadamente 350 anos atrás (BURT et al., 2012; COFFEY et al., 2013), estando relacionados aos surtos urbanos ocorridos em toda a África subsaariana (VOLK et al., 2010, NUNES et al., 2015), sendo ECSA a mais prevalente em diversas regiões da Europa, África, Oceano Índico e Sul da Ásia (BURT et al., 2012; COFFEY et al., 2013).

Análises filogenéticas mostraram que o genótipo Asiático evoluiu a partir da Linhagem Africana Oriental entre os anos de 1920 e 1950, encontrando-se amplamente distribuída em quase todos os continentes (POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010; TSETSARKIN e WEAVER, 2011), sendo associado a extensas epidemias ocorridas no Sudeste Asiático (VOLK et al., 2010, NUNES et al., 2015).

A linhagem do Oceano Índico (IOL), derivada da ECSA, (PAROLA et al., 2006; POWERS et al., 2000; VOLK et al., 2010) foi primeiramente relatada entre os anos de 2005-2006, sendo responsável por epidemias explosivas nas Ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011 (VOLK et al., 2010, NUNES et al., 2015; SCHUFFENECKER et al., 2006), espalhando-se por diversas regiões do Hemisfério Oriental, causando surtos em mais de 60 países (REZZA et al., 2007; KUMAR et al., 2008, PULMANAUSAHAKUL et al., 2011; TSETSARKIN, 2007). Salienta-se aqui uma importante epidemia ocorrida nas Ilhas Reunião, território francês no Oceano Índico, atingindo uma população previamente "naïve" para CHIKV, estimulando a realização de muitos estudos tanto clínicos como epidemiológicos (GÉRARDIN et al., 2008).

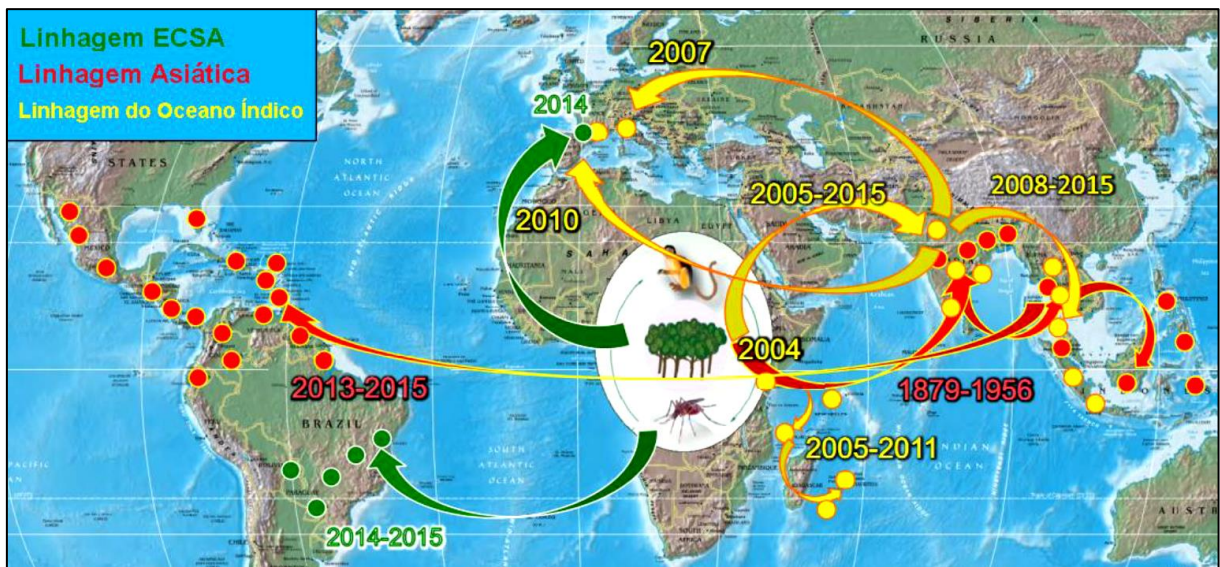
A expansão dessa linhagem foi atribuída a mutações adaptativas na posição 226 do gene que codifica a glicoproteína E1 (com a substituição do aminoácido alanina por valina -E1-A226V) (TSETSARKIN et al., 2007; LO PRESTI et al., 2016) que forneceu vantagem de condicionamento físico ao *Aedes albopictus* sem reduzir o condicionamento físico do *Ae. aegypti*, permitindo uma rápida diversificação da linhagem (SAHADEO et al., 2015). Alguns estudos sugerem que esta linhagem pode ser mais virulenta, uma vez que foram observadas manifestações clínicas atípicas como envolvimento neurológico, doença em neonatos e óbitos durante uma epidemia nas Ilhas da Reunião, localizada no Oceano Índico (BORGHERINI et al., 2007; ECONOMOPOULOU et al., 2009).

Em 2013, o genótipo Asiático do CHIKV foi detectado na região do Caribe e espalhou-se por 38 países da América (NUNES et al., 2013). No Brasil, além do genótipo Asiático

detectado no Amapá e provavelmente importado da Guiana Francesa, também foi evidenciada a circulação do genótipo ECSA na Bahia e Rio de Janeiro, proveniente provavelmente de Angola onde este genótipo já era endêmico (VEGA-RUA et al., 2014). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, identificou-se duas substituições de aminoácidos: uma na posição 211 de uma lisina (K) por uma Treonina (T) (K211T); e a outra na posição 156 de uma valina (V) por uma Alanina (A) (V156A) (Souza et al., 2017). Todavia, a mutação E1-A226V não foi detectada nas cepas circulantes no Brasil (DA COSTA et al., 2017). No Ceará, o genótipo ECSA foi identificado como circulando desde 2016 e sendo responsável pela epidemia em 2017, contudo, não foi evidenciada nenhuma mutação (LIMA STS, SOUZA WM, CAVALCANTE JW, et al., 2020).

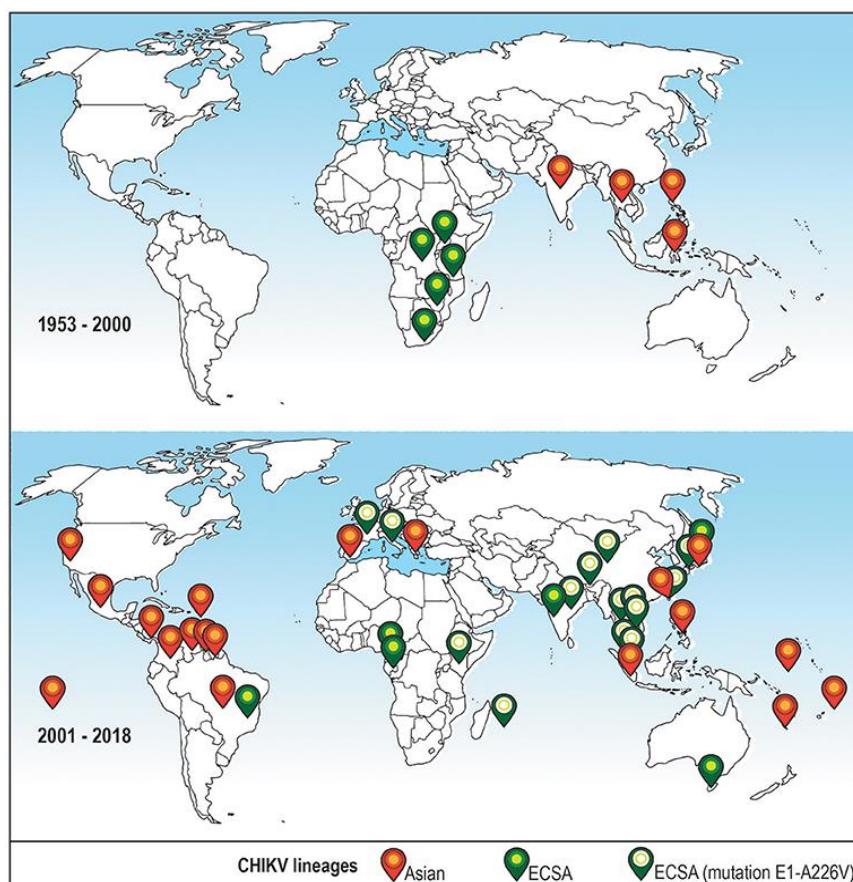
Deste modo, o Brasil apresenta-se num contexto diferenciado na epidemia do CHIKV nas Américas, com a cocirculação de cepas virais de dois genótipos distintos. Além disso, a dispersão do genótipo ECSA no Brasil cria um ambiente propício para a ocorrência de surtos similares aos observados nas ilhas do Oceano Índico, devido a presença do *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, no país (VEGA-RUA et al., 2014) (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Mapa da propagação histórica do CHIKV para a Ásia, Europa e Américas a partir do ciclo enzoótico na África.



Fonte: TSETSARKIN *et al.*, 2016 - Adaptado.

Figura 7- Distribuição geográfica das linhagens do CHIKV associadas aos surtos de 1953-2000 e 2001-2018.



Fonte: Tanabe, 2018

1.5 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O CHIKV é um membro da família *Togaviridae* pertencente ao gênero *Alphavirus* (SCHUFFENECKER et al., 2006, VOLK et al., 2010).

Um total de 29 espécies de arbovírus pertencentes a este gênero são classificados em 7 complexos antigênicos distintos denominados como *Barmah Forest*, *Eastern Equine Encephalitis*, *Middelburg*, *Ndumu*, *Semliki Forest*, *Venezuelan Equine Encephalitis* e *Western Equine Encephalitis*. O CHIKV pertence ao complexo *Semliki Forest*, que envolve também outros patógenos causadores de febre, exantema e artralgia de importância médica, tais como os vírus O'nyong nyong (ONNV), Mayaro (MAYV) e Ross River (RRV) (SOLIGNAT et al., 2009).

O CHIKV é esférico, pequeno e envelopado, sendo composto por um capsídeo de simetria icosaédrica envolvido por um envelope lipídico que mede aproximadamente 60-70 nm de diâmetro em pH neutro, sendo sensível a dessecação e a temperaturas acima de 58^o C

(STRAUSS; STRAUSS, 1994; KHAN et al., 2002, SOLIGNAT et al., 2009, LUM & NG, 2015).

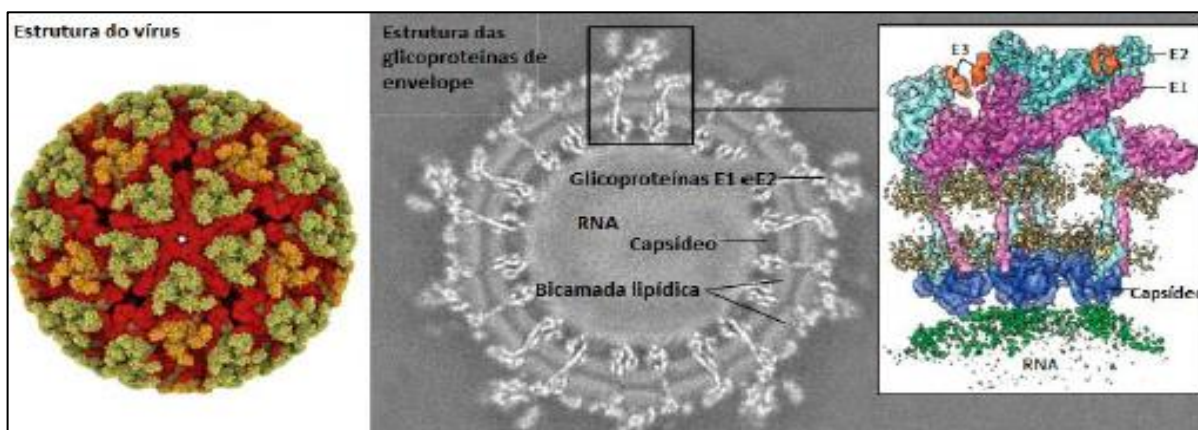
Na superfície do envelope lipídico localizam-se as glicoproteínas virais E1 e E2, as quais se associam em heterodímeros, formando 80 trímeros, além da presença na periferia da glicoproteína E3 (UCHIME et al., 2013). O nucleocapsídeo é constituído de uma proteína C do capsídeo viral e de uma molécula de RNA (STRAUSS; STRAUSS, 1986) (Figura.8).

O genoma linear, de sentido positivo, de cadeia simples, possui aproximadamente 11,8 kb de comprimento, sendo composto por uma molécula de RNA, de fita simples, polaridade positiva que possui dois sentidos de leitura aberta, um na extremidade inicial e outro na cauda, respectivamente cap 5' e poly-A 3'. A primeira leitura compreende cerca de dois terços do genoma e codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) que participam da replicação, nivelamento do RNA, clivagem poliprotéica, transcrição e outras funções de replicação viral.

A segunda leitura corresponde a uma proteína que será clivada em cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1), que participam do processo de fusão e interagem com receptores celulares (STRAUSS; STRAUSS, 1986; WEAVER et al., 2012). Portanto, o genoma do CHIKV está organizado em: 5' cap_nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-26S (região de junção) -C-E3-E2-6k-E1_poli (A) -3' (SOLIGNAT et al., 2009) (Figura 9).

As proteínas estruturais têm suas funções distribuídas do seguinte modo: C funciona como autoprotease (HARDY et al., 1990), E3 protege a superfície viral do pH durante o processo de fusão, E2 e E1 responsáveis pelo reconhecimento do receptor e a entrada do vírus nas células alvo pela fusão de membrana (UCHIME et al., 2013) e 6K é rica em cisteína e possui potencial hidrofóbico (GAEDIGK-NITSCHKO; SCHLESINGER, 1990).

Figura 8 – Representação da estrutura do CHIKV



Fonte: Weaver e Lecuit, 2015 – (Adaptado).

Figura 9 – Organização do genoma do vírus Chikungunya e suas proteínas Não Estruturais e Estruturais



Fonte: Weaver e Lecuit, 2015 – (Adaptado).

1.6 REPLICAÇÃO VIRAL

Ainda que os eventos gerais da replicação do CHIKV sejam comparáveis aos de outros alfavírus há bastante a descobrir sobre a biologia específica da replicação deste vírus (SILVA e DERMODY, 2017).

O CHIKV exibe amplo tropismo, replicando-se em muitas células de vertebrados e invertebrados. Os glicosaminoglicanos, que são expressos em muitos tipos de células suscetíveis, parecem servir como fatores de ligação para aumentar a infectividade (SILVA e DERMODY, 2017).

A replicação do genoma viral ocorre após a ligação mediada por E2 às células. As partículas ligadas ao receptor são internalizadas principalmente por endocitose mediada por clatrina. O ambiente endossomal que apresenta pH ácido, desencadeia um rearranjo conformacional das glicoproteínas E1 e E2 que recobrem a superfície do vírion (BRÉHIN et al., 2003, WEAVER et al., 2012). Em seguida, E1 expõe um peptídeo hidrofóbico que se insere na membrana endossomal, estimulando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (GAROFF et al., 2004; KIELIAN et al., 2010, LI et al., 2010). Após esta etapa, o nucleocapsídeo se desintegra liberando o genoma, que se ligará aos ribossomos como RNAm, dando início ao processo de tradução da poliproteína p1234, precursora das proteínas não estruturais (JOSE et al., 2009; LEUNG et al., 2011).

A transcrição do RNA⁺ e do RNA⁻ é regulada pelo processamento da poliproteína não estrutural p1234. No início da infecção a p1234 é clivada em nsP4 e p123. A nsP4 junto com a p123 funciona como replicase para formação de RNA negativo. Durante a replicação, quando a concentração de p23 está elevada, esse precursor é processado em nsP1 e p23 originando um complexo de polimerase que regula a síntese de RNA genômico positivos e negativos. Em seguida, a p23 é processada em nsP2 e nsP3 resultando em um complexo da polimerase que

produz apenas moléculas de RNA genômico positivas usando a fita negativa como molde. O RNAm serve como molde para tradução da poliproteína precursora C-pE2-6k-E1 das proteínas estruturais. A nsP2 cliva essa proteína em proteína de capsídeo C. A poliproteína pE2-6k-E1 é inserida a membrana do retículo endoplasmático e é processada em pE2 e E1 e chegam ao complexo de Golgi onde são glicosiladas e transportadas para a membrana plasmática. Antes de chegar a superfície da célula, a pE2 é clivada em E2 e E3. Os capsídeos e o RNA⁺, formados no citoplasma, migram para a membrana plasmática. A montagem do vírus ocorre pela ligação eletrostática do nucleocapsídeo ao RNA próximo a membrana citoplasmática. A partícula viral sai da célula por brotamento pela membrana citoplasmática adquirindo o envelope lipoproteico (GAROFF et al., 2004; JOSE et al., 2009; RUPP et al., 2015).

1.7 PATOGÊNESE

A patogênese da infecção por CHIKV em humanos não está plenamente definida, porém as recentes epidemias têm ajudado a fornecer informações sobre células e organismos envolvidos na replicação viral (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

Durante o repasto sanguíneo do mosquito infectado, o CHIKV é inoculado na pele do hospedeiro susceptível juntamente com a saliva deste vetor que contém uma série de moléculas com propriedades anti-hemostáticas e imunomoduladoras, o que induz a uma infiltração celular precoce e o aumento de citocinas. Em seguida, ocorre uma fase de intensa reprodução viral atingindo primariamente os capilares subcutâneos, infectando e replicando em células susceptíveis na pele: macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (SOURISSEAU et al. 2007, WIKAN et al., 2012, LUM et al, 2015). Isso efetiva a primeira fase de replicação viral e aciona no organismo do hospedeiro uma resposta imunológica inicial para conter o vírus na pele (LUM; NG, 2015; SCHILT et al., 2010).

Apesar da resposta imune, o vírus é transportado rapidamente a um órgão linfóide secundário onde o vírus infecta e se multiplica em novas células (RYMAN; KLIMSTRA, 2008). Neste momento, diversas citocinas são produzidas, em especial o Interferon (IFN), visando limitar a propagação do vírus (TENG et al., 2011; LUM; NG, 2015). Uma vez infectadas, estas células atingem a circulação sanguínea e se propagam para diferentes tecidos, atingindo os principais órgãos-alvo como fígado, músculos, articulações e cérebro. Nestes tecidos, a infecção é associada a uma marcada infiltração de células mononucleares (GALLAN-HUERTA et al. 2015). A inoculação direta do vírus na circulação também pode ocorrer através de picadas de mosquito. (SOURISSEAU et al., 2007) (Figura 10).

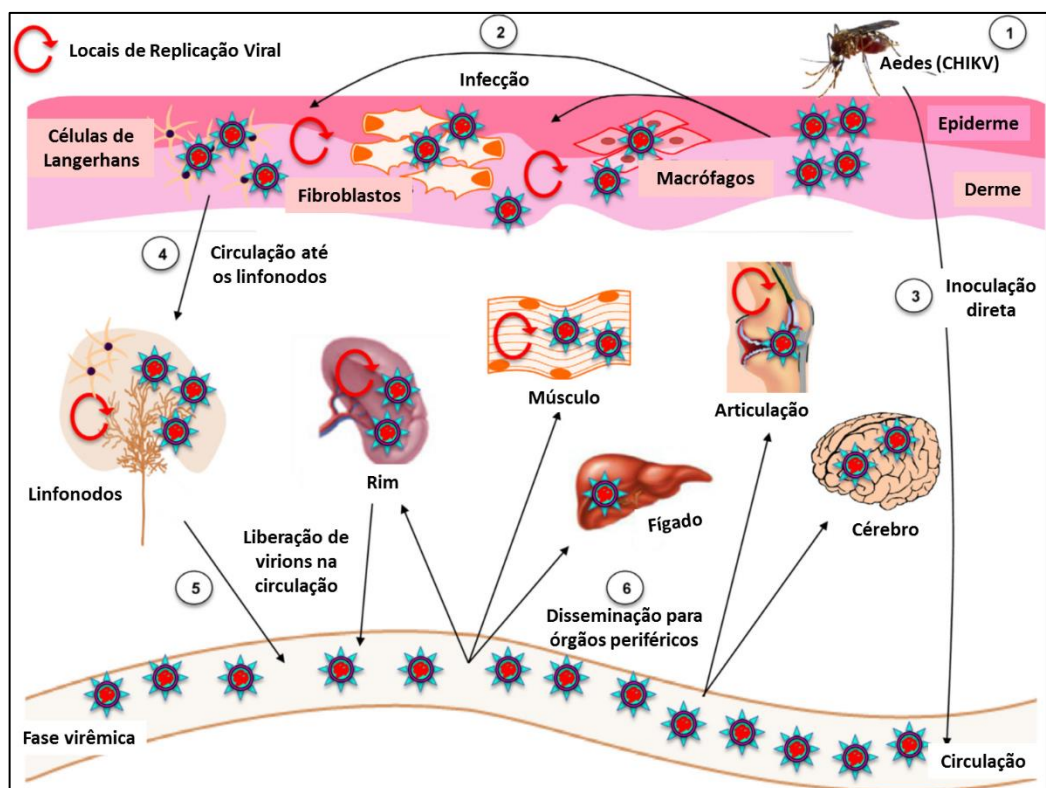
A identificação de tipos de células suscetíveis é de grande importância para a compreensão da patogênese da infecção pelo CHIKV (LUM; NG, 2015).

Há relatos de replicação ativa do vírus em vários órgãos e tecidos como pele, cérebro, fígado, músculo, gânglios linfáticos, baço e tecidos conjuntivos das articulações e de que este vírus possui tropismo por fibroblastos da pele, o que pode facilitar a infecção de novos mosquitos durante o repasto sanguíneo (LUM; NG, 2015).

Infecção persistente também foi detectada nas articulações, músculos e macrófagos esplênicos, bem como em células em endoteliais que revestem os sinusóides do fígado (LUM; NG, 2015).

Foi demonstrado que a apoptose aumenta a propagação do vírus de células infectadas para células vizinhas não infectadas e que o vírus também tem habilidade de esconder-se em bolhas apoptóticas como uma estratégia de evasão a resposta imune (anticorpos extracelulares). Posteriormente, a autofagia foi relatada como sendo induzida durante a infecção ativa, aumentando ainda mais a replicação viral. (LUM; NG, 2015).

Figura 10 - Mecanismo de infecção por CHIKV.



Fonte: (Adaptado de LUM; NG, 2015)

1.8 RESPOSTA IMUNE

Estudos mostram que indivíduos desde que não tenham sido previamente expostos ao CHIKV estão sob o mesmo risco de infecção e de desenvolver a doença (PETITDEMANGE et al., 2015). CHIKV apresenta um único sorotipo e, acredita-se que, uma vez exposto ao vírus, indivíduos desenvolverão uma imunidade duradoura que os protegerá contra uma nova infecção (SAHADEO et al., 2015).

Em geral, a resposta imune inata contra vírus consiste em macrófagos, células dendríticas (DCs) e células Natural Killer (NKs) e é seguida pela ativação do sistema adaptativo mediado por linfócitos B e T. A geração subsequente de células de memória leva a uma resposta específica à infecção viral e protege da reinfeção (TANABE et al., 2018). A primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção por patógenos é a resposta imune inata. Dado que o sistema imunológico adaptativo requer mais tempo para desenvolver sua resposta. Sendo assim, a resposta inata seria crucial na defesa contra infecções por CHIKV (LUM; NG, 2015).

O resultado das infecções virais é determinado por uma série de interações complexas entre o patógeno e o sistema imunológico do hospedeiro. Os mecanismos que normalmente protegem os indivíduos das infecções também são capazes de provocar lesão tecidual e doenças em algumas situações (ABBAS et al., 2012). Assim como muitos outros patógenos, o CHIKV evoluiu para escapar das respostas imunes celulares utilizando-se de caminhos estratégicos antivirais (PETITDEMANGE, WAUQUIER e VIEILLARD, 2015). Um exemplo disso é a proteína nsP2 do CHIKV, que tem a capacidade de desligar o sinal IFN do tipo I levando a uma diminuição da expressão de mediadores antivirais (AKHRYMUK et al., 2012; FROS et al., 2010).

As células Natural Killer (NK) incluem-se na primeira linha de defesa contra uma variedade de infecções virais tendo a habilidade de detectar e lisar células-alvo infectadas por vírus, poupando as normais. Evidências mostram a importância desses primeiros respondedores no controle da infecção pelo CHIKV. No decorrer da infecção, as células NK são poupadas da linfopenia profunda e exibem um perfil ativado (PETITDEMANGE, WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

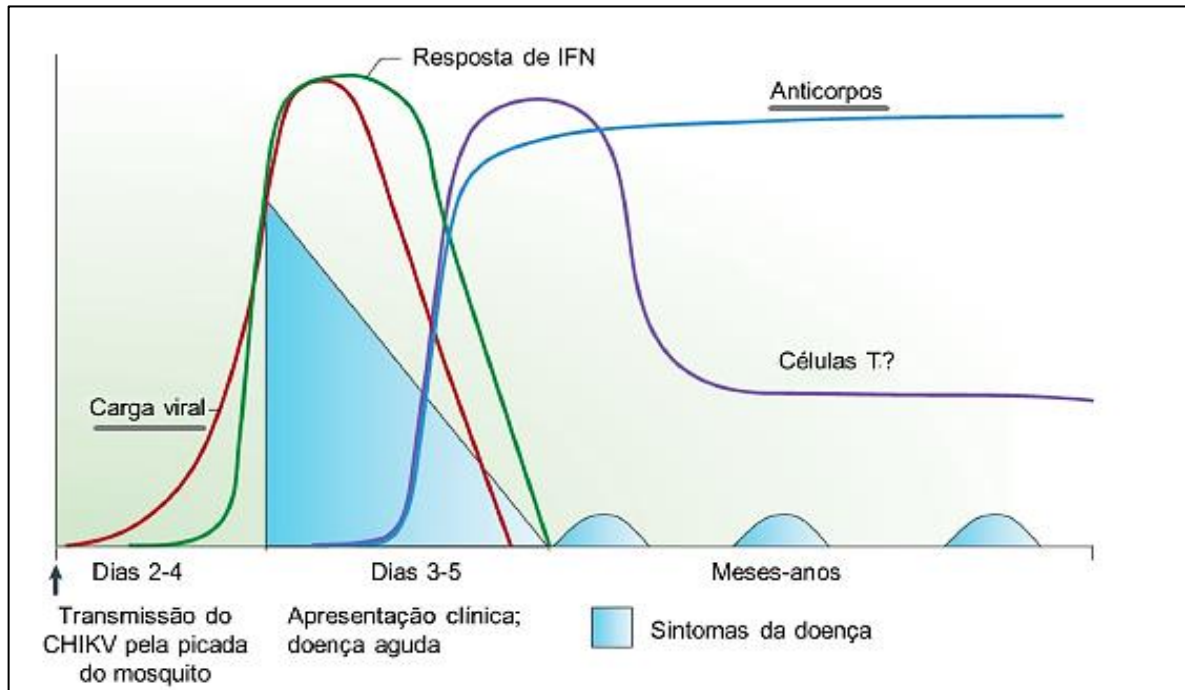
Foi demonstrado que os interferons, as citocinas e quimiocinas têm papel primordial no sistema de defesa durante infecção por CHIKV e apresentam índices elevados durante os primeiros quatro dias de infecção (PETITDEMANGE, WAUQUIER e, VIEILLARD, 2015 et al., 2015).

Enquanto a imunidade inata desempenha um papel na fase mais inicial do CHIKV, a imunidade adaptativa chega um pouco mais tarde, porém ainda no estágio inicial da doença, e com prolongadas respostas de memória específicas para vírus (MCCANCE E HUETHER, 2014).

A ativação e proliferação de células TCD8 + dominam os estágios iniciais, envolvendo citocinas antivirais e uma forte resposta inflamatória, com células TCD4 + aparecendo posteriormente para auxiliar na produção de resposta humoral específica do CHIKV, juntamente com a produção de proteínas antiinflamatórias com aumento de IFN- γ , IL-7 e IL-12 (WAUQUIER et al., 2011). O número de células T ativadas e efetoras circulantes está aumentado em pacientes com artrite induzida por chikungunya. Estudos demonstram que as células T desempenham um papel importante na patogênese da artrite induzida por chikungunya. (BURT et al. 2017).

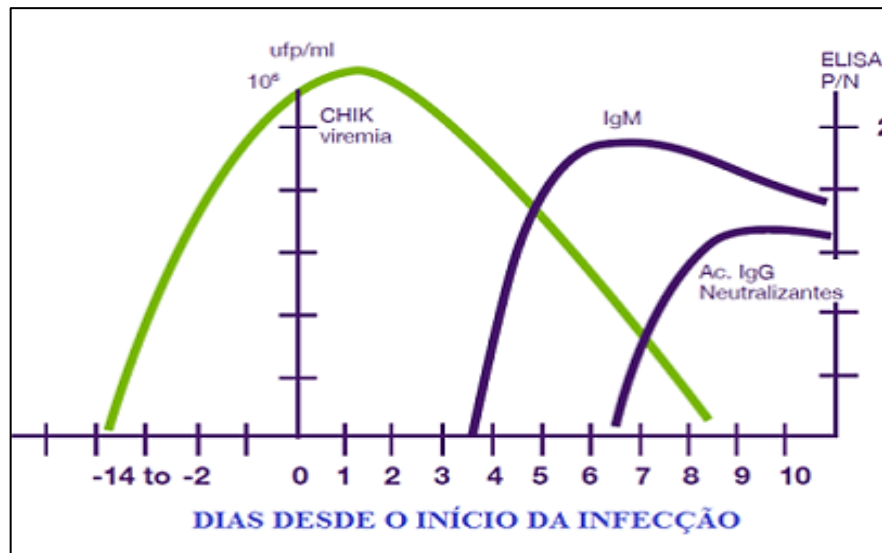
Anticorpos anti CHIKV IgM e IgG têm sido detectados nos pacientes em diferentes estágios da infecção. Geralmente, a IgM é detectável 5-7 dias após o início dos sintomas, sendo este o período mais indicado para essa investigação sorológica. Contudo, estudos mostram que a IgM pode persistir por semanas até meses após o início dos sintomas (SCHWARTS; ALBERT, 2010; WEAVER e LECUIT, 2015; PETITDEMANGE, 2015; GRIVARD et al., 2007). IgG específica para CHIKV aparece logo após, sendo considerada por alguns estudos a partir do 6^o dia e por outros entre 7- 10 dias após a infecção, persistindo com altos títulos por anos (SILVA e DERMODY, 2017). Através de uma rápida e forte soroconversão a infecção por CHIK parece provocar imunidade protetora duradoura. Os anticorpos anti CHIKV são capazes de fornecer precocemente proteção e controle da disseminação do vírus através de neutralização direta e ativação do complemento (KAM *et al.*, 2009; GASQUE et al. 2015; PETITDEMANGE, 2015; BRASIL,2017). Os anticorpos são importantes para a depuração da infecção viral. (BURT et al. 2017). (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Esquema da Resposta Imune ao CHIKV



Fonte: Adaptado de Schwartz & Albert et al., 2010.

Figura 12 - Viremia e resposta imune seguida a infecção por vírus Chikungunya



Fonte: Disease Control and Prevention/CDC e Organização Pan-Americana da Saúde.

1.9 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção pelo CHIKV foi considerada até recentemente como causadora de uma doença benigna. Apesar disso, numerosos relatos contradizem a natureza branda da doença (RAJAPAKSE et al., 2010) e por isso merece ser estudada com atenção (SAM et al., 2015).

Após o período de incubação, o hospedeiro virêmico inicia um quadro clínico agudo, que pode evoluir para uma fase pós-aguda e/ou crônica da doença (BRASIL /MS, 2017; RODRÍGUEZ-MORALES; ANAYA, 2016).

A sintomatologia relatada na fase aguda, que pode durar até 14 dias, varia desde um início súbito de febre até uma febre alta ($>39^{\circ}\text{C}$), podendo esta ser contínua, intermitente ou bifásica e de curta duração. Presença ou não de cefaleia, mal-estar, erupções cutâneas, exantema (macular ou maculopapular) com ou sem prurido do segundo ao quinto dia após o início da febre; mialgias, artralgias e/ou poliartralgias (afetando principalmente as articulações distais de forma simétrica, como os joelhos, tornozelos, mãos e pulsos), sendo este mais comumente relatado, por ser duradouro (GUBLER, 2001; CARMONA et al., 2008; QUEYRIAUX, 2008b; CLETON et al., 2012; SUHRBIER et al., 2012; ZE-ZE, 2014), edema normalmente associado à tenossinovite ou dor ligamentar, fadiga e mialgia leve ou moderada. (BANDYOPADHYAY & GHOSH, 2008, ALI OU ALLA & COMBE, 2011, KUCHARZ & CEBULA-BYRSKA, 2012, BRASIL, 2017).

As manifestações articulares podem resultar na incapacidade de realização das atividades diárias, redução da qualidade de vida, astenia, depressão e ansiedade, sendo menos relatados ou menos frequentes em crianças (QUEYRIAUX et al., 2008, COUTURIER et al., 2012, SAM et al., 2015; BANDYOPADHYAY & GHOSH, 2008; ALI OU ALLA & COMBE, 2011; KUCHARZ & CEBULA-BYRSKA, 2012; BRASIL, 2014). Outras manifestações cutâneas também têm sido relatadas como dermatite esfoliativa, lesões vesicobolhosas, hiperpigmentação, fotossensibilidade, eritema nodoso e úlceras orais. Em recém-nascidos (RNs) e lactentes, as lesões vesicobolhosas são as manifestações dermatológicas mais frequentes (MS, SVS. 2017; PAHO/CDC. 2011).

Para os neonatos de mães infectadas há um risco de transmissão vertical de aproximadamente 50% no período intraparto. O recém-nascido é assintomático nos primeiros dias, com surgimento de sintomas a partir do quarto dia (três a sete dias), que incluem a presença de febre, síndrome algica, recusa da mamada, exantemas, descamação, hiperpigmentação cutânea e edema de extremidades (BRASIL, 2017).

Além disso, alguns indivíduos podem apresentar-se assintomáticos, podendo contribuir para infecção de novos mosquitos (BROUA RD et al., 2008; NAKKHARA et al., 2008; SISSOKO et al., 2008). Formas graves da infecção aguda têm sido observadas em diferentes grupos etários, não somente em pacientes idosos. Essas formas envolvem sistema nervoso central, respiratório e urinário. Ocasionalmente, a descompensação de doença crônica pré-existente, particularmente cardiovascular, respiratória, renal e doença autoimune podem ocorrer (RENAULT et al. 2007).

A fase pós-aguda se inicia a partir do décimo quarto dia de doença, podendo perdurar até 3 meses. Esta fase caracteriza-se, na maioria dos casos, pelo desaparecimento da febre e persistência da poliartralgia, que é geralmente acompanhada de edema de intensidade variável e tenossinovite hipertrófica subaguda em punhos e tornozelos (BRASIL, 2017). Muitos pacientes apresentam uma melhora clínica e logo após apresentam recaída (CUNHA E TRINTA, 2017). Além disso, é nesta fase que os sintomas depressivos costumam aparecer, pois, diante das dores incapacitantes, o paciente fica impossibilitado de realizar as suas atividades diárias e isto atinge gravemente o seu estado emocional, ocasionando em depressão e ansiedade (SCHILTE et al., 2013). Podem estar presentes também, nesta fase, astenia, recorrência do prurido generalizado e exantema maculopapular, além do surgimento de lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas. Alguns pacientes podem desenvolver doença vascular periférica e fadiga (BRASIL, 2017).

A persistência dos sintomas por um período maior que 3 meses caracteriza a fase crônica da doença que é marcada pela presença de artralgia intensa, acompanhada ou não por inchaço e limitação do movimento, que pode persistir por meses ou anos, variando entre períodos assintomáticos e de recidivas, o que geralmente é mais comum em indivíduos que possuem outras comorbidades, em imunodeprimidos e em idosos (SUHRBIER et al., 2012). Estima-se que isto ocorra em virtude persistência viral, especialmente nos macrófagos, em articulações atingidas, e pelo grande número de células inflamatórias que migram para o tecido sinovial afetado (HOARAU et al., 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013).

Limitação de movimento e deformidade, fadiga, cefaleia, prurido, alopecia, exantema, bursite, tenossinovite, disestesia, parestesia, dor neuropática, fenômeno de Raynaud, alterações cerebelares, distúrbios do sono, alterações da memória, déficit de atenção, alterações do humor, turvação visual e depressão também são relatados nesta fase da doença (QUEYRIAUX, 2008; STAPLES et al., 2009; SCHILTE et al., 2013).

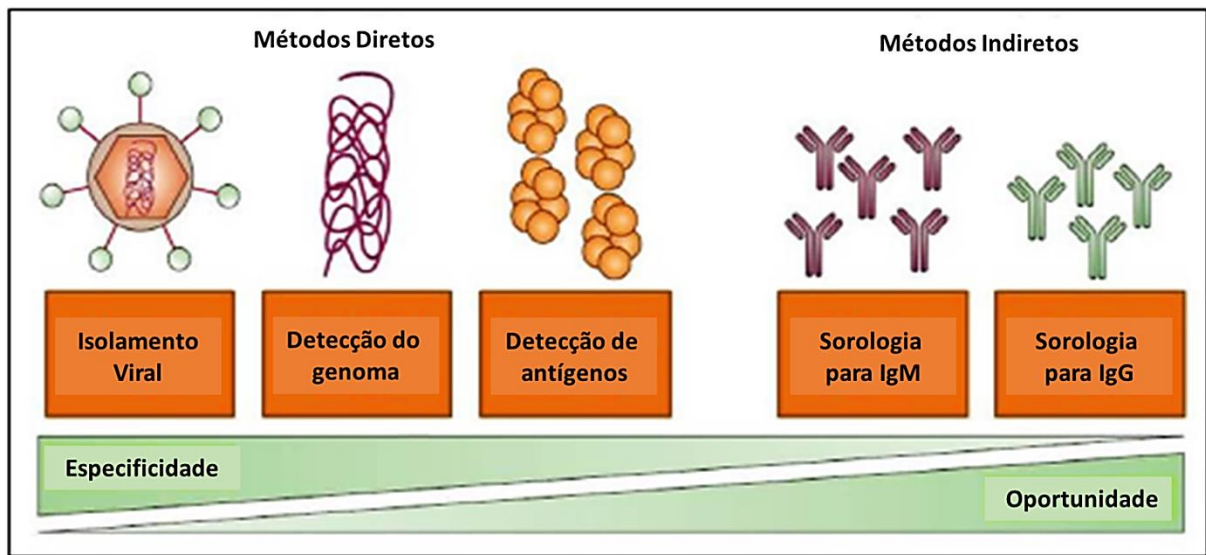
Em alguns casos da doença são relatadas manifestações atípicas, que podem ser: neurológicas, acometendo SNC de modo grave com meningite, encefalite, mielite, paralisia, ataxia, convulsões, síndrome de Guillain-Barré, distúrbios comportamentais, dentre outros (ARPINO et al., 2009; CHANDAK et al., 2009; ZACKS; PAESSLER, 2010; RUST, 2012; ZEZE, 2014; BALE, 2015), cardíacas (miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia e instabilidade hemodinâmica), renais (nefrite e insuficiência renal aguda), dérmicas (hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas e ulcerações aftosas) e oculares (neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte). Acredita-se que essas manifestações ocorram devido a uma resposta incomum do hospedeiro para o vírus ou devido a variantes mutantes de CHIKV ainda desconhecidas (RAJAPAKSE et al., 2010). Tais condições podem ser fatais em recém-nascidos e idosos portadores de comorbidades (MAHENDRADAS et al., 2008, RAJAPAKSE et al., 2010, SAM et al., 2015).

1.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Em regiões onde cocirculam arbovírus diferentes, mas com sinais e sintomas semelhantes, o diagnóstico específico é importante, especialmente nos casos onde a conduta terapêutica deve ser diferenciada (BRASIL, 2017).

O diagnóstico laboratorial das arboviroses pode ser realizado através de métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos ou virológicos são baseados na detecção do vírus, do RNA viral e do antígeno viral. Já os métodos indiretos ou sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos específicos IgM ou IgG (POWERS, 2010; DASH, M., 2011). Entretanto, a escolha para a realização de testes específicos depende basicamente do tempo entre o início dos sintomas e data da coleta, tipo e qualidade da amostra e disponibilidade de insumos (STORCH, 2007). (Figura 13).

Figura 13 - Métodos de identificação laboratorial utilizados no diagnóstico das arboviroses.



Fonte: PEELING et al., 2010 – Adaptado.

O diagnóstico virológico utiliza-se de alguns métodos para detecção da infecção viral, sendo de grande importância para a saúde pública, pois além de elucidar o diagnóstico de pacientes, colabora com a vigilância e o monitoramento das arboviroses nas diferentes regiões do país (STORCH, 2007). Como método direto de diagnóstico temos, o isolamento viral, a detecção do RNA viral utilizando mais comumente a reação da transcriptase reversa seguida de reação de polimerase em cadeia (RT-PCR), que pode ser convencional (qualitativa) ou em tempo real, também conhecida como qRT-PCR (quantitativa) e a detecção do antígeno viral, através da imunohistoquímica ou detecção da proteína não estrutural (NS1- DENV), que tem sua performance, na fase aguda da doença, comparável as técnicas de isolamento viral e detecção do RNA viral (PEELING et al., 2010; BURT et al., 2012; BRASIL, 2017).

Já o diagnóstico por método indireto conta com a detecção da resposta imune à infecção viral, realizado através da dosagem de imunoglobulinas. Como exemplo temos as técnicas neutralização por redução de placas (PRNT), imunofluorescência indireta (IFI), teste imunocromatográfico do tipo *Point-of-Care* (POC) e Ensaio de Imunoadsorção Enzimática (ELISA), que permitem detectar e diferenciar os anticorpos de fase aguda da classe de imunoglobulinas M (IgM) e de fase crônica da classe de imunoglobulinas G (IgG) (MARTIN et al., 2000; BURT et al., 2012; PRAT et al., 2014; BRASIL, 2017).

No diagnóstico do CHIKV a RT-PCR destaca-se como importante ferramenta diagnóstica diferencial por sua excelente sensibilidade e especificidade, sendo capaz de detectar o genoma viral nos primeiros dias da infecção, até aproximadamente o 8^o dia após o

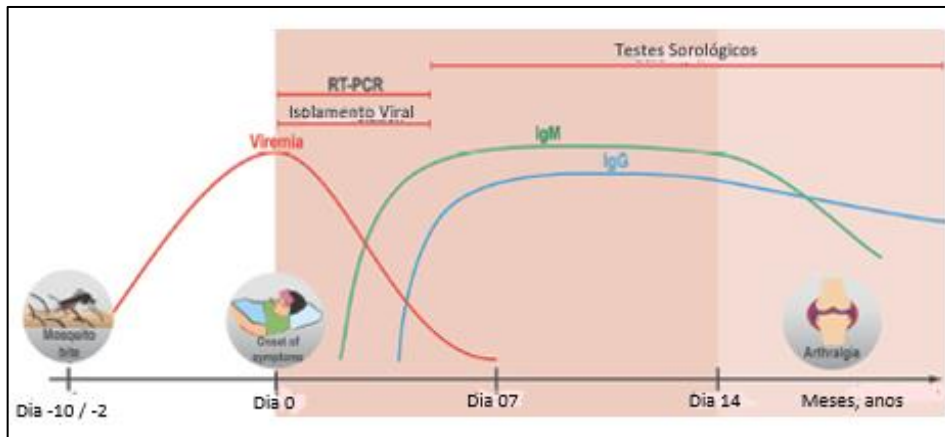
aparecimento dos sintomas, sendo que o período de maior viremia vai do 1^o ao 5^o dia da infecção, onde a carga viral pode alcançar 10^8 partículas virais por ml de sangue (PEELING et al., 2010; BURT et al., 2012; BRASIL, 2017). Porém apresenta algumas desvantagens como o alto custo dos reagentes e a possibilidade de contaminações (KUCHARZ, CEBULA-BYRSKA, 2012; BRASIL/MS, 2014).

As amostras coletadas durante a primeira semana após o início dos sintomas devem ser investigadas por testes sorológicos. O período mais indicado para essa investigação é a partir do 5^o dia de sintomas. Já os anticorpos IgG costumam ser detectados a partir do 6^o dia, sendo mais frequentes a partir do 8^o dia (MARTIN et al., 2000; BURT et al., 2012; PRAT et al., 2014; BRASIL, 2017). Uma estratégia para confirmação laboratorial é a sorologia pareada. Neste caso, duas amostras devem ser coletadas, a primeira na fase aguda da doença e a segunda, aproximadamente, 15 dias após a primeira. O aumento de 4 vezes no título dos anticorpos demonstra a reatividade específica (BRASIL, 2017).

Os imunoenaios são bastante utilizados na rotina laboratorial, pois apresentam baixo custo e facilidade de execução e manuseio, contudo, merecem atenção por causa da possibilidade da reatividade cruzada entre os arbovírus, como também a possível ocorrência de resultados falso-negativos nos primeiros dias de infecção. Este fato é importante, principalmente porque os sintomas se assemelham em parte entre as arboviroses. (CASSEB et al., 2013; MORELI; COSTA, 2013). (Figuras 14 e 15).

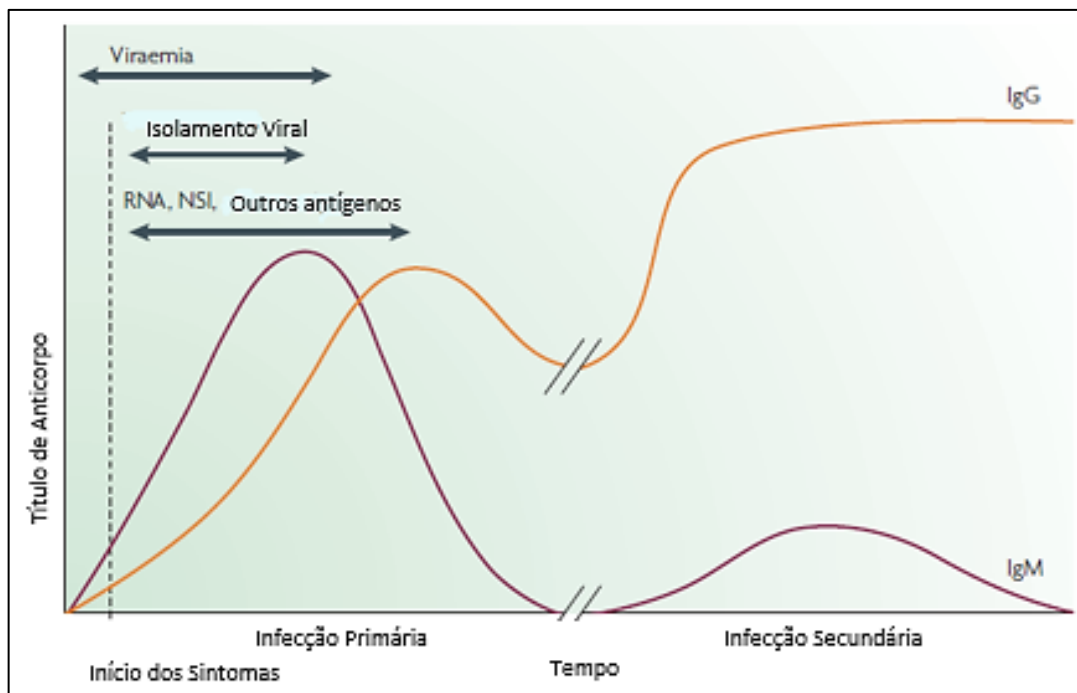
Independente da metodologia a ser utilizada para o diagnóstico, a coleta da amostra a ser testada (sangue, soro, líquido cérebro-espinhal e/ou líquido sinovial) deve ser realizada de forma correta para evitar contaminação ou perda do material genético. Além disso, o armazenamento correto é essencial, sendo de -70°C para os espécimes destinados às técnicas virológicas e -20°C para as amostras que serão utilizadas na sorologia (BRASIL, 2014).

Figura 14 – Aplicabilidade dos diferentes métodos no diagnóstico por CHIKV.



Fonte: Tanabe, 2018

Figura 15 – Aplicabilidade dos diferentes métodos no diagnóstico por DENV



Fonte: Peeling, 2010

1.11 COCIRCULAÇÃO DE ARBOVÍRUS

A sinergia epidemiológica entre surtos de vírus transmitidos por mosquitos *Aedes aegypti*, tais como DENV, CHIKV e ZIKV, resultou na coinfeção de humanos com múltiplos vírus. Apesar do potencial impacto na saúde pública, sabemos muito pouco sobre a ocorrência e consequências de tais coinfeções (VOGELS et al., 2019).

A descoberta marcante de que o ZIKV pode causar microcefalia e outras alterações congênitas durante a gravidez, os efeitos a médio e longo prazo induzidos por CHIKV como artrite e distúrbios cognitivos dentre outros, somados ao potencial do DENV para causar doença neurológica e hemorrágica grave tornam os resultados da coinfeção alarmantes (VOGELS et al., 2019).

A ocorrência de cocirculação entre arbovirus no mundo já foi relatada. Há evidências de uma ampla codistribuição e coinfeção entre os arbovírus como DENV e CHIKV (FURUYA-KANAMORI, L. et al., 2016).

A cocirculação dos três arbovírus DENV, CHIKV e ZIKV na Colômbia e diferentes regiões da América Latina também foi relatada. Para tanto, alguns estudos foram desenvolvidos para estabelecer a prevalência de cocirculação e coinfeção destas arboviroses nestas áreas (CARRILLO-HERNÁNDEZ et al., 2018) (Quadro 1).

Foi detectado pela primeira vez na Colômbia e na América Latina uma coinfeção entre DENV e CHIKV, e provavelmente, entre os primeiros relatos a nível global, também com ZIKV. Coinfeções múltiplas DENV, CHIKV e malária foram relatadas anteriormente (VILLAMIL-GÓMEZ.WE et al., 2016).

O Brasil, país endêmico para dengue, onde os 4 sorotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) cocirculam desde 2010, passou também por uma rápida disseminação da chikungunya a partir de 2014 e Zika, a partir de 2015, o que promoveu o estabelecimento da circulação simultânea dessas três arboviroses no país. Atualmente, DENV, CHIKV e ZIKV cocirculam em várias partes do país (SARDI et al., 2016; VIEIRA et al., 2015; SOUZA COSTA et al., 2018; SILVA et al., 2018b). A cocirculação de infecção por DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil dificulta o manejo clínico em razão de similaridades de sintomas e limitações na realização do diagnóstico diferencial.

O impacto da cocirculação desses vírus ainda é pouco conhecido, contudo, as implicações na transmissão em idosos, grávidas e crianças são conhecidas. Como no caso de reinfeção pelos diferentes sorotipos do DENV, a interação de arboviroses (DENV sorotipos 1-4, CHIKV e ZIKV) poderia teoricamente resultar em viremias mais intensas ou outras alterações imunológicas que, por sua vez, agiriam como gatilho para doenças autoimunes, como a síndrome de Guillain-Barré (DONALÍSIO et al., 2017).

No Ceará existe relato de cocirculação entre os sorotipos de dengue, onde em 2006, predominou o DENV-3, em 2008 o DENV-2, em 2011 o DENV-1 e nesse mesmo ano foi introduzido o DENV-4. Em todos os anos citados, houve cocirculação de pelo menos dois diferentes sorotipos virais (OLIVEIRA, ARAUJO e CAVALCANTI, 2018).

Quadro 1 - Características dos estudos que investigaram CHIKV, DENV e ZIKV

Local do Estudo	Período Investigado	Tipo de Estudo	Critério inclusão / suspeita	N amostral. Confirmado/ Suspeitos	Arbovírus. Pesquisados			Codeteccções (sorol)		Coinfecções (rt-PCR)			Testes Laboratoriais	Autores-Ano Publicação
					C	D	Z	%	Típos	%				
Brasil (BA)	2014/16	P-Coorte	P. febril	247/948				NI			2,4		RT-PCR ELISA (IgM e IgG)	Silva et al,2019
Colombia	2015/16	P-Coorte	P. febril /Z	23.879				NA			0,14		RT-PCR	Mercado-Reyes et al, 2018
India	2011	P-Coorte	P. febril/ D-C	87			-	NI			10		RT-PCR, NS1, ELISA (IgM e IgG)	Afreen et al, 2014
Brasil (RJ)	2015/16	P-Coorte	P. febril/ D	30				NI			3,3		RT-PCR e ELISA (IgM DENV)	Cabral-Castro et al, 2016
Nicarágua	2015/16	P-Coorte	P. febril	263/346				NA			20		PCR Multiplex (ZDC)	Waggoner et al, 2016
Colombia / Venezuela	2015/16	P-Coorte	P. febril	157				NA			21,1		PCR e RT_PCR	Carrilo-Hernández et al,2018
Tailândia	2016	P-Coorte	P. febril	163/182				NI			3,89		PCR, RT-PCR ELISA (IgM e IgG)	Suwanmanee et al, 2018
Brasil (PE)	2015	P-Coorte	P. febril	77				NI			2,6		RT-PCR, ELISA (IgM, IgG)	Pessoa et al,2016
India	2014/15	P-Coorte	P. febril	326			-	NI			23		RT-PCR, NS1, ELISA (IgM e IgG)	Mukherjee et al, 2017
Laos (Ásia)	2013	P-Coorte	P. hospít.	40			-	NA			17,5		RT-PCR	Phommanivong et al,2016
Gabão (África)	2007/10	P-Coorte	P. febril	4287			-	NA			0,9		RT-PCR	Caron et al, 2012
India	2015/16	P-Coorte	P. febril	648			-	NA			2,8		RT-PCR	Tanuja Saswat et al, 2019
México	2015/16	P-Coorte	P. febril /Z	NI				NA			NI		RT-PCR, NS1, PNRT, ELISA	Beltrán-Silva et al, 2016
França	2015/16	P-Coorte	P. febril /C	1502			-	NA			1,06		RT-PCR, ELISA IgM e IgG	Omarjee et al, 2014
Brasil (PE)	2015/16	P-Coorte	P. febril	263				NI			0,8		RT-PCR, ELISA IgM, PNRT	Magalhães et al, 2017

Fonte: Elaboração da autora.

CHIKV DENV ZIKV *Flavivírus* Sorotipos DENV, P= Prospectivo; PF Paciente Febril; P hosp.= Paciente hospitalizado; NI = Não Informado NA = Não Avaliado.

2. JUSTIFICATIVA

A circulação simultânea dos quatro sorotipos de DENV (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), ZIKV e CHIKV tornou-se um desafio não apenas para o diagnóstico e a assistência terapêutica aos pacientes, mas para vigilância epidemiológica. O impacto da cocirculação desses vírus ainda é pouco conhecido e, apesar do prévio conhecimento da implicação em idosos, grávidas e crianças, ainda é necessário desenvolver mais estudos em locais onde os mesmos circulam simultaneamente, como no estado do Ceará.

A coinfeção por arboviroses tem sido relatada e seu efeito sobre a gravidade da doença também precisa ser melhor investigado. Ainda que o manejo terapêutico da dengue no Brasil esteja bem fundamentado, o diagnóstico específico das infecções por arbovírus é particularmente difícil em áreas endêmicas de dengue, ou ainda em áreas onde outros arbovírus cocirculam. A similaridade entre a sintomatologia e o compartilhamento do vetor tornam o diagnóstico baseado em evidências clínicas e epidemiológicas pouco preciso, sendo necessário lançar mão de ferramentas mais objetivas, como um diagnóstico laboratorial mais integrativo na confirmação do seu agente etiológico.

Com a circulação endêmica de três arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, a chamada epidemia tríplice, um novo cenário epidemiológico estabeleceu-se no estado do Ceará em 2017. Assim, a confirmação laboratorial por meio de testes imunológicos e moleculares é fundamental para o diagnóstico diferencial e específico desses arbovírus.

Desta forma, surgiu a necessidade de investigar, retrospectivamente, na epidemia de chikungunya no Ceará em 2017, possíveis padrões de codetecções e/ou coinfeções entre CHIKV, DENV e ZIKV, no intuito de fornecer subsídios para o desenvolvimento de ações mais específicas em saúde pública, corroborando para a notificação de casos confirmados com diagnóstico laboratorial, aprimorando medidas de vigilância no tocante ao monitoramento de sinais precoces de epidemias por arbovírus e visando um planejamento mais direcionado para a tomada racional de ações.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar uma investigação soropidemiológica da epidemia causada por Chikungunya no estado do Ceará em 2017, buscando casos de codeteção e/ou coinfeção com Dengue e Zika em pacientes com sintomatologia recente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características sóciodemográficas da população estudada de acordo com sexo, faixa etária e município de ocorrência do caso;
- Determinar a frequência de soropositividade de IgM anti DENV e IgM anti ZIKV na população estudada, identificando as codeteções mais frequentes, dentre os três arbovírus circulantes e sua associação com tempo de sintomas relatado à coleta;
- Correlacionar a detecção sorológica de IgG anti CHIKV com o tempo de sintomas relatados;
- Comparar resultados de IgG anti DENV e IgG anti ZIKV na população estudada;
- Correlacionar a detecção sorológica de IgM com a detecção molecular do CHIKV por qRT-PCR na população estudada de acordo com tempo de sintomas e parâmetros demográficos coletados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O estudo foi realizado mediante aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 3.066355 e CAAE 03827118.7.0000.5054, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

4.2 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, de natureza transversal e retrospectivo.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O estudo foi composto por uma amostragem dos casos suspeitos de chikungunya que foram encaminhados ao LACEN-CE pelas unidades públicas de saúde do Ceará, no período de abril a setembro de 2017, para confirmação laboratorial deste agravo e tiveram resultado reagente na sorologia IgM anti CHIKV. Das 3000 amostras que compunham a soroteca, foram selecionadas todas as que se encaixavam nos critérios de inclusão descritos na seção 4.5, totalizando 370 amostras.

As informações relacionadas aos dados sócio-demográficos dos participantes deste estudo foram retiradas da base de dados do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) gerenciado pelo LACEN-CE e através das fichas de notificação do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN).

4.4 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido no setor de Virologia da Divisão de Biologia Médica do LACEN-CE, que é referência no diagnóstico das arboviroses para o estado do Ceará.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para inclusão neste estudo, foram consideradas as amostras de indivíduos que atendiam aos seguintes critérios:

- a) Apresentaram sorologia IgM anti-CHIKV reagentes,
- b) Encontravam-se até o 10º dia do início dos sintomas na data da coleta,
- c) Possuíam amostra biológica (soro) em conservação adequada para as análises do estudo,
- d) Apresentavam dados completos como: identificação do gênero, data de nascimento completa, data do início dos sintomas, data da coleta e município de procedência.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos da pesquisa amostras que apresentaram inadequação para as análises, como:

- a) Volume insuficiente,
- b) Hemólise ou lipemia intensa.

4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E DEFINIÇÕES DIAGNÓSTICAS

Foram utilizados métodos diretos e indiretos para confirmar a infecção por arbovírus (CHIKV, DENV e/ou ZIKV).

As amostras foram testadas por qRT-PCR para os três arbovírus, bem como para o antígeno da proteína não estrutural 1 da Dengue (NS1-ELISA), que é um marcador comumente utilizado para determinar-se infecção aguda. Além da sorologia IgM anti CHIKV previamente realizada para o diagnóstico dos pacientes, testes de imunoensaio (ELISA) foram complementarmente conduzidos para IgG anti CHIKV, IgM e IgG anti DENV e anti ZIKV.

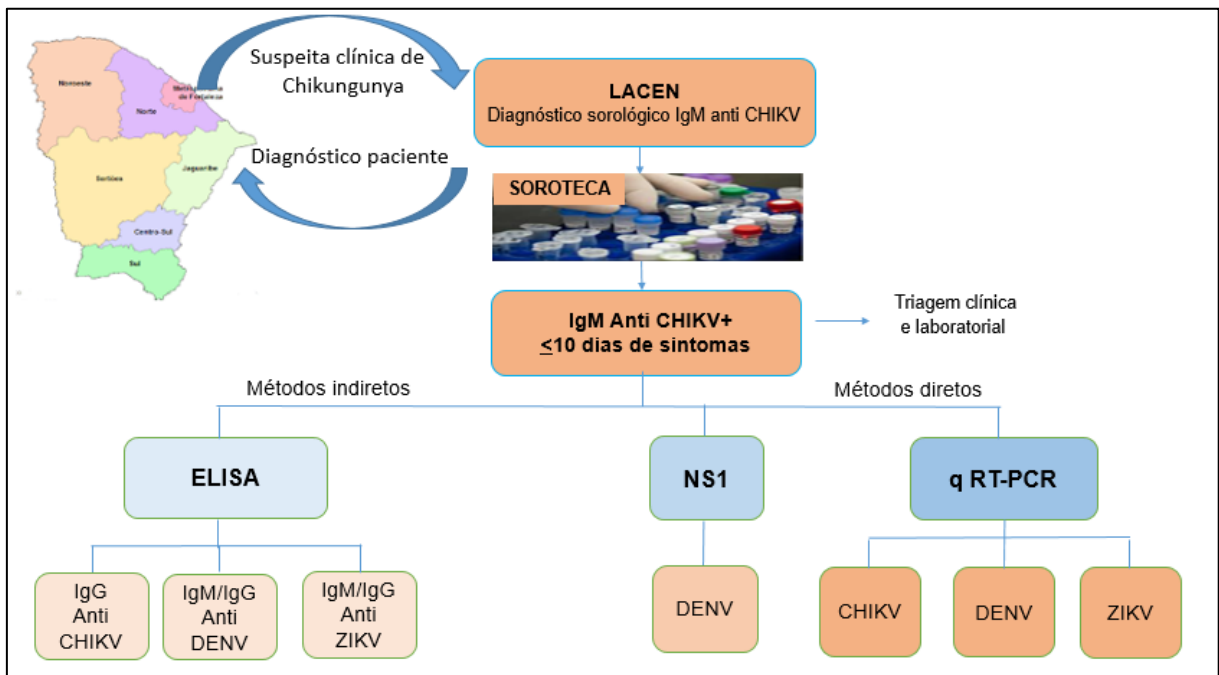
A definição do diagnóstico de infecção aguda por DENV, CHIKV e ZIKV foi baseada na presença de um resultado positivo por RT-PCR para um dos alvos virais ou combinação entre eles. Adicionalmente, no caso específico da dengue, um resultado positivo por sorologia de NS1(ELISA) foi considerado como infecção aguda. A presença de coinfeção foi definida pela ocorrência de infecção aguda para mais de um dos arbovírus estudados. Para classificação de infecção viral recente (não aguda), foram considerados os indivíduos que apresentaram resultado sorológico positivo de IgM contra quaisquer dos arbovírus estudados (DENV,

CHIKV e ZIKV). Aos que se encaixaram na definição de infecção recente para mais de um arbovírus, foram considerados, para fins deste estudo, como codetecção.

4.8 DESENHO DO ESTUDO

Após a definição dos critérios de inclusão, foi iniciada uma busca no banco de dados do GAL a fim de selecionar os pacientes que se encaixassem no perfil definido. Feito isso, as amostras dos pacientes previamente selecionados foram retiradas da soroteca e em seguida o material (soro) selecionado foi aliquotado para a posterior realização das análises como mostra o fluxo do estudo (Figura 16).

Figura 16 – Fluxo do Estudo



Fonte: Elaboração da autora

4.9 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

As análises sorológicas foram realizadas pela técnica ELISA para a detecção de anticorpos da classe IgG contra CHIKV e IgM e IgG contra DENV e ZIKV, sendo também por esta técnica a pesquisa do antígeno específico da Dengue (NS1). Todas as análises foram realizadas seguindo os protocolos estabelecidos por cada conjunto diagnóstico.

Após as análises finalizadas foram criados perfis para associar os resultados encontrados.

4.9.1 Diagnóstico sorológico para IgG Anti CHIKV

O diagnóstico sorológico para detecção de anticorpos IgG de chikungunya foi realizado utilizando o conjunto de kit diagnóstico Anti Vírus Chikungunya ELISA-IgG Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. Esse kit fornece um ensaio “in vitro” para anticorpos humanos da classe IgG específico para o CHIKV, em amostra de soro ou plasma. Trata-se de um teste por ELISA baseado em método indireto, composto por microplaca com poços revestidos com antígenos de CHIKV recombinante. No caso de amostra positiva, anticorpos IgG se ligam aos antígenos e com a adição de conjugado enzimático ocorre uma reação colorimétrica. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra e adicionadas aos poços de microtitulação revestidos com antígeno CHIKV recombinante.

A placa foi incubada a 37°C por 60 minutos, em seguida foram realizadas 3 lavagens em lavadora Biotek ELx50. Foi adicionada imunoglobulina IgG anti-humano marcada com peroxidase. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e depois disso adicionado uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio) deixando por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. A interpretação dos resultados deu-se do seguinte modo: valores de índice <0,8 foram considerados negativos, valores de 0,8 a <1,1 foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos (EUROIMMUN, 2018).

4.9.2 Diagnóstico sorológico para IgM Anti DENV

O diagnóstico laboratorial da dengue por ELISA IgM foi realizado através do kit comercial Serion ELISA classic (Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Este teste destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM Anti Dengue em amostras biológicas dos

pacientes, os quais, se presentes, ligam-se a antígenos específicos aderidos à superfície de poliestireno de cada um dos 96 poços da placa disponível nos kits. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune.

O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é convertido no produto corado p-nitrofenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra que é medido por fotometria. Antes do procedimento, todos os reagentes tiveram sua temperatura equilibrada à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra, em seguida, 100 µL das amostras diluídas e dos controles (negativo e calibrador) foram adicionadas aos poços revestidos com antígeno recombinante.

A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, em câmara úmida, depois foram realizadas 4 lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição de solução do conjugado (anticorpo policlonal dirigido contra IgA, IgG ou IgM humanos, conjugado com fosfatase alcalina). Após 30 minutos a 37°C, em câmara úmida, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (para-nitrofenilfosfato em tampão) durante 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. A reação foi interrompida pela adição de solução de parada (< 0,1N' hidróxido de sódio, 40 mM EDTA). As densidades ópticas (DO) foram medidas a 405 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, o valor do cut.-off foi calculado pelo valor médio de absorbância do calibrador com a margem de +/- 10%, onde acima de 10% foram considerados positivos, abaixo de 10% negativos e entre esta faixa foram indeterminados (SERION, 2013).

4.9.3 Diagnóstico sorológico IgG Anti DENV

O kit comercial utilizado foi o anti-dengue vírus ELISA IgG, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. O kit contém tiras de microplaca, cada uma com oito poços revestidos com antígenos purificados do vírus da dengue. Na primeira etapa de reação, amostras diluídas dos pacientes são incubadas nos poços. No caso de amostra positiva, anticorpos IgG específicos (IgA E IgM também) se ligarão aos antígenos. Para detecção da ligação do anticorpo, uma segunda incubação é realizada usando um conjugado enzimático anti-IgG humano, a qual catalisa uma reação com produção de cor. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas, o controle positivo, negativo e o calibrador (prontos

para uso) foram adicionados aos poços revestidos com antígeno recombinante. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, depois foram realizadas três lavagens em lavadora Biotek ELx50. Em seguida houve a adição do conjugado enzimático (Anti-IgG humano marcado com peroxidase) e após 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e em seguida foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio), permanecendo a placa durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice $<0,8$ foram considerados negativos, valores de $0,8$ a $<1,1$ foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos

4.9.4 Diagnóstico sorológico IgM Anti ZIKV

O diagnóstico sorológico para detecção qualitativa de anticorpos IgM anti Zika foi realizado utilizando o conjunto de kit diagnóstico comercial Novagnost® Zika Vírus IgM capture. Neste, as microplacas são revestidas com anticorpos da classe IgM anti-humano para que se liguem os anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, o conjugado da peroxidase de rábano (HRP) com antígenos do vírus Zika, é adicionado. Este antígeno-conjugado se liga aos anticorpos específicos IgM capturados. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado após adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), resultando numa reação colorimétrica. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas e os controles negativo, positivo e o controle cut-off (prontos para uso) e foram adicionadas aos poços revestidos com antígeno. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois foram realizadas 3 lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição da solução de conjugado, que foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados novamente e depois adicionou-se uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio), a placa foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,2 mol/l. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, o valor do cut-off foi calculado pelo valor médio de absorvância das determinações do controle de corte. Os resultados foram expressos como Unidades Novagnost® (U), calculados dividindo o valor da absorvância de uma amostra pelo cut-off calculado através do controle cut-off. A interpretação dos resultados deu-se do seguinte modo: valores de Unidades Novagnost® (U) <8,5 foram considerados negativos, valores de 8,5 a 11,5 foram considerados indeterminados e valores >11,5 foram considerados positivos (NOVAGNOST, 2016)

4.9.5 Diagnóstico sorológico IgG Anti ZIKV

Foram utilizados kits anti-Zika vírus ELISA IgG, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. O kit contém tiras de microplacas, cada uma com oito poços revestidos com proteína não estruturais recombinantes (NS1) do ZIKV. Na primeira etapa de reação, amostras diluídas do paciente são incubadas nos poços. No caso de amostra positiva, anticorpos IgG específicos (IgA E IgM também) se ligarão aos antígenos. Para detecção da ligação do anticorpo, uma segunda incubação é realizada usando um conjugado enzimático anti-IgG humano, a qual catalisa uma reação de cor. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas, os controles positivo, negativo e calibrador (prontos para uso), foram adicionados aos poços revestidos com antígeno recombinante. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois foram realizadas três lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição do conjugado enzimático (Anti-IgG humano marcado com peroxidase). Após 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice <0,8 foram considerados negativos, valores de 0,8 a <1,1 foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

4.9.6 Determinação do antígeno NS1-dengue

O kit comercial utilizado foi o Dengue NS1, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. O kit contém tiras de microplaca, cada uma com oito poços revestidos com anticorpos anti-DENV NS1, monoclonais, contra os sorotipos 1,2,3 e 4. Na primeira etapa de reação, amostras diluídas dos pacientes são incubadas nos poços. No caso de amostra positiva, o NS1 do DENV se ligará aos anticorpos anti-Dengue NS1 específicos. Para detecção da ligação do antígeno, uma segunda incubação é realizada usando um conjugado enzimático (anti-DENV NS1 marcado com uma enzima), o qual catalisa uma reação colorimétrica. As amostras de soro foram diluídas em 1:2 em diluente de amostra. As amostras diluídas, o controle positivo, negativo e o calibrador (prontos para uso) foram adicionados aos poços revestidos com anticorpo monoclonal. A placa foi incubada por 60 minutos à temperatura de 37^oC, depois foram realizadas três lavagens em lavadora Biotek ELx50. Em seguida houve a adição do conjugado enzimático (Anti-vírus da dengue marcado com peroxidase) e após 60 minutos à temperatura de 37^oC, os poços foram lavados novamente e em seguida foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio), permanecendo a placa durante 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice <0,8 foram considerados negativos, valores de 0,8 a <1,1 foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

4.10 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O diagnóstico molecular foi realizado pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR) para detecção de alvos virais específicos de CHIKV, ZIKV e DENV (Quadro 2).

4.10.1 Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada através de kit comercial (Promega®), conforme instruções do fabricante. O kit combina propriedades de ligação seletiva de membrana baseado

em gel de sílica com a velocidade de micro centrifugação. A amostra é inicialmente submetida à lise celular sob condições altamente desnaturantes para inativação, inclusive RNases, e assim garantir a purificação de RNA. Condições de tampão são ajustadas para se promover uma boa ligação do RNA à membrana localizada na coluna de separação. O RNA liga-se então à membrana e os contaminantes são removidos por lavagem em múltiplos passos utilizando-se de soluções específicas contendo etanol. Ao final desse processo, uma solução tampão livre de RNase é aplicada para se eluir RNA de alta qualidade (PROMEGA, 2018).

4.10.2 qRT-PCR para detecção de DENV, CHIKV e ZIKV

Para a amplificação dos alvos virais e do controle interno, foi utilizado um sistema padrão do tipo “one-step” em que a transcrição reversa de RNA em cDNA é realizada em conjunto com reação em cadeia pela polimerase de tempo real (qRT-PCR). Os experimentos foram realizados em microplacas de 96 poços utilizando-se de ensaios contendo iniciadores e sondas com dupla marcação de fluoróforos e seguindo protocolos descritos para DENV (Lanciotti *et al.*, 1992) para CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007) e para ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008). Neste procedimento, 5 µl de RNA foram aplicados em 20 µl de uma mistura contendo H₂O livre de nucleases (Promega, Wisconsin, EUA), mistura reagente com solução tampão (GoTaq®Probe qPCR Master Mix, Promega, Wisconsin, EUA), enzima de transcrição reversa (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, Wisconsin, EUA), além dos ensaios contendo os iniciadores e sondas específicas para cada alvo e descritos no Quadro 02. As reações e leituras foram realizadas em termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 50°C por 30 min); ativação (1 ciclo de 95°C por 2 min); seguido por 45 ciclos de denaturação (95° C por 15 seg.) e anelamento/extensão (55°C por 35 seg.).

Quadro 2 – Ensaios de Oligonucleotídeos contendo iniciadores e sondas específicos para detecção molecular de CHIKV, DENV e ZIKV. (Continua)

CHIKV	Sequência
Primer F	5'-AAA GGG CAA ACT CAG CTT CAC-3'
Primer R	5'-GCC TGG GCT CAT CGT TAT TC-3'
Sonda	6FAM-CGC TGT GAT ACA GTG GTT TCG TGT G-MGB/NFQ

Quadro 2 – Ensaios de Oligonucleotídeos contendo iniciadores e sondas específicos para detecção molecular de CHIKV, DENV e ZIKV.

DENV-1	Sequência
Primer 1F	5'-CAAAGGAAGTCGYGCAATA 3'
Primer 1R	5'-CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC 3'
Sonda	6FAM-CATGTGGYTGGGAGCRCGC-BHQ1
DENV-2	Sequência
Primer 2F	5' d CAGGCTATGGCACYGTCACGAT 3'
Primer 2R	5' d CCATYTG CAGCARCACCATCTC 3'
Sonda	HEX-CTCYCCRAGAACGGGCTCGACTTCAA-BHQ-1 3'
DENV-3	Sequência
Primer 3F	5' d GGACTRGACACACGCACCCA 3'
Primer 3R	5' d CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT 3'
Sonda	CFR610-ACCTGGATGTGCGGCTGAAGGAGCTTG-BHQ2
DENV-4	Sequência
Primer 4F	5' d TTGTCCTAATGATGCTRGTCG 3'
Primer 4R	5' d TCCACCYGAGACTCCTTCCA 3'
Sonda	Q670-TYCCTACYCCTACGCATCGCATTCCG-BHQ2
ZIKV	Sequência
Primer F	5' d AARTACACATAACCARAACAAAGTGGT 3'
Primer R	5' d TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG 3'
Sonda	6FAM-CTY AGA CCA +G+C+T+GAA R-3IABkFQ

Fonte: Elaborado pela autora

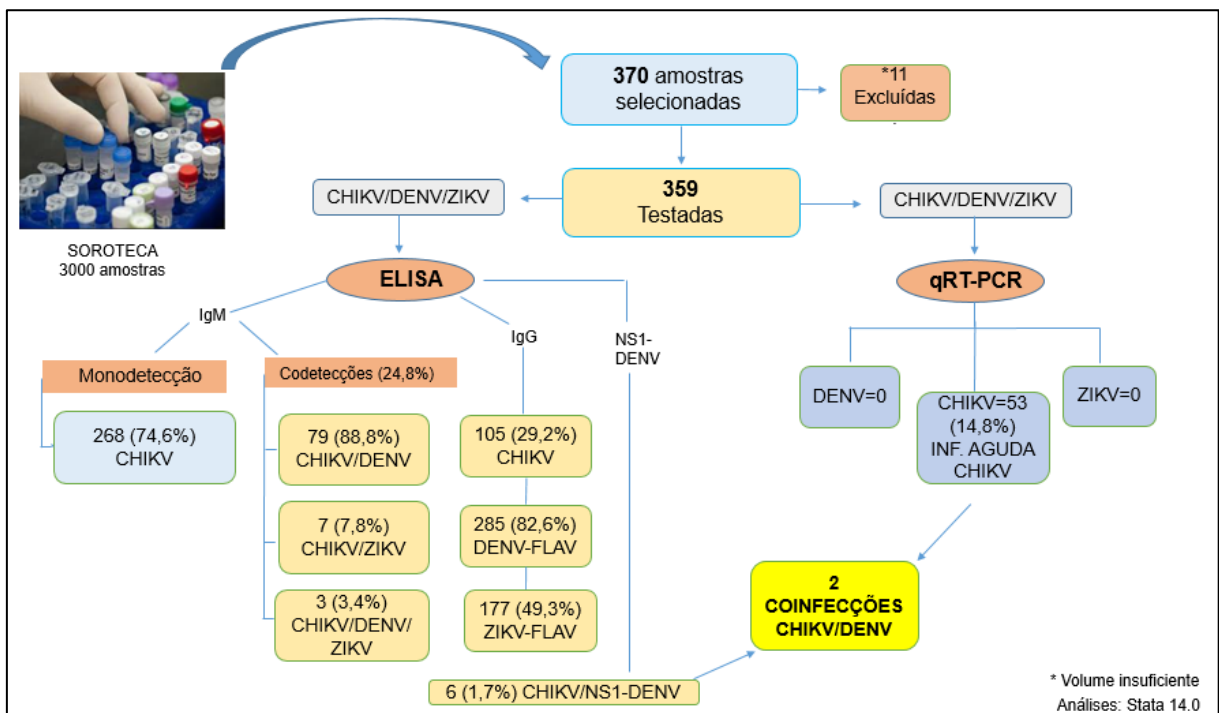
4.11 ANÁLISE DE DADOS

Os dados subsequentemente gerados por este estudo foram compilados em planilha padronizada no programa Excel 2010 (Microsoft Office) e posteriormente integrados e analisados por meio do programa estatístico Stata, versão 14.0. Foram realizadas as análises descritivas e posteriormente testes estatísticos tendo como parâmetros o coeficiente de correlação de Pearson, teste exato de Fisher, além de testes estatísticos não-paramétricos: Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% e uma taxa de erro α de 5% em que os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

Da amostragem de 370 participantes selecionados para compor o estudo, 11 foram excluídos por apresentarem amostras com volume insuficiente para as análises. Desta forma, 359 participantes tiveram suas amostras testadas e analisadas tanto por sorologia quanto por biologia molecular para os três arbovírus: CHIKV, DENV e ZIKV, como mostra o fluxo na figura 17.

Figura 17 - Fluxo de Resultados.



Fonte Elaborada pela autora

A análise mostrou que 64,9% (233/359) dos participantes eram do sexo feminino. Do total, 76,9% (276/359) encontravam-se entre o 6^o e o 10^o dia do início dos sintomas no momento da coleta e 49,6% (178/359) estavam na faixa etária entre 30 e 59,9, sendo a média das idades de 38,1 anos e a mediana de 37,9 anos. (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas dos pacientes do estudo, confirmados laboratorialmente com chikungunya IgM, Ceará, 2017 (N = 359).

VARIÁVEL	CATEGORIA	N (%)
Sexo	Masculino	126 (35,1)
	Feminino	233 (64,9)
Faixa Etária (anos)	< 6	13 (3,6)
	6-12,9	26 (7,2)
	13-29,9	94 (26,2)
	30-59,9	178 (49,6)
	≥ 60	48 (13,4)
Período de Sintomas	< 6 dias	83 (23,1)
	6 – 10 dias	276 (76,9)
Total		359 (100)

Fonte: Elaborada pela autora

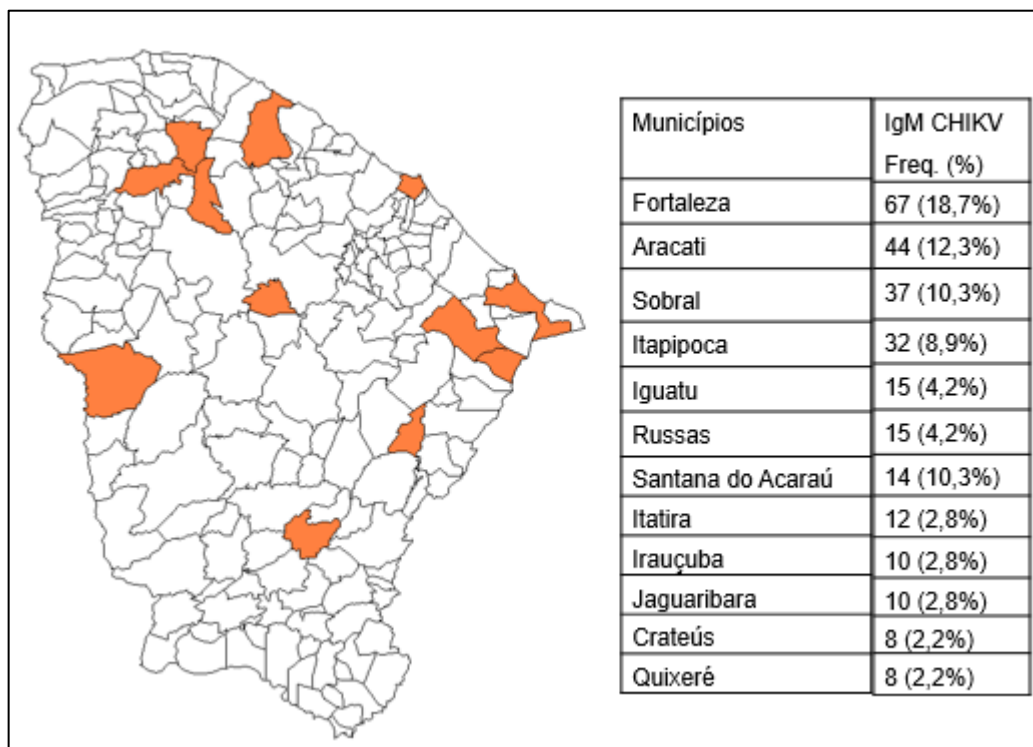
Tabela 2 - Média e mediana das idades e de tempo de sintomas relatados na coleta dos pacientes do estudo, confirmados laboratorialmente com chikungunya IgM, Ceará, 2017 (N = 359).

Variável	Média	DP	P 50	P 25	P 75	IQR	Min	Max	N
Idade	38,1	19,1	37,9	22,9	52,1	29,3	0,2	88,5	359
Sintomas	6,2	1,6	6	6	7	1	1	10	359

Fonte: Elaborada pela autora

Dentre os 46 municípios responsáveis pelos encaminhamentos de amostras que fizeram parte da população do estudo, o município de Fortaleza foi responsável por 18,7% (67/359) das amostras, seguido por Aracati com 12,3% (44/359), Sobral com 10,3% (37/359) e Itapipoca com 8,9% (32/359). Dos 42 municípios restantes, merecem destaque: Iguatu, Russas, Santana do Acaraú, Itatira, Jaguaribara, Irauçuba, Quixeré e Crateús conforme indicado na figura 18.

Figura 18 - Municípios responsáveis pelo maior número de encaminhamentos das amostras do estudo, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborada pela autora

Das 359 amostras testadas por sorologia nos diferentes testes comerciais pela técnica ELISA, 29,2% (105/359) foram positivas também para IgG anti CHIKV. Na testagem para IgM anti DENV 22,8% (82/359) foram positivas. Na avaliação para IgG anti DENV e para o antígeno NS1 DENV, 14 amostras não foram analisadas por esgotamento de volume, portanto, 345 amostras foram testadas e dessas 82,6% (285/345) foram positivas no IgG anti DENV e 1,7% (6/345) foram positivas no NS1 DENV. Para ZIKV todas as 359 amostras foram testadas, 2,8% (10/359) tiveram resultado positivo na IgM anti ZIKV e 49,3% (177/359) na IgG anti ZIKV. (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado das sorologias por ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017 (N = 359/345).

Sorologia	N	Positivo N (%)	Inconc. N (%)	Negativo N (%)
IgM anti CHIKV	359	359 (100,0)	-	-
IgG anti CHIKV	359	105 (29,2)	20 (5,6)	234 (65,2)
IgM anti DENV	359	82 (22,8)	4 (1,1)	273 (76,1)
IgG anti DENV	345	285 (82,6)	1 (0,3)	59 (17,1)
NS1 DENV	345	6 (1,7)	4 (0,3)	335 (97,0)
IgM anti ZIKV	359	10 (2,8)	1 (0,3)	348 (96,9)
IgG anti ZIKV	359	177 (49,3)	9 (2,5)	173 (48,2)

Fonte: Elaborada pela autora. Inconc. = Inconclusivo

Ao relacionar as sorologias IgM/IgG anti CHIKV, foi possível observar que 29,2% (105/359) dessas amostras estavam positivas concomitantemente para IgM e IgG anti CHIKV. (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados de sorologia IgM e IgG anti CHIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N = 359).

CHIKV IgM/IgG	Frequência	%
IgM ⁺ IgG ⁺ anti CHKV	105	29,2
IgM ⁺ IgG ⁻ anti CHKV	234	65,2
IgM ⁺ IgG ^{+/-} anti CHKV	20	5,6
Total	359	100,0

Fonte: Elaborado pela autora. (+) positivo, (-) negativo, (+/-) Inconclusivo

Analisando os resultados positivos para o perfil IgM/IgG anti CHIKV foi possível identificar que o sexo feminino foi responsável por 67,0% (70/105) desse total e a faixa etária entre 30-59,9 anos respondeu por 61,0% (64/105), onde a média e mediana das idades foram respectivamente de 41 e 43 anos. O IgG foi detectado desde o dia 1 após início dos sintomas até o dia 10, sendo a maioria 80,0% (84/105) detectada entre o 6^o -7^o dia do início dos sintomas, apresentando significância estatística (P=0,0020). A média e a mediana do período de sintomas foram de 6,4 e 7 dias respectivamente. (Tabelas 5 e 6) (Gráficos 1, 2 e 3).

Tabela 5 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo para o perfil IgM/IgG anti CHIKV⁺, Ceará, 2017 (N = 105).

CHIKV IgM+/IgG+	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	35	33,0
Feminino	70	67,0
Período de Sintomas		
<6 dias	21	20,0
Entre 6-10 dias	84	80,0
Faixa Etária (anos)		
< 6	3	2,9
6-12,9	6	5,7
13-29,9	19	18,0
30-59,9	64	61,0
≥ 60	13	12,4
Total	105	100,0

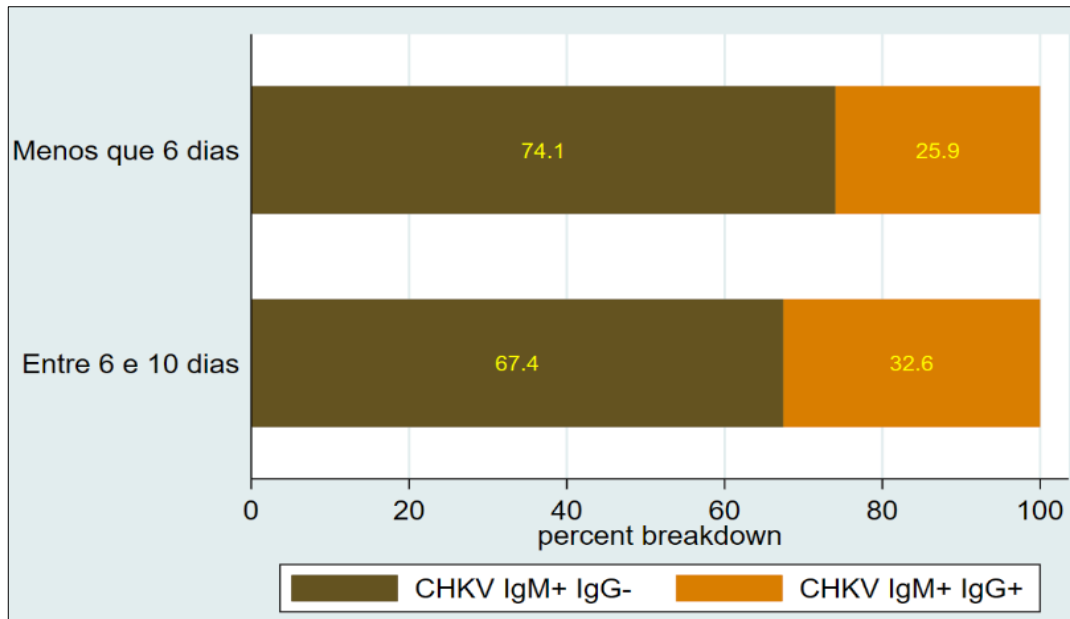
Fonte: Elaborada pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo

Tabela 6 - Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta de amostras dos pacientes do estudo com IgG anti CHIKV⁺, Ceará, 2017. (N = 105).

Variável	Média	DP	P 50	P 25	P 75	IQR	Min	Max	N
Idade	41,0	18,6	43,0	26,9	54,6	28,1	0,2	81,7	105
Sintomas	6,4	1,9	7	6	8	2	1	10	105

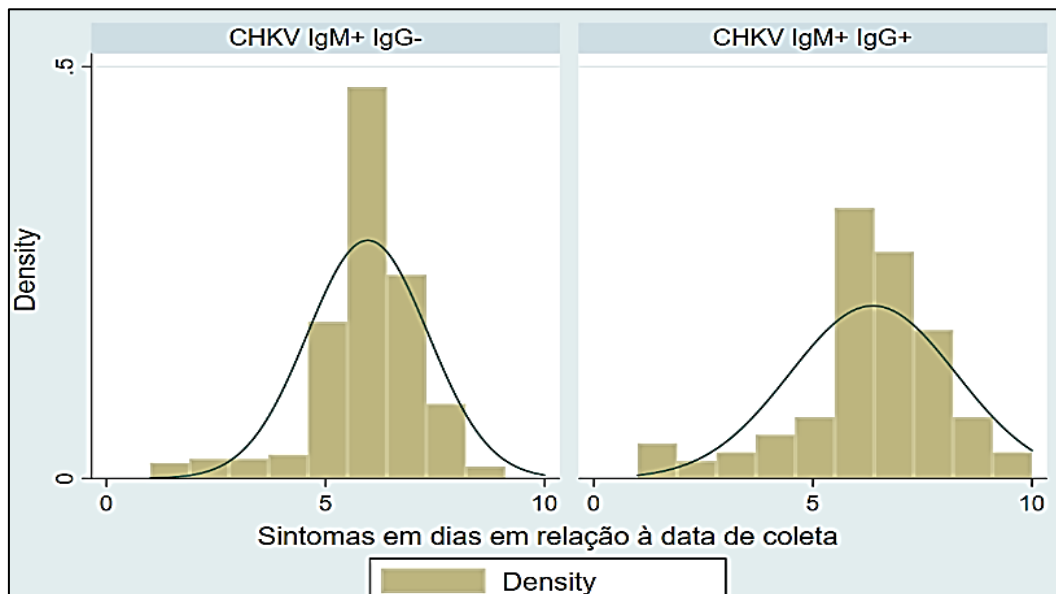
Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 1 – Soropositividade IgM/IgG anti CHIKV de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017. N = 339



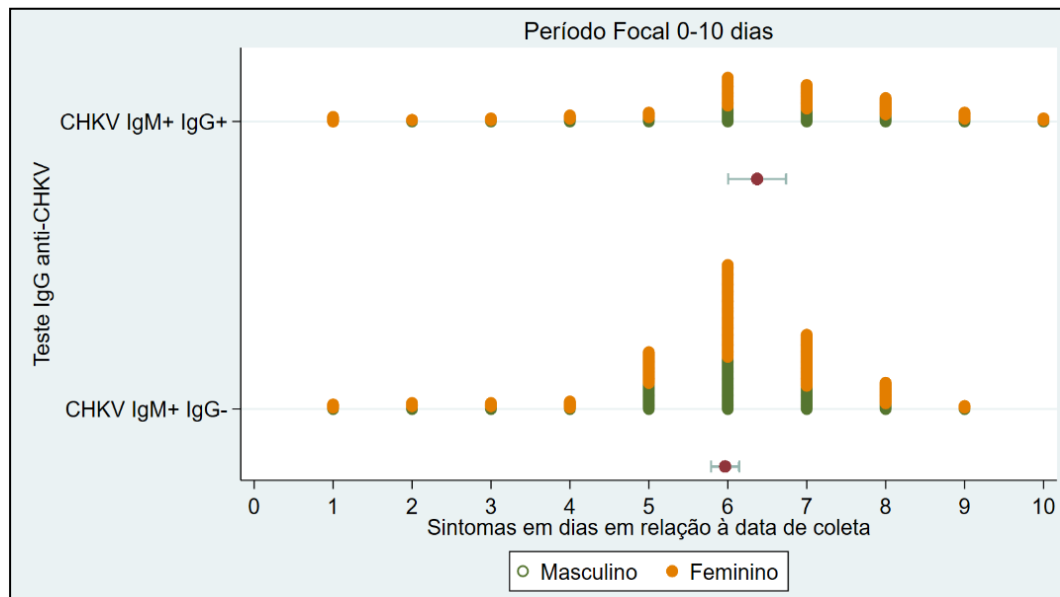
Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo. Teste de *Mann Whitney* * $P < 0,05$ e $z = -3.084$

Gráfico 2 – Histograma do perfil IgM/IgG anti CHIKV em relação aos dias de sintomas, Ceará, 2017(N=339).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo. Teste de *Mann Whitney* * $P < 0,05$.

Gráfico 3 - Perfil de IgM/IgG anti CHIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017. N = 339



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo.

Ao relacionar os achados de IgM anti CHIKV e IgM anti DENV, foi observado a codetecção entre esses arbovírus em 22,8% (82/359) das amostras. (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados de codetecções entre CHIKV e DENV por sorologia IgM, Ceará, 2017(N=359).

IgM CHIKV/DENV	Frequência	%
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ⁺	82	22,8
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ⁻	273	76,0
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ^{+/-}	4	1,1
Total	359	100,0

Fonte: Elaborada pela autora. (+) positivo, (-) negativo, (+/-) Inconclusivo.

Analisando as codetecções entre CHIKV e DENV foi possível verificar que o sexo feminino foi responsável por 65,9% (54/82) delas e a faixa etária entre 30-59,9 anos respondeu por 59,8% (49/82). O IgM anti DENV foi detectado entre o 3º e o 10º dia após início dos sintomas, sendo que 92,7% (76/82) deles encontravam-se entre 6-10 dias, o que apresentou significância estatística ($P < 0.001$). A média e a mediana do período de sintomas foram de 6,9 e 7 dias respectivamente. (Tabelas 8 e 9) (Gráficos 4 e 5).

Tabela 8 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com o perfil IgM anti CHIKV⁺ e IgM anti DENV⁺, Ceará, 2017 (N = 82).

IgM CHIKV +/DENV +	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	28	34,1
Feminino	54	65,9
Período de Sintomas		
<6 dias	6	7,3
Entre 6-10 dias	76	92,7
Faixa Etária (anos)		
< 6	2	2,4
6-12,9	9	11,0
13-29,9	16	19,5
30-59,9	49	59,8
≥ 60	6	7,3
Total	82	100,0

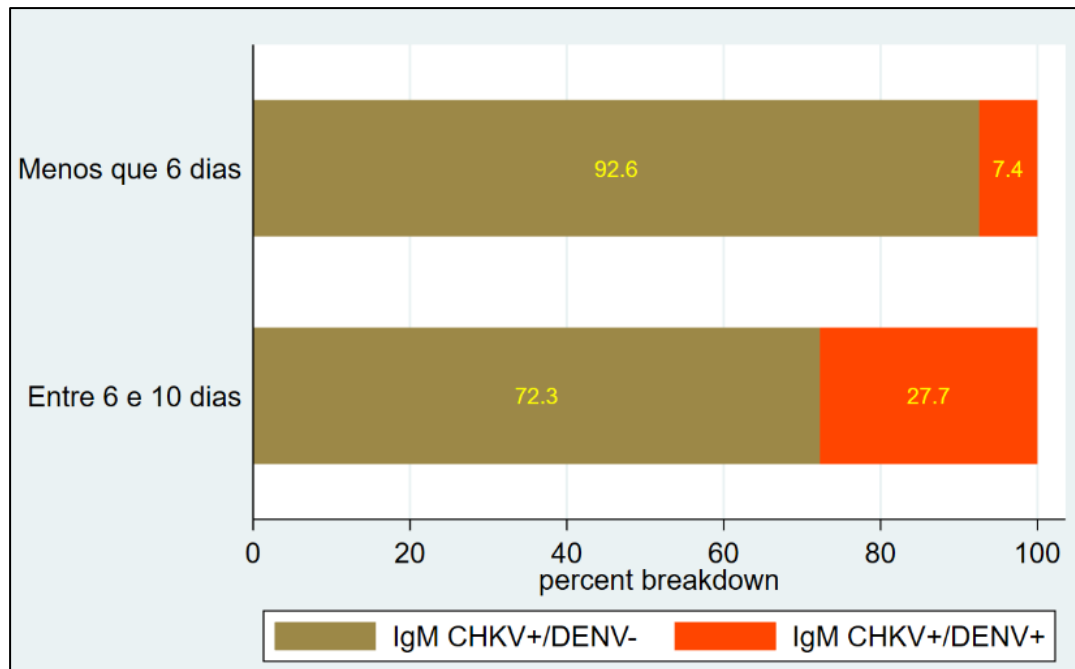
Fonte: Elaborada pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo

Tabela 09 - Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta de amostras dos pacientes do estudo com codeteção IgM anti CHIKV/DENV, Ceará, 2017 (N = 82).

Variável	Média	DP	P 50	P 25	P 75	IQR	Min	Max	N
Idade	36,0	17,1	39,1	24,3	49,7	25,4	0,1	71,2	82
Sintomas	6,9	1,2	7	6	8	2	3	10	82

Fonte: Elaborada pela autora.

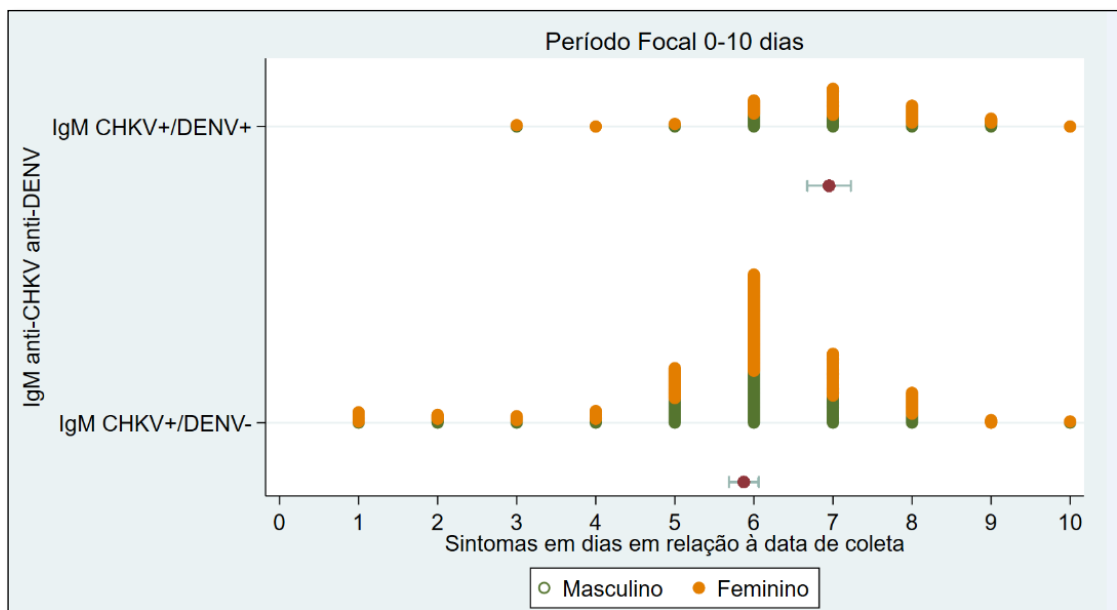
Gráfico 4 - Soropositividade de IgM anti CHIKV x IgM anti DENV, de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017(N=355).



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo.

Teste de Mann Whitney. $P < 0,001$ e $z = -6.164$.

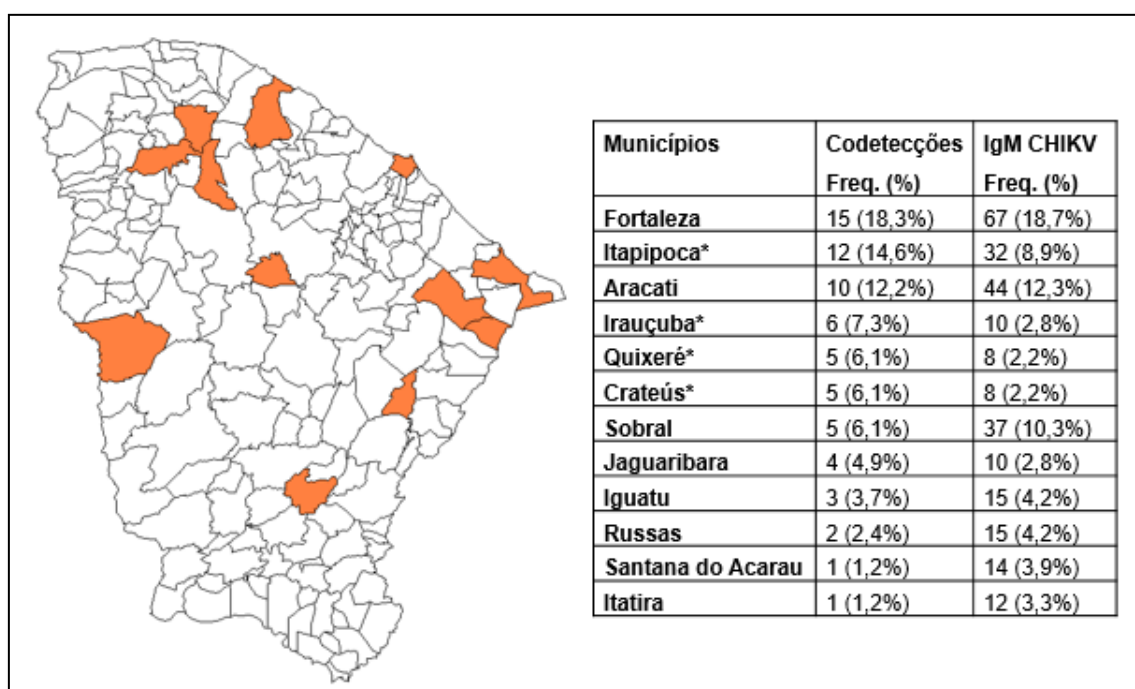
Gráfico 5 - Perfil de IgM anti CHIKV/DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=355)



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo. Teste de Mann Whitney. $P < 0,001$

As codeteccões entre CHIKV/DENV foram verificadas em amostras oriundas de 24 dos 46 municípios que fizeram parte da população do estudo. O município de Fortaleza foi responsável por 18,3% (15/82) dessas codeteccões, seguido por Itapipoca com 14,6% (12/82) e Aracati com 12,2%(10/82). Destaca-se também os municípios de Irauçuba, Quixeré, Crateús, Sobral, Russas, Santana do Acaraú e Itatira. (Figura 19).

Figura 19 - Municípios com maior frequência de codeteccões entre CHIKV/DENV que fizeram parte da população do estudo, Ceará, 2017.



Fonte Elaborado pela autora.* Incremento com relação a IgM CHIKV.

De acordo com os resultados de IgG anti DENV foi observado que 82,9% (285/345) das amostras testadas para este agravo foram positivas, sendo 64,9% (185/285) do sexo feminino, 77,2% (220/285) estavam no período entre 6-10 dias de sintomas e 54,7% (156/285) estavam na faixa etária entre 30-59,9 anos, o que apresentou significância estatística ($p = 0,0417$). A mediana de idade e tempo de sintomas foram respectivamente de 40,9 anos e 6 dias. (Tabelas 10 e 11) (Gráfico 6).

Tabela 10 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo confirmados laboratorialmente com IgG anti DENV⁺, Ceará, 2017 (N = 285).

IgM CHIK⁺/IgG DENV⁺	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	100	35,1
Feminino	185	64,9
Período de Sintomas		
<6 dias	65	22,8
Entre 6-10 dias	220	77,2
Faixa Etária (anos)		
< 6	6	2,1
6-12,9	18	6,3
13-29,9	64	22,5
30-59,9	156	54,7
≥ 60	41	14,4
Total	285	100,0

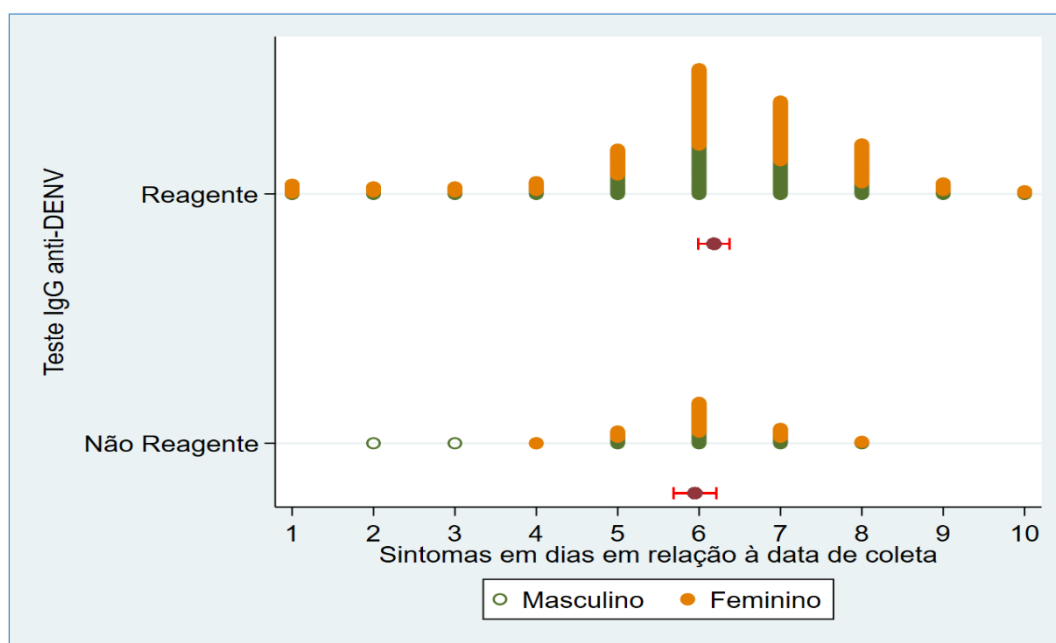
Fonte: Elaborada pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo.

Tabela 11 - Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta das amostras dos pacientes do estudo com codeteção IgM anti CHIKV/IgG anti DENV, Ceará, 2017 (N = 285).

Variável	Média	DP	P 50	P 25	P 75	IQR	Min	Max	N
Idade	40,3	18,4	40,9	26,7	53,1	26,3	2,0	88,5	285
Sintomas	6,2	1,6	6	6	7	1	1	10	285

Fonte: Elaborada pela autora.

Gráfico 6 - Perfil de IgG anti DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=344).



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. Mann Whitney *P<0.05

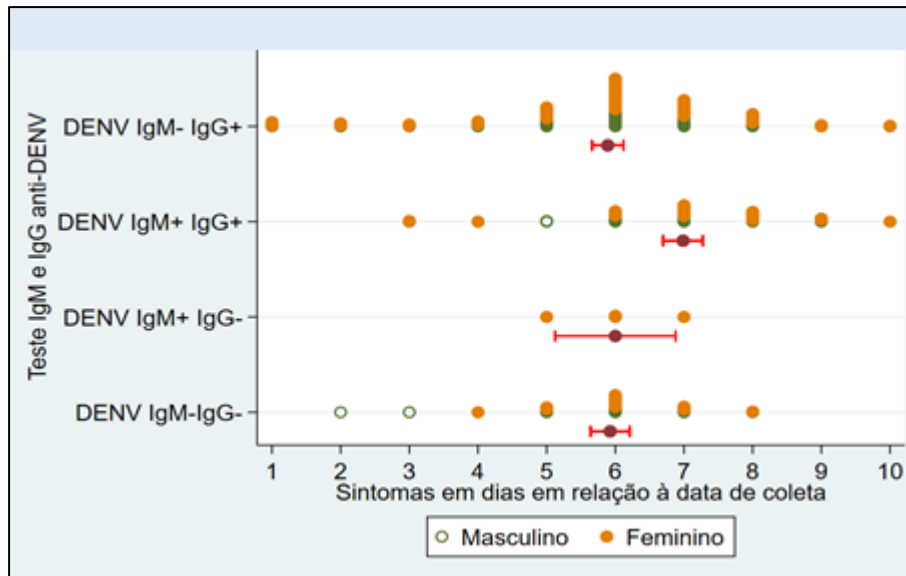
Ao relacionar IgM e IgG anti DENV houve significância estatística (P=0,0001) e foi possível observar que 1,5% (5/341) das amostras foi reagente somente no IgM. Em contrapartida, 61% (208/341) referem somente o IgG anti DENV positivo. Em ambas as situações houve predomínio do sexo feminino. (Tabela 12) (Gráfico 7).

Tabela 12 – Perfil IgM/IgG anti DENV de pacientes do estudo confirmados laboratorialmente com IgM anti CHIKV, Ceará, 2017 (N = 341).

IgM/IgG DENV+	Frequência	(%)
IgM ⁻ /IgG ⁻ anti DENV	53	15,5
IgM ⁺ /IgG ⁻ anti DENV	5	1,5
IgM ⁺ /IgG ⁺ anti DENV	75	22,0
IgM ⁻ /IgG ⁺ anti DENV	208	61,0
Total	341	100,0

Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo.

Gráfico7 - Perfil de IgM/IgG anti DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=341).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo. Teste:Kruskal-Wallis.. **P< 0.01 e chi-squared =35.387.

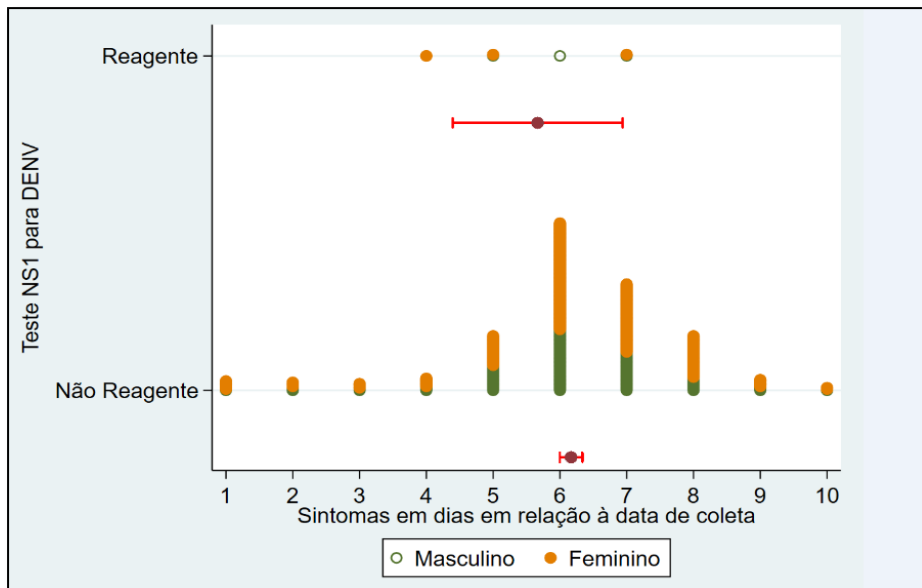
Considerando que 1,7% (6/345) das amostras foram positivas para o antígeno NS1 DENV, é possível observar que em 1,1% (4/345) delas o IgM anti DENV foi positivo, mas em 0,6% (2/345) o IgM anti DENV estava negativo. Desta forma, podemos entender que mais duas codeteccões entre CHIKV e DENV foram demonstradas (desta vez por causa do NS1 DENV), perfazendo desta forma, um total de 84 codeteccões entre esses dois arbovírus. (Tabela 13) (Gráfico 8).

Tabela 13 – Resultados de codeteccões entre IgM anti CHIKV e DENV NS1.

IgM CHIKV/DENV (NS1e IgM)	Frequência	%
IgM CHIKV+/NS1+	6	1,7
(IgM CHIKV+/IgM DENV+/NS1+)	4	1,1
(IgM CHIKV+/IgM DENV-/NS1+)	2	0,6
IgM CHIKV+/NS1 +/-	4	1,2
IgM CHIKV+/NS1 -	335	97,0
Total	345	100,0

Fonte: Elaborado pela autora. (+) positivo, (-) negativo, (+/-) Inconclusivo.

Gráfico 8 - Perfil de NS1-DENV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=341).



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. Kendall's tau-b = -0.0891 ASE P= 0.067

Ao relacionar os achados de IgM anti CHIKV e anti ZIKV, foi observado que houve codetecção entre esses arbovírus em 2,8% (10/359) das amostras. (Tabela 14).

Tabela 14 – Resultados de codetecções entre CHIKV e ZIKV por sorologia IgM, dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N = 359).

IgM anti CHIKV/ZIKV	Frequência	%
IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ⁺	10	2,8
IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ⁻	348	96,9
IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ^{+/-}	1	0,3
Total	359	100,0

Fonte: Elaborada pela autora. (+) positivo, (-) negativo, (+/-) Inconclusivo.

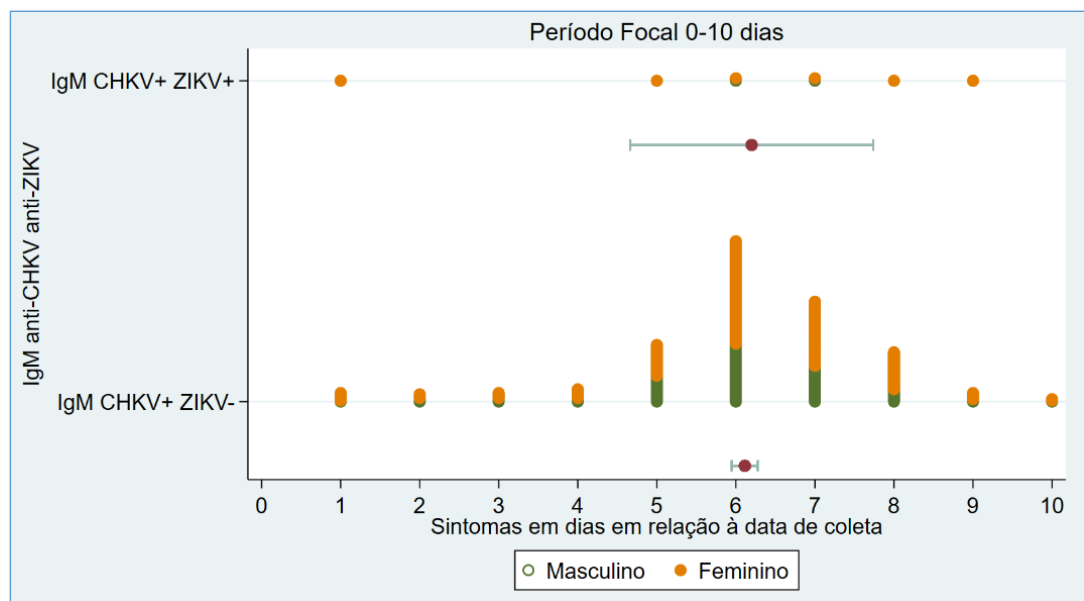
Dentre as codetecções entre CHIKV e ZIKV o sexo feminino foi responsável por 60,0% (6/10) delas, a faixa etária entre 30-59,9 anos respondeu por 40,0% (4/10) dessas codetecções e 80,0% (8/359) das amostras positivas encontravam-se no período compreendido entre o 6^o e o 10^o dia após início dos sintomas. (Tabela 15) (Gráfico 9).

Tabela 15 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes com perfil IgM anti CHIKV⁺/ZIKV⁺ do estudo Ceará, 2017. (N=10).

IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ⁺	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	4	40,0
Feminino	6	60,0
Período de Sintomas		
<6 dias	2	20,0
Entre 6-10 dias	8	80,0
Faixa Etária (anos)		
< 6	1	10,0
6-12,9	2	20,0
13-29,9	3	30,0
30-59,9	4	40,0
≥ 60	0	
Total	10	100,0

Fonte: Elaborada pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo.

Gráfico 9 - Perfil de IgM anti CHIKV/ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N=358).



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo, (-) negativo. Kendall's tau-b = 0.0133 ASE P= 0.050.

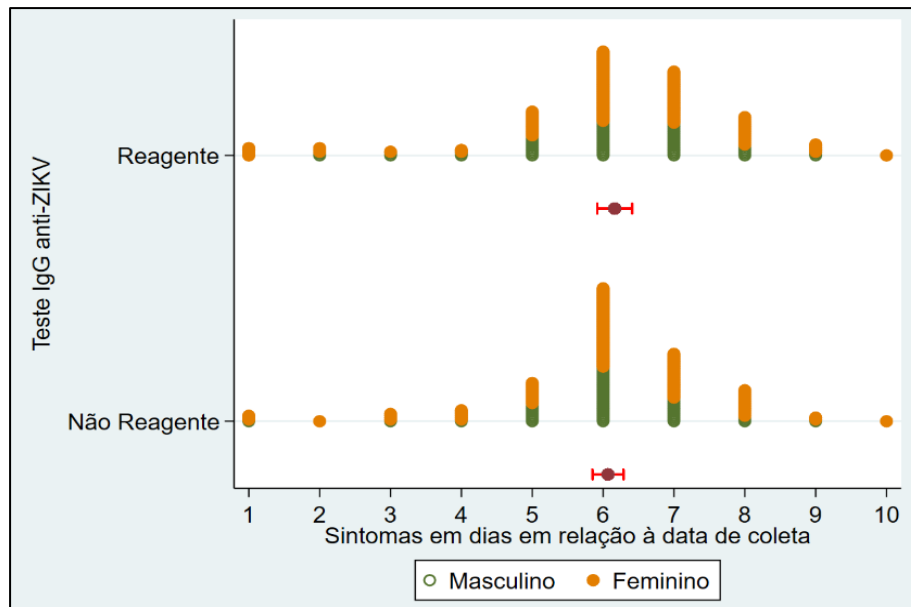
Analisando os resultados de IgG anti ZIKV foi possível identificar que 49,3% (177/359) das amostras estavam positivas; dessas, 65,0% (115/177) eram sexo feminino, 55,4% (98/177) estavam na faixa etária entre 30-59,9 anos e 76,3% (135/177) no período compreendido entre 6-10 dias do início dos sintomas. (Tabela 16) (Gráfico10).

Tabela 16 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com perfil IgM CHIK⁺/IgG ZIKV⁺, Ceará, 2107 (N =177).

IgM CHIK ⁺ /IgG ZIKV ⁺	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	62	35,0
Feminino	115	65,0
Período de Sintomas		
<6 dias	42	23,7
Entre 6-10 dias	135	76,3
Faixa Etária (anos)		
< 6	2	1,1
6-12,9	11	6,2
13-29,9	32	18,1
30-59,9	98	55,4
≥ 60	34	19,2
Total	177	100,0

Fonte: Elaborada pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo.

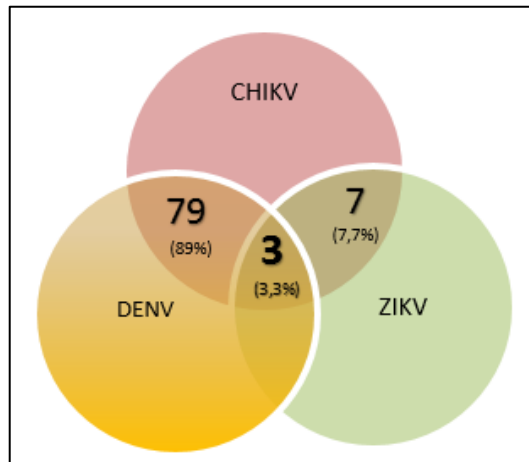
Gráfico – 10- Perfil de IgG anti ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=350).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo.

Analisando as sorologias IgM para os três arbovírus (CHIKV/DENV/ZIKV), foi encontrada codetecção em 24,8% (89/359) das amostras. Em 3 delas (3,3%) foi observada a tripla detecção (Figura 20). As referidas amostras eram todas de pacientes do sexo masculino, estavam compreendidas entre o 6^o e 7^o dias do início dos sintomas e pertenciam a duas faixas etárias distintas. Nenhuma delas foi positiva para o antígeno NS1 da dengue. Todas variaram quanto ao resultado IgG anti CHIKV e foram negativas para IgG anti DENV e anti ZIKV. (Quadro 3) (Gráfico 11).

Figura 20 - Diagrama evidenciando as codeteccões de IgM anti CHIKV, DENV e ZIKV, Ceará, 2017(N=89).



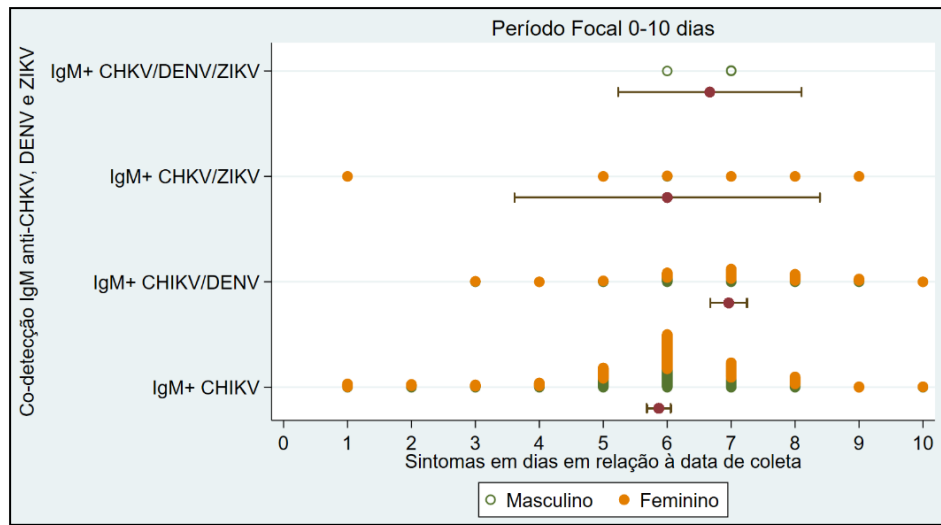
Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 3 – Resultados de testes ELISA apontando tripla detecção entre IgM anti CHIKV/ DENV/ZIKV, relatando IgG anti CHIKV/DENV/ZIKV e NS1, de acordo com o sexo, idade e dias de sintomas na população em estudo, Ceará, 2017. N=3

CÓD. ID.	IgM CHIKV	IgM DENV	IgM ZIKV	IgG CHIKV	IgG DENV	IgG ZIKV	NS1 DENV	Idade (anos)	Sint. (dias)	Sexo
MDB4384	+	+	+	-	-	-	-	9,3	6	M
MDB3932	+	+	+	+/-	-	-	-	24,3	7	M
MDB46	+	+	+	+	-	-	-	23,6	7	M

Fonte: Elaborado pela autora. Legenda: (cod.id) código de identificação, sint. (sintomas) (+/-) Inconclusivo; (M) Masculino

Gráfico 11 - Resultado das sorologias evidenciando as codeteccões entre IgM anti CHIKV, anto DENV e anti ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359).



Fonte: Elaborado pela autora. *Os indeterminados foram excluídos desta análise (+) positivo. Teste:Kruskal-Wallis. **P< 0.01

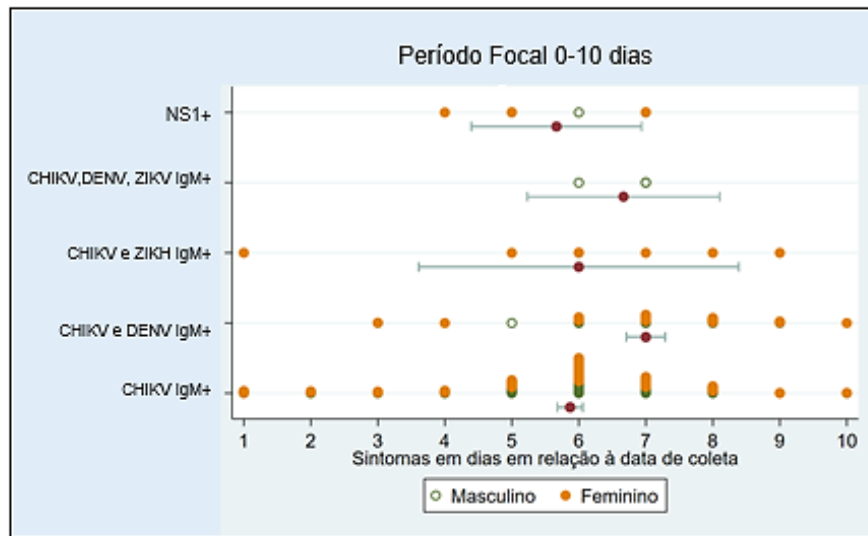
Avaliando os resultados de NS1-DENV juntamente com codeteccões entre sorologias IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV de acordo com período de sintomas e com o sexo, identificou-se o predomínio do sexo feminino em todos os grupos, exceto na tripla detecção. Quanto aos dias de sintomas, a mediana de todos os perfis manteve-se no intervalo entre o 5^o e 7^o dias, apresentando variação na média. (Tabela 17) e (Gráfico 12).

Tabela 17 - Distribuição dos resultados de NS1-DENV e sorologias IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV dos pacientes do estudo, Ceará, 2017. (N= 91).

Codeteccões	Frequência	(%)
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ⁺ /DENV NS1 ⁺	81	89,0
IgM CHIKV ⁺ /ZIKV ⁺	7	7,7
IgM CHIKV ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	3	3,3
Total	91	100,0

Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo

Gráfico 12 - Perfil de NS1-DENV e IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) positivo

Teste: Kruskal-Wallis.** P< 0.01.

A amplificação por qRT-PCR foi observada exclusivamente para o CHIKV, em 14,8% (53/359) das amostras. Ao analisar essas detecções, foi possível observar que o sexo feminino foi responsável por 66,0% (35/53) e a faixa etária entre 30-59,9 anos predominou em 49,0% (26/53) delas. A infecção foi detectada desde o dia 1 (após início da doença) até o dia 9, sendo que 68,0% desses (36/53) estavam no período compreendido entre 6 -10 dias de sintomas. A mediana das idades foi de 41,7 anos e a do período de sintomas foi de 6 dias. (Tabelas 18 e 19) (Gráfico 13).

Tabela 18 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas de pacientes do estudo com CHIKV⁺ por qRT-PCR, Ceará, 2017 (N = 53).

qRT-PCR CHIK ⁺	Frequência	(%)
Sexo		
Masculino	18	34,0
Feminino	35	66,0
Período de Sintomas		
<6 dias	17	32,1
Entre 6-10 dias	36	67,9
Faixa Etária (anos)		
< 6	2	3,8
6-12,9	1	1,9
13-29,9	15	28,3
30-59,9	26	49,0
≥ 60	9	17,0
Total	53	100,0

Fonte: Elaborada pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. (+) detectável.

Tabela 19- Média e mediana das idades e tempo de sintomas relatados na coleta dos pacientes do estudo com CHIKV⁺ por qRT-PCR, Ceará, 2017 (N = 53).

Variável	Média	DP	P 50	P 25	P 75	IQR	Min	Max	N
Idade	40,0	18,4	41,7	22,4	55,2	32,8	5,2	76,7	53
Sintomas	5,9	1,7	6	5	7	2	1	9	53

Fonte: Elaborada pela autora

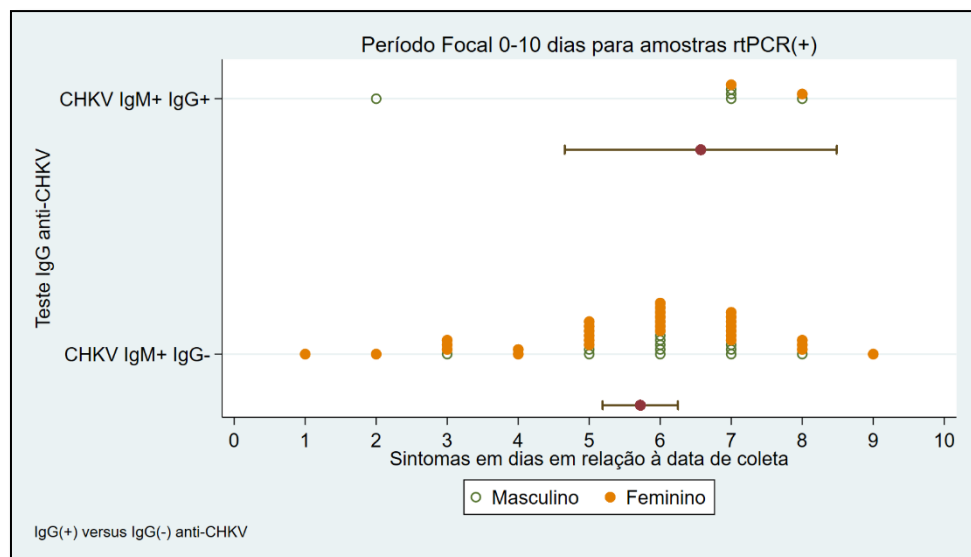
Gráfico 13 – Resultados de qRT-PCR CHIKV de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017(N=359).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise. Mann-Whitney $p=0.4256$

Os resultados de qRT-PCR CHIKV e comparados ao perfil IgM/IgG anti CHIKV mostrou que a maioria das amostras com qRT-PCR CHIKV detectadas ainda não tinham o Ac IgG presente. E que houve variação na média e na mediana de dias de sintomas nos dois perfis. (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Resultados de qRT-PCR CHIKV⁺ e IgM/IgG anti CHIKV, de acordo com o sexo e período de sintomas, Ceará, 2017 (N=53).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise.

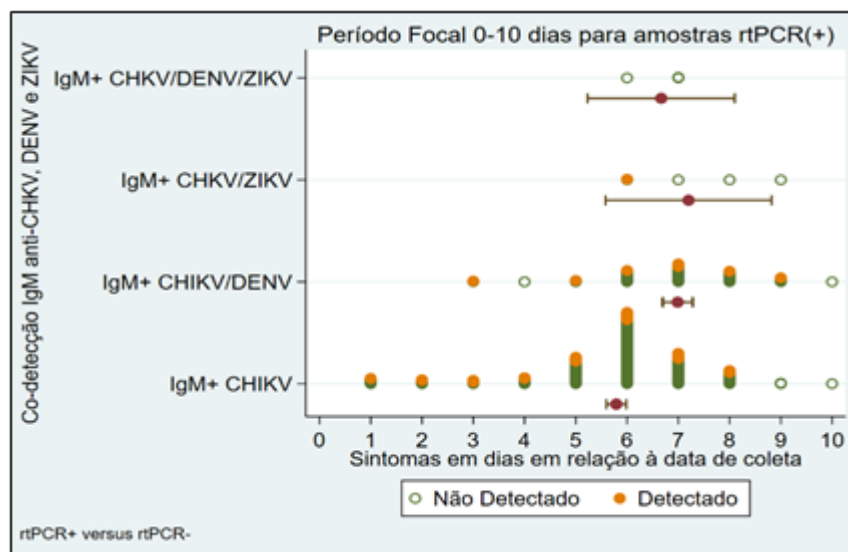
Comparando os resultados da detecção molecular com os demais resultados de sorologia, identificou-se que tanto nas monodetecções quanto nas codetecções houve a ocorrência de positividade na qRT-PCR, porém com frequências variadas. A detecção na qRT-PCR foi observada em 77,3% (41/53) pacientes com monodetecção sorológica e em 22,7% (12/53) nas codetecções entre CHIKV/DENV e CHIKV/ZIKV, não sendo observado na tripla detecção. (Tabela 20) (Gráfico 15).

Tabela 20 – Resultado de qRT-PCR CHIKV⁺ e detecções IgM anti CHIKV/DENV/ZIKV, NS1-DENV, pacientes do estudo, Ceará, 2107 (N=53).

RT-PCR CHIKV +	Frequência	(%)
IgM anti CHIKV ⁺	41	77,3
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ⁺ /NS1 DENV ⁻	8	18,9
IgM anti CHIKV ⁺ /ZIKV ⁺	2	3,8
IgM anti CHIKV ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	0	0
IgM CHIKV ⁺ / DENV ⁻ / NS1 DENV ⁺	2	0
Total	53	100,0

Fonte: Elaborada pela autora

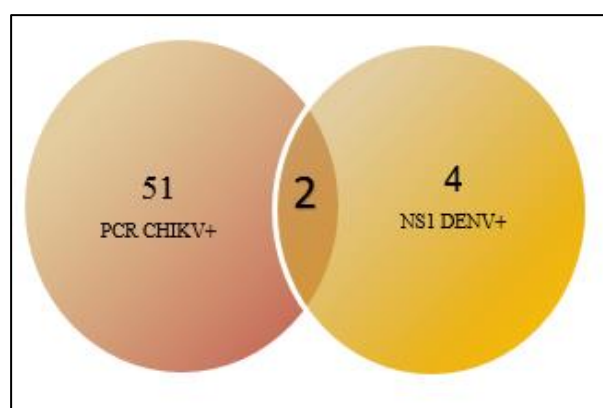
Gráfico 15 - Perfil de codetecções entre IgM CHIKV, DENV e ZIKV com detecção de RT-PCT CHIKV, de acordo com o período de sintomas, Ceará, 2017(N=359).



Fonte: Elaborado pela autora. Os indeterminados foram excluídos desta análise.

Resultados positivos por qRT-PCR para CHIKV e por NS1-DENV foram observados que 3,8% (2/53) dessas, o que demonstrou a coinfeção entre CHIKV e DENV. Ambos os pacientes com a coinfeção eram do sexo feminino, estavam no 6^o e 7^o dias do início dos sintomas e pertenciam a faixas etárias distintas. (Figura 21) (Quadro 4).

Figura 21 – Interseção dos resultados de qRT-PCR CHIKV⁺ e NS1-DENV⁺ evidenciando a coinfeção CHIKV/DENV, Ceará, 2107.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quadro 4 – Resultados de testes apontando coinfeção entre CHIKV e DENV, relatando IgM e IgG Anti CHIKV/DENV/ZIKV, NS1 e RT-PCR para CHIKV, de acordo com o sexo e dias de sintomas na população em estudo, Ceará, 2017.N=2

CÓD. ID.	IgM C	IgM D	IgM Z	IgG C	IgG D	IgG Z	NS1 D	PCR C	Sint. dias	Idade anos	Sexo
MDB 4699	+	+	-	-	-	-	+	+	6	5,5	F
MDB 4701	+	+	-	-	-	-	+	+	7	17,8	F

Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: COD ID (identificação da amostra); sint (sintomas); (C) CHIKV; (D) DENV;(Z) ZIKV; (F) Feminino.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou uma investigação conduzida com o “N” amostral final de 359 participantes, o que é relevante quando se compara a outros estudos nacionais e internacionais, que envolvem análises sorológicas e moleculares em todas as amostras como os estudos de Suwanmanee et al. (2018), Pessoa et al. (2016) e Cabral-Castro et al. (2016). Contudo, este estudo se diferencia dos demais por ter amostras recrutadas de uma soroteca, com um diagnóstico primário já estabelecido, enquanto a maioria dos outros estudos avaliam pacientes com doença febril, com suspeita arboviral, como foram os estudos de Mercado-Reyes et al. (2018), Waggoner et al. (2016); Carrilo-Hernández et al. (2018); Pessoa et al. (2016) e Silva et al. (2019) que investigaram os mesmos três arbovirus aqui pesquisados.

Neste estudo foi evidenciado o predomínio do sexo feminino (64,9%) e de adultos na faixa etária entre 30 e 59,9 anos (49,6%). Esses resultados corroboram com os dados gerais da epidemia de 2017 no Ceará, apresentados pela Secretaria de Saúde do Estado, onde 62,0% dos casos confirmados de chikungunya eram do sexo feminino e 66,0% estavam distribuídos na faixa etária entre 20-59 anos. O estudo também corrobora com os achados de Beltrán-Silva et al. (2016) em um estudo no México onde pesquisou os mesmos 3 arbovírus. Suwanmanee et al. (2018) na Tailândia, Mercado-Reyes et al. (2018) na Colômbia e Waggoner et al. (2016) na Nicarágua também avaliaram os mesmos três arbovírus e tiveram como resultado em seus estudos o predomínio do sexo feminino e de faixa etária semelhante a apresentadas neste estudo, assim como Caron Mélanie et al. (2012) na África que avaliou CHIKV e DENV. No Brasil, Silva et al. (2019) estudando a cocirculação desses arbovírus também relataram o predomínio do sexo feminino e faixa etária compatível, mas com pequena variação. No Ceará estudos recentes apontam para achados similares no tocante a sexo e faixa etária, segundo Simião et al. (2019).

Outros estudos também referem predomínio do sexo feminino na infecção pelo CHIKV, não que o organismo feminino apresente diferenças imunológicas que o torne mais propenso, mas sim devido aos tipos de atividades e diferentes comportamentos de vestuário feminino, permitindo assim uma maior acessibilidade aos vetores. Por outro lado, um estudo transversal em Mayotte constatou a soroprevalência de CHIKV maior em indivíduos do sexo masculino (SISSOKO et al., 2008). Antônio et al. (2019) também referiram em sua população de estudo uma pequena divergência, com predomínio do sexo masculino. Relatos semelhantes

foram descritos com o vírus da dengue, que compartilha vetores comuns e mostra uma dinâmica de transmissão relativamente semelhante à infecção por CHIKV (SISSOKO et al., 2008).

Alguns estudos indicam que, apesar do CHIKV afetar ambos os sexos, o sexo feminino é um fator de risco para o agravamento e persistência das dores articulares (ESSACKJEE et al., 2013, BRASIL/MS, 2014). A inconsistência no predomínio de um determinado sexo como fator de exposição à infecção viral pode estar relacionada a diferentes estilos de vida e comportamentos em diferentes países ou comunidades (VAN GENDEREN et al., 2016); todavia, outros estudos que apontam a diferença percebida entre os sexos com predomínio quase que geral do sexo feminino, fazem referência aos cuidados com a saúde associados à prevenção, levando a crer que os serviços de saúde costumam ser mais procurados por mulheres, pela percepção que estas possuem de seu papel no processo saúde/doença. (LEVORATO et al., 2014).

Estudos realizados por Sissoko, et al. (2008) e Kajeguka, et al. (2016) não demonstraram diferenças na frequência de anticorpos anti CHIKV nas diversas faixas etárias. Entretanto, Manimunda et al. (2010) e Taraphdar et al. (2012), ambos na Índia e Garay-Morán et al. (2017) e Méndez et al. (2017) no México demonstraram que a chikungunya era mais prevalente em adultos do que em pessoas mais jovens. Estes dados corroboram com estudos anteriores de Borgherini et al. (2008) que indicam predominância de adultos na população afetada por CHIKV durante a epidemia da Ilha da Reunião em 2006.

Uma das maiores preocupações da chikungunya nessa faixa de idade é o impacto social e econômico significativo que ela acarreta, levando em conta que os indivíduos incluídos nessa faixa etária estão na idade produtiva e economicamente ativa e que por conta das complicações, muitas vezes incapacitantes, da chikungunya podem diminuir ou perder a capacidade de produção individual ou ainda ter um alto índice de absenteísmo laboral (SILVA et al., 2018). Todavia, apesar da faixa etária entre 30-59,9 anos ter sido a mais frequente, a soropositividade para IgM anti CHIKV esteve presente em todas as faixas etárias desse estudo. Esse achado apoia a hipótese de que a imunidade de base para a infecção por CHIKV estava ausente nesta população.

Quanto a distribuição geográfica, esse estudo contemplou amostras oriundas de 46 municípios cearenses, sendo o município de Fortaleza responsável pela maioria dos casos de IgM anti CHIKV. Foi possível observar um padrão de soropositividade compatível com os dados fornecidos pela Secretaria do Estado do Ceará (CEARÁ, 2017), que apontou o município de Fortaleza como apresentando incidência maior que 1000 casos por 100 mil habitantes. (CEARÁ, 2017). O fato da amostragem estudada não ter contemplado todos os 184 municípios

que compõem o estado do Ceará pode ser justificado em virtude da descentralização do diagnóstico de alguns agravos (incluindo a sorologia para as arboviroses) para a rede de laboratórios regionais do estado. Desta forma, alguns municípios cearenses encaminhavam suas amostras destinadas ao diagnóstico arboviral, para os Laboratórios Regionais situados nos municípios de Juazeiro do Norte, Icó, Tauá, Crato e Senador Pompeu.

CHIKV, DENV e ZIKV compartilham do mesmo vetor, podendo assim deflagrar a cocirculação em uma região. Além disso, esses vírus cocirculantes também causam sintomas clínicos semelhantes em hospedeiros humanos. Sendo este o cenário apresentado, é fundamental testar os pacientes suspeitos de qualquer uma dessas infecções para os três arbovírus, objetivando o manejo adequado do paciente. Dessa forma, os dados desse estudo demonstraram valores marcantes de soropositividade para os três arbovírus pesquisados na população testada, refletindo o contexto epidemiológico no qual está inserida.

Levando em conta a positividade de IgM anti CHIKV em toda a população do estudo, foi observado uma maior frequência desta nas amostras que estavam entre o 5^o e o 7^o dia de sintomas. Este achado encontra consistência na literatura, de acordo com o preconizado no Manejo Clínico para CHIK publicado pelo Ministério da Saúde em 2017 que, embora considerando o aparecimento da IgM anti CHIKV a partir do 2^o dia do início dos sintomas, sugere que para essa investigação sorológica a coleta seja realizada a partir do 5^o dia (BRASIL, 2017).

Foi evidenciado que 29,2% (105/359) dos pacientes desse estudo mostraram positividade concomitante para IgM e IgG anti CHIKV. O IgG foi detectado precocemente, aparecendo em 20% (21/105) das amostras com menos de 6 dias de sintomas, constituindo uma janela de oportunidade para detecção deste anticorpo, contudo, a maior frequência foi observada nas amostras entre o 6^o e 7^o dia de sintomas. Esse achado corrobora com os de Antonio et al., 2019, que em um estudo realizado em Moçambique, entre 2009-2015, demonstraram a frequência de 17,9% (152/895) de anticorpos IgG do CHIKV encontrado na população de seu estudo, porém, foi superior aos relatados em outros dois estudos realizados na Tanzânia, um em 2013 com frequência de 1,6% (CHIPWAZA B, et al., 2018) e outro 2013–2014, com frequência de 3,7% (KAJEGUKA, D.C et al., 2016). As possíveis razões para essas diferenças podem ser devido a variações geográficas, diferenças na amostragem e na sazonalidade (ANTONIO et al., 2019).

Esse estudo também encontra apoio em um outro desenvolvido na Malásia por Chua CL et al. (2017), onde foi demonstrado que entre os dias 4 e 10 do início da infecção houve variação individual nos achados de IgM e IgG, com alguns pacientes exibindo IgM predominante e outra

parte deles tendo predomínio de IgG. Esses achados encontram fundamentação nos dados do CDC e OPAS, que apontam para o aparecimento de IgG Anti CHIKV entre 6^o e 7^o dia do início dos sintomas. Fato observado pelo Ministério da Saúde no Brasil, que preconiza a realização da sorologia para detecção de Ac IgG contra CHIKV a partir do 6^o dia do início dos sintomas (BRASIL, 2017). Levando-se em conta a natureza desse estudo, que contou com amostras “de conveniência”, a maior quantidade de amostras analisadas estava de acordo com essa condição.

As codetecções foram achados relativamente comuns. Em aproximadamente 1 a cada 4 amostras analisadas (24,8%, 89/359) foi observado codetecção de IgM anti CHIKV com as outras arboviroses estudadas. Dentre as codetecções, as ocorridas entre CHIKV/DENV apresentaram a maior frequência, sendo responsáveis por 88,8% (79/89) do total. Codetecções entre esses arbovírus (CHIKV/DENV) já foram descritas anteriormente. Mukherjee et al. (2017) avaliaram pacientes para entender a dinâmica da transmissão entre CHIKV-DENV em surtos ocorridos em Bengala Ocidental (Índia), observando um padrão de infecção para esses dois arbovírus; Omarjee et al, (2014) na França estudaram uma população submetida a surto concomitante de dengue e chikungunya, mais especificamente em Saint Martin. Afreen et al. (2014) estudando a caracterização molecular de CHIKV e DENV numa população em Nova Delhi também observaram a codetecção entre esses dois arbovírus e Suwanmanee et al. (2018) na Tailândia, monitorando os mesmos três arbovírus aqui estudados, encontraram na população investigada 3,89% de codetecção entre CHIKV e DENV, uma proporção menor em relação a este estudo. Magalhães et al. (2017), em Recife-PE (Brasil) também identificaram coinfeção entre CHIKV e DENV.

Sendo o Ceará um estado endêmico para dengue, possuindo vetor competente e população suscetível, era provável que, com a introdução do CHIKV, casos de codetecção entre esses arbovírus fossem encontrados no cenário epidemiológico de 2017, que contou com 25.012 casos confirmados de dengue e 105.232 de chikungunya, segundo boletim epidemiológico da SESA-CE. Todavia uma hipótese a ser também considerada é a de infecção subsequente, ou seja, do indivíduo ter sido infectado primeiramente por um desses arbovírus e posteriormente pelo outro.

Os municípios que apresentaram maior frequência de codetecções entre CHIKV/DENV foram os mesmos que apresentaram maior frequência na sorologia IgM anti CHIKV reagente, o que corrobora com dados da epidemia (CEARÁ, 2019). Porém, em 4 municípios (Itapipoca, Iruçuaba, Quixeré e Crateús) foi observado um incremento quando comparamos os resultados das sorologias IgM anti CHIKV reagente com a codetecção entre CHIKV/DENV.

Avaliando os resultados encontrados na investigação sorológica para o perfil IgM/IgG anti DENV, observamos que 15,5% (53/341) não apresentaram nenhuma imunidade a este arbovírus, estando essa população extremamente vulnerável a doença. Em contrapartida, 1,5% (5/341) apresentaram positividade somente no IgM anti DENV, sugerindo uma infecção primária por este vírus. Esse achado pode ser validado se levarmos em conta os 25.012 casos confirmados de dengue no estado em 2017 (CEARÁ, 2018). Por outro lado, a maioria, 61% (208/341), apresentou somente o IgG reagente, apontando uma infecção prévia por DENV e 22% (75/341) apresentaram positividade tanto para IgM como para IgG, sugerindo uma infecção secundária por este arbovírus. No total, a IgG Anti DENV foi identificada em 82,6% (285/345) das amostras investigadas. Inquéritos realizados sobre dengue demonstram variadas soroprevalências. Teixeira et al. (2002) em Salvador-BA demonstraram 68,7%, Vasconcelos et al., (1998) e Pires et al., (2015) demonstraram 44,0% e 67,4% respectivamente em Fortaleza-CE, Vasconcelos et al. (1999) encontraram 41,5% em São Luis-MA. Ganeshkumar et al. (2018) em um estudo de metanálise na Índia, identificaram entre os pacientes confirmados laboratorialmente 56,9% de positividade no IgG anti DENV.

Os resultados desse estudo encontram apoio em Cavalcanti et al. (2018), que, na sua pesquisa sobre os trinta anos de dengue no Ceará relatam a notificação de casos dessa arbovirose no estado desde 1986 e referem a alternância entre períodos endêmicos e epidêmicos da doença, registrando um histórico de 14 epidemias, sendo a última em 2016. Leva-se em conta ainda que no Ceará os 4 sorotipos da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) já foram identificados, que a infecção por um sorotipo não confere imunidade ao outro e que entre 2011 e 2012 o DENV-4 foi o responsável por epidemias na maioria dos estados, coincidindo com a circulação simultânea dos quatro sorotipos no território brasileiro, sendo este isolado pela primeira vez no Ceará em 2011 durante uma epidemia de DENV-1 (RAMALHO et al., 2018).

As codeteccões entre CHIKV/ZIKV foram verificadas em 7,9% (7/89) dentre todas as do estudo. As associações entre esses arbovírus também foram evidenciadas nos estudos publicados por Cabral-Castro et al. (2016), porém não utilizaram ensaios sorológicos. Magalhães et al. (2017) investigando população febril em Recife, identificaram a codeteccão entre CHIKV e ZIKV. Mercado-Reyes et al. (2018) na Colômbia, Waggoner et al. (2016) na Nicarágua, Suwanmanee et al. (2018) na Tailândia e outros encontraram associação entre esses dois arbovírus, contudo, a maioria deles não refere o teste sorológico, utilizando quase exclusivamente a detecção molecular (PCR ou RT-PCR). No Brasil, no período de epidemia de Zika, o diagnóstico era restrito a testes moleculares e aplicados a casos suspeitos de gestantes

e neonatos. Os testes sorológicos IgM anti ZIKV só foram disponibilizados pelo M.S em 2017 (BRASIL, 2017).

Em 2017, o Ceará notificou 3.495 casos de Zika, dos quais 581 foram confirmados clínico epidemiológico e/ou laboratorialmente e a confirmação laboratorial se deu em sete municípios do estado (Ceará, 2017). Esse dado reforça o índice da codeteccção encontrado nesse estudo.

A IgG anti ZIKV foi identificada em 49,3% (177/359) de todas as amostras investigadas. Percebe-se aqui uma diferença entre a soroprevalência de Zika aqui reportada e os 2.343 de casos confirmados com taxa de incidência (por 100 mil habitantes) de 26,1 no ano de 2016 e 571 casos confirmados com taxa de incidência (por 100 mil habitantes) de 6,4 em 2017 (CEARÁ, 2018). Inquéritos com ZIKV também demonstram oscilações de soroprevalência. Um estudo realizado na Polinésia Francesa entre 2014-2015 demonstrou soroprevalência de 49% (AUBRY et al., 2017), Zambrana et al. (2018) encontraram uma soroprevalência de 36% em crianças e 56% em adultos, em inquérito realizado na Nicarágua, após epidemia ocorrida em 2016. No Brasil, em Salvador, foi observada uma soroprevalência de 63,3% em 2016, uma prevalência considerada bastante elevada (NETTO et al., 2017).

Provavelmente este fato se deva não só à proporção de casos assintomáticos, mas também a subnotificação de casos sintomáticos principalmente pela ausência de testes sorológicos que não eram disponibilizados durante a epidemia de Zika no Ceará, ficando o diagnóstico laboratorial a cargo dos testes moleculares e em um grupo específico. Contudo não se deve excluir a possibilidade de reação cruzada entre ZIKV e DENV nos testes sorológicos, devido a semelhança estrutural e sequencial entre esses flavivírus (PRIYAMVADA et al. 2016). Porém, Steinhagen et al. (2016), em um estudo para avaliação de teste comercial para diagnóstico sorológico de Zika (EURIMUNN), encontrou dentre as amostras confirmadas para ZIKV e coletadas após 6 dias do início dos sintomas, a sensibilidade de 88,2% (95% IC: 64,4 a 98,0) para ELISA IgG. Entre todas as amostras testadas referentes a outros patógenos, possível reação-cruzada ocorreu em 0,4% (95% CI: 0 a 2,4) para IgG. Não foi detectada reação-cruzada em amostras com altos títulos de anticorpos para DENV.

A tripla deteccção foi constatada em 3,4% (3/89) dentre as codeteccções encontradas, entretanto, em nenhuma delas houve a deteccção viral. A tríplice circulação viral (CHIKV/DENV/ZIKV) é mencionada em vários estudos, como os de Magalhães et al. (2017) no Brasil, Suwanmanee et al. (2018) na Tailândia, Carrilo-Hernández et al. (2018) na Colômbia-Venezuela, Mercado-Reyes et al. (2018) na Colômbia e Silva et al. (2019) no Brasil, onde os três arbovírus são pesquisados por meios moleculares e/ou sorológicos, porém, a deteccção

sorológica dos três vírus na mesma amostra pouco é documentada, talvez pelo fato de muitos não utilizarem a sorologia IgM anti ZIKV em seus estudos ou por não conseguirem detectar os três anticorpos IgM simultaneamente devido ao momento (precoce) que habitualmente coletam as amostras. Porém, não devemos desconsiderar fatores complicadores do diagnóstico, como, pacientes com infecção recente por dengue ainda com anticorpos IgM circulantes e acometidos por uma infecção por ZIKV ou, pacientes que tenham tido infecção prévia por dengue e a infecção posterior por ZIKV estimulando a produção de anticorpos IgM contra DENV (DE FILIPS, 2016) e ainda as possíveis reações-cruzadas entre DENV e ZIKV.

O Ag NS1- DENV foi detectado em 1,7% (6/345) das amostras analisadas. A detecção de NS1 possibilita o diagnóstico precoce da dengue, podendo este ser detectado em amostras (soro, líquido e tecidos) em até 9 dias após o início dos sintomas. Este fato faz do NS1-DENV uma alternativa potencial para a sorologia e a PCR com relação ao diagnóstico desta arbovirose (SIMMONS, 2012) A cocirculação do Zika vírus e do vírus Dengue nas Américas vem causando uma emergência sanitária. Matheus et al. (2016) em seus resultados mostram que os ensaios do antígeno NS1 da dengue ainda são inteiramente apropriados para a vigilância desse vírus, mesmo durante a circulação epidêmica do ZIKV, pois nenhum resultado falso-positivo do teste NS-DENV ocorreu entre as amostras com infecção pelo ZIKV em fase aguda. Lima et al (2019) em estudo na população brasileira verificou que o teste NS1-Dengue foi muito específico para o diagnóstico desta, mesmo na cocirculação com ZIKV, e exibiu uma alta precisão em não detectar infecções por Zika agudo.

Alguns estudos também demonstraram a alta sensibilidade e limitada reatividade cruzada, sugerindo que NS1 pode representar um ensaio diferencial eficiente entre infecções por DENV e ZIKV (STETTLER et al., 2016) pois possuem epítomos específicos de grupo que potencialmente diferenciam esses vírus. O DENV NS1 é um marcador diagnóstico exclusivo para o diagnóstico precoce da dengue em comparação com outros testes, como o MAC-ELISA, por ser detectado no soro do paciente logo após o início dos sintomas (GELANEW, T. & HUNSPERGER, E., 2018; LIMA et al., 2010; LIMA et al., 2019). NS1-DENV foi instrumento de avaliação nos estudos de Afreen et al. (2014) e Mukherjee et al. (2017), ambos na Índia, onde a coinfeção entre CHIKV-DENV foi observada.

Neste estudo, a confirmação molecular para CHIKV, foi demonstrada em 14,8% (53/359) da população analisada. Esses achados corroboram com os de Waggoner et al. (2016) na Nicarágua, que confirmaram 23,3% dos suspeitos de chikungunya, numa população febril com até 6 dias de sintomas; Afreen et al. (2014), na Índia, confirmaram 28,7% de CHIKV por PCR na coorte de pacientes febris. No Brasil, mediante a cocirculação arboviral, Cabral-Castro

et al. (2016) detectaram por PCR 3,3% de CHIKV na população investigada e Silva et al. (2019), confirmou a infecção por CHIKV (PCR) em 16,0% de sua população.

Entretanto, Mercado-Reyes et al. (2018) na Colômbia identificaram 1,7% de CHIKV numa coorte de pacientes febris investigada para os mesmos três arbovírus aqui pesquisados. Nesta população de indivíduos sabidamente positivos para IgM anti-CHIKV, foi fundamental comprovar a infecção viral. Importante ainda foi observar que a detecção molecular de CHIKV ocorreu não somente nas amostras com monodeteccção, mas também foi observada em pacientes com codeteccção entre CHIKV-DENV e CHIKV-ZIKV.

Embora a literatura preconize o período de 1-8 dias da infecção como o indicado e o de 2-5 dias como o ideal para a detecção molecular do CHIKV por PCR (PEELING et al., 2010; BURT et al., 2012; BRASIL, 2017), este estudo, que contou com amostras compreendidas entre 1-10 dias de sintomas (destinadas ao diagnóstico sorológico), identificou 67,9% (36/53) de CHIKV por qRT-PCR nas amostras que estavam no período entre 6-10 dias de sintomas. Tal resultado pode ser atribuído ao quantitativo de amostras que estavam no período maior que 5 dias de sintomas (critério adotado para a pesquisa sorológica); por outro lado, esse dado reforça a persistência da carga viral desse arbovírus em indivíduos que se encontram em um período mais estendido de sintomatologia, como o citado por Souza, 2016, que identificou o RNA viral do CHIKV em pacientes com mais de 10 dias após o início dos sintomas. A persistência do RNA viral e/ou produtos genômicos já foi evidenciada em amostras coletadas após 17 dias de doença (APPASSAKIJ et al., 2013).

Estudos demonstram que a persistência viral está diretamente associada à ineficácia imunológica do hospedeiro e ao escape viral eficiente (HOARAU et al., 2010). Desta forma, estes achados fortalecem ainda a necessidade de uma combinação de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico da fase aguda do CHIKV.

Este estudo demonstrou ainda a coinfeccção entre CHIKV e DENV em 3,8% (2/53) das amostras detectadas por métodos diretos. A detecção do CHIKV foi demonstrada através do qRT-PCR enquanto o DENV foi evidenciado através da detecção do NS1. Coinfecções entre CHIKV e DENV são descritas em outras regiões do mundo. Afreen et al. (2014) e Mukherjee et al. (2017), ambos na Índia, demonstraram a codeteccção entre CHIKV e DENV em 10% e 23% respectivamente dentre as populações estudadas. Caron et al. (2012) no Gabão (África) demonstraram 0,9% de codeteccção entre CHIKV e DENV. Mercado-Reyes et al. (2018) na Colômbia identificaram 8,8% de codeteccção entre CHIKV e DENV. Esta codeteccção foi também observada por Omarjee et al. (2014) na França, por Phommanivong et al. (2016) em Laos (Ásia) e por Carrilo-Hernández et al. (2018) num estudo com pacientes da Colômbia e

Venezuela. No Brasil, essa codeteccção foi descrita por Cabral-Castro et al. (2016) no Rio de Janeiro e por Silva et al. (2019) na Bahia.

A introdução do ZIKV e do CHIKV neste estado que já era endêmico para dengue, acarretou o surgimento de um panorama de tríplice epidemia arboviral. Com este estudo foi possível demonstrar que na epidemia de chikungunya em 2017 neste estado, outros dois arbovírus também circulavam, comprovando assim a cocirculação entre CHIKV, DENV e ZIKV.

Esta situação representa um grave problema de saúde pública, uma vez que a cocirculação dos arbovírus CHIKV, DENV e ZIKV em uma dada região apresenta uma série de desafios, podendo dificultar o atendimento clínico e o diagnóstico laboratorial dos pacientes em razão da sobreposição dos sinais clínicos, principalmente em áreas endêmicas, onde as codeteccções e coinfeccções podem ser bastante comuns, impactando ainda nas ações da vigilância epidemiológica.

A decisão sobre a escolha e/ou combinação de testes para o diagnóstico entre os três arbovírus (BRASIL et al., 2016, GAUTRE & SIMON, 2016) nos leva a sugerir como protocolo, o diagnóstico diferencial nos pacientes com síndrome febril aguda.

Além disso, estudos sugerem que a rápida propagação de arbovírus em uma população sem imunização pode resultar em uma maior ocorrência de coinfeccções, que favorecem a evolução da genética, infectividade e patogenicidade viral (CARON et al., 2012).

As evidências de codeteccção entre CHIKV-ZIKV e principalmente entre CHIKV-DENV neste estudo foram de grande relevância, todavia, a identificação da coinfeccção entre CHIKV-DENV merece destaque entre os resultados, pela comprovação da circulação desses arbovírus na epidemia considerada de chikungunya.

Sendo assim, outras pesquisas devem ser conduzidas para avaliar a gravidade da doença em pacientes coinfectados, para melhor compreender o impacto potencial na saúde pública e as consequências das coinfeccções encontradas durante a cocirculação dos três arbovírus, bem como para aprimorar o desenho de melhores estratégias de prevenção e controle de epidemias iminentes e de novas ações de vigilância epidemiológica em regiões endêmicas/epidêmicas para estes vírus.

Por se tratar de um estudo baseado em amostras de conveniência, este trabalho apresentou como limitação a falha nas informações clínicas detalhadas dos pacientes, muitas vezes por fragilidade no preenchimento das fichas de notificação. Essa é uma limitação comum nos estudos que utilizam dados secundários, fato que não pode deixar de ser mencionado.

Contudo, não interfere na importância dos achados apresentados, principalmente diante da magnitude dos números avaliados.

Ressalta-se que as amostras que compuseram este estudo foram bem documentadas e acondicionadas durante todo este período, constituindo assim um valioso acervo científico para estudos retrospectivos, sendo representativa da primeira grande epidemia de chikungunya registrada no Ceará, onde a grande maioria da população era imunologicamente “naïve” para CHIKV. Este fato aliado ao tamanho do “N” amostral, as diferentes sorologias realizadas e aos testes moleculares executados em todas as amostras para os três vírus constituem os pontos fortes deste estudo.

7. CONCLUSÃO

- Os resultados do estudo confirmaram a cocirculação de CHIKV, DENV e ZIKV na epidemia de chikungunya no Ceará em 2017, sendo demonstrada a ocorrência de coinfeção entre CHIKV e DENV e codetecção entre CHIKV, DENV e ZIKV;
- O perfil sócio demográfico desse estudo foi caracterizado com predomínio de casos provenientes do município de Fortaleza, do sexo feminino e da faixa etária compreendida entre 30 a 59,9 anos, com média de idade de 38,1 anos;
- As frequências calculadas para a positividade de IgM anti DENV e IgM anti ZIKV foram respectivamente de 22,8% e 2,8%. Em ambas a maior frequência foi encontrada nas amostras que estavam entre 6^o e 10^o dias de sintomas;
- Codetecções entre os três arbovírus foram comprovadas, sendo a maior frequência encontrada entre CHIKV e DENV com 88,8%. A codetecção entre CHIKV e ZIKV foi confirmada em 7,8% e a tripla detecção (CHIKV, DENV e ZIKV) em 3,4% dentre todas.
- A positividade para o IgG anti CHIKV foi demonstrada em 29,9% das amostras analisadas, sendo detectadas precocemente em 20% das que estavam com menos de 6 dias do início dos sintomas
- A positividade demonstrada para o IgG anti DENV e IgG anti ZIKV foi de 82,9% e 50,6% respectivamente;
- A detecção molecular por qRT-PCR para CHIKV se deu em 14,8% das amostras positivas por sorologia IgM;
- Das amostras com a carga viral detectada para o CHIKV 67,9% estavam compreendidas no período entre o 6^o e o 10^o dia de sintomas, 66% eram do sexo feminino e 49% estavam na faixa etária compreendida entre 30 e 60 anos incompletos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Técnicas de laboratório comumente utilizadas em imunologia. In. Imunologia celular e molecular. 7^o ed. Saunders: **Elsevier**, 2012, p. 513-525.

AKHRYMUK I, KULEMZIN SV, FROLOVA EI. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. **J Virol**. 2012;86(13):7180–7191

ALBUQUERQUE IGC et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2012; 45:128-9.

ALI OU ALLA S, COMBE B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**. 2011;25(3):337-46.

ALONSON-PALOMARES, L. A. et al. Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Intervirology**, p.1–10,2019.

ANTONIO VS, AMADE NA, MUIANGA AF, ALI, MONTEIROV, MULA F, et al. (2019) Retrospective investigation of antibodies against chikungunya vírus (CHIKV) in sérum from febrile patients in Mozambique, 2009–2015: Implications for its prevention and control. **PLoS ONE** 14(3).

APPASSAKIJ H, KHUNTIKIJP, KEMAPUNMANUS M, WUTTHANARUNGSAN R, SILPAPOJAKUL K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion**. 2013;53(10pt2):2567-74.

ARANKALLE, V. A. *et al.* Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967-1976, 2007.

ARAÚJO, F.M.C *et al.*, First documented cases of Zika vírus infection in Ceará, Brazil. 5th Pan-American Dengue Research Network Meeting Panamá. N. 5, 2016, Panamá City. Anais. ARPINO, C.; CURATOLO, P.; REZZA, G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 3, p. 121-129, 2016.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

AUBRY, M. et al. ZikaVirus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, 2017

BALE, J. F. Virus and Immune-Mediated Encephalitides: Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. **Pediatric Neurology**, v. 53, p. 3-12, 2015.

BANDYOPADHYAY D, GHOSH SK. Mucocutaneous features of Chikungunya fever: a study from an outbreak in West Bengal, India. **International Journal of Dermatology**. 2008;47(11):1148-52.

BELTRÁN-SILVA, SL. Et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Rev Med Hosp Gen Méx**. 2018;81(3):146-153

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401-1407, 2007.

BORGHERINI G, et al., Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: A study of 88 adult patients on Reunion Island. **Clinical Infectious Diseases**. 2008;47(4):469-75.

BRASIL. Ministério da Saúde. Chikungunya: Manejo Clínico – 2 edição. Brasília. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS. Brasília:Ministério da Saúde, 2017.136 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**; v.2/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento daEpidemiologia em Serviços. –1. ed. atual. –Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. Preparação e resposta à introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. Brasília 2014. 100 p. 29

BRASIL. Portaria N^o 2031/GM de setembro de 2004. **Dispõe sobre a organização de Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública**. 2004.

BRASIL P. et al., Zika Virus outbreak in rio de janeiro, brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2016;10(4).

BROGUEIRA, P.; MIRANDA, A. C. Vírus Zika: Emergência de um Velho Conhecido. **Medicina Interna**, Lisboa, v. 24, n. 2, p. 146-153, jun.2017.

BROUARD, C. et al. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. **Transfusion**, v. 48, n. 7, p. 1333-1341, 2008.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

BURT, F. J. Chikungunya virus: na update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Lancet Infect. Dis** 2017Apr; 17(4): e107-17.

CABRAL-CASTRO, MJ, CAVALCANTI.; et al. Molecular and serological techniques to detect cocirculation of DENV, ZIKV and CHIKV unsuspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology** 2016; 82:108-11.

CALISHER, C. H. Evolutionary, ecological and taxonomic relationships between arboviruses of Florida, U.S.A., and Brazil. **In: An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries.** Instituto Evandro Chagas, p. 32-41, 1998.

CAREY, D.E. Chikungunya and dengue: A Case of Mistaken Identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences.** 1971; XXVI (3):243-62.

CARMONA, R. J.; SHAIKH, S.; KHALIDI, N. A. Chikungunya Viral Polyarthrits. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. 935-936, 2008.

CARRILLO-HERNANDÉZ, M.Y *et al* Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuel na border. **BMC InfectDis.** 2018;18(1):61.

CARON, M. et al. Recent introduction and rapid dissemination of chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, Central Africa, **Clinical Infectious Diseases**, V. 55, n. 6, p.45-53, 2012.

CASSEB, A. R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia Brasileira. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CASTRO, A. P. C. R; LIMA, R. A; NASCIMENTO, J.S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Rev Dor.** São Paulo,17(4):299-302,2016.

CAVALCANTI, L. P. G. et al. Trinta anos de dengue no Ceará: história, contribuições para ciência e desafios no cenário atual com tripla circulação de arbovírus. **Journal of Health & Biological Sciences**, Fortaleza, v. 6, n. 1, p. 65-82, 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Geographic Distribution Chikungunya virus 2016.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico** SE 48. 2017;1-13.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico** SE 52 2018. 2019;1-17.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico.** 27 de fevereiro de 2018; 1-16.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico** SE 06. 2019;1-14.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico** SE 29. 2019;1-15.

CEARÁ. Secretaria de saúde do Estado do Ceará. Núcleo de Vigilância Epidemiológica. **Boletim Epidemiológico** SE 36. N 7.10 de setembro de 2020.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177, 2009.

CHARREL, R. N. *et al.* Chikungunya outbreaks-the globalization of vector borne diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 8, p. 769, 2007.

CHIPWAZA B, MUGASA JP, SELEMANI M, et al. Dengue and chikungunya fever among viral diseases in outpatient febrile children in Kilosa district hospital, Tanzania. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014;8(11):10.

CHOMPOOSRI, J. et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2016.

CHOW A, HER Z, ONG EKS, CHEN J-M, DIMATATAC F, KWEK DJC, BARKHAM T, YANG H, RÉNIA L, LEO Y-S, NG LFP. Persistent arthralgia induced by chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Infectious Diseases**. 2011;203(2):149-57.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

COFFEY, L. L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

COFFEY, L. L. et al. Chikungunya virus–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014.

CONWAY, M. J. *et al.* Role of the vector in arbovirus transmission. **Virology**, v. 1, p. 71-88, 2014.

COSTA, M.C.S. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016. **Acta Tropica** (2018).

COURDEC, T. *et al.* Chikungunya virus infection of corneal grafts. **Journal of Infectious Diseases**. 2012;206(6):851-9.

COITURIER, E, *et al.* Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. **Rheumatology**. 2012.

CUNHA RV & TRINTA KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2017 Aug;112(8):523-531.

DA COSTA, A. C. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n.10, p. 1742-1744, 2017.

DASH, M.; MOHANTY, I.; PADHI, S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: do we really need it? **Indian J Med Sci**. 2011;65(3):83-91.

DE FILIPPIS, A.M.B. desafios para diagnóstico laboratorial de dengue, chikungunya e Zika: atualização sobre o diagnóstico laboratorial e por imagem da dengue, chikungunya e Zika, e complicações associadas Brasília, **FIOCRUZ**, 2016

DONALÍSIO, M. R. *et al.* Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 1-6, 2017.

DONALÍSIO, M. R. *et al.* Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283-285, 2015.

DONALISIO, M.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B.V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, p.30, 2017.

ECONOMOPOULOU, A. *et al.* Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v.137, p. 534–41, 2009.

ESSACKJEE K, GOORAH S, RAMCHURN SK, CHEENEESHASH J, WALKER-BONE K. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. **Postgraduate Medical Journal**. 2013;89(1054):440-7.

FARIA, R. N., *et al.* “Epidemiology of chikungunya virus in Bahia, Brazil.” **PLoS currents** vol. 8,2014-2015

FENNER, Frank *et al.* Family and generic names for viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses, June 1974. **Intervirology**, v. 3, n. 3, p. 193-198, 1974.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 233–234, 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FROS, J.J.*et al.*, Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. **J. Virol.** 84 (20), 10877–10887,2010.

FURUYA-KANAMORI, L. *et al.* Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viroses. **BMC Infectious Diseases** 16:84, 2016.

GAEDIGK-NITSCHKO, Kerstin; SCHLESINGER, Milton J. The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. **Virology**, v. 175, n. 1, p. 274-281, 1990.

GALÁN-HUERTA, K.A, *et al.* Chikungunya vírus: A general overview. **Medicina Universitaria** 2015 Sep;17(68):175-183.

GAUTRET P, SIMON F. Dengue, Chikungunya and Zika and mass gatherings: what happened in Brazil, 2014. **Travel Medicine and Infectious Disease**. 2016;14(1):7-8

- GARAY-MORÁN, C. et al. Caracterización clínica y epidemiológica de fiebre chikungunya em México. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, DC, v. 41, p. 1-4, 2017.
- GARDNER J, ANRAKU I, LE TT, LARCHER T, MAJOR L, ROQUES P, SCHRODER WA, HIGGS S, SUHRBIER A. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *Journal of Virology*. 2010;84(16):8021-32.
- GAROFF, H.; SJÖBERG, M.; CHENG, R. H. Budding of alphaviruses. **Virus Research**, v. 106, n. 2, p. 103-116, 2004.
- GASQUE, P. et al. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. **Vector borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 241–9, 2015.
- GELANEW, T. & HUNSPERGER, E. Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against the denguevirus-4 (DENV-4) non-structural protein (NS1). **Virol J**. 15, 30, 2018
- GANESHKUMAR P, MURHEKAR MV, POORNIMA V, et al. Dengue infection in India: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis**. 2018;12(7):e0006618. Published 2018 Jul 16.
- GÉRARDIN, P., et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infect Dis**. 2008; 8:99.
- GÉRARDIN, P., et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Med**. 2008;5(3):e 60.
- GO, Y.Y; BALASURIYA, U.B; LEE, C.K. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **ClinExpVaccine Res**. 2013;3(1):58–77.
- GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J.A; RAMIREZ-ARROYO, G.F. Chikungunya virus: history, geographic distribution, clinical picture, and treatment. **P r Health SCI J** 2018; 37:187-194.
- GRIVARD P, *et al*. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Path Biol (Paris)**. 2007;55(10):490–494.
- GUBLER, D. J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.
- GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13-24, 2001.
- GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, 2015
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature Reviews-Disease Primers**, v. 2, 2016.

HARDY, W. Reef *et al.* Synthesis and processing of the nonstructural lyproteins of several temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. **Virology**, v. 177, n.1, p. 199-208, 1990.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v.370, n. 9599, p. 1644–1652, 2007.

HIGGS, S; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HOARAU, J. J. et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.

HORWOOD, P., et al., The threat of chikungunya in Oceania. **West. Pac. Surveill. Response J.** 4, 8 e10, 2013.

IBGE, Censo Demográfico 2010 àrea territorial brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estimativas da população residente com data de referência de 1 de julho de 2019.

JOHNSON, B.W, RUSSELL, B.J, LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **J Clin Microbiol.** 2005;43(10):4977–4983. 2005.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009.

JULIANO, S. A.; LOUNIBOS, L. F. Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. **Ecology Letters**, v. 8, n. 5, p. 558-574, 2005.

JOSE J, SNYDER JE e KUHN R J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol** 2009 Sep;4(7):837-856.

JUPP PG, KEMP A. What is the potential for future outbreaks of chikungunya, dengue and yellow fever in southern Africa? **S Afr Med J.** 1996; 86:35–37.

KAJEGUKA DC, KAAYA RD, MWAKALINGA S, et al. Prevalence of dengue and chikungunya virus infections in north-eastern Tanzania: a cross sectional study among participants presenting with malaria-like symptoms. **BMC Infect Dis.** 2016; 16:183.

KAM, Y. W. et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p.

KASPRZYKOWSK J.I et.al. Are recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **International Journal of Infectious Diseases** 2020;96 59-581p

KHAN AH, MORITA K, PARQUET MDC, HASEBE F, MATHENGE EGM, IGARASHI A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*. 2002;83(12):3075-84.

KIELIAN, Margaret; REY, Félix A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2006.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. *Chikungunya fever*. **European Journal of Internal Medicine**, 23(4), 325–329, 2012.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 Chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1945-1948, 2008.

LABADIE K, et al., Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**. 2010;120(3):894-906.

LANCIOTTI RS, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. 1992;30(3):545-51.

LANCIOTTI, R.S., et al., Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007, **Emerg. Infect. Dis.** 14(8) 2008;1232-239.

LANCIOTTI, R.S., et al., Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis.** 2007 May; 13(5): 764–767.

LAOPRASOPWATTANA, et al. A. Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: seroprevalence, seroincidence and maternal–fetal transmission, southern Thailand, 2009–2010. **Epidemiology and Infection**. 2016;144(2):381-8.

LENGLET, Y., et al. The maternal-fetal data from *all* available cohorts J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 2006 Oct;35(6):578-83.

LEVORATO, C. D. et al. Fatores associados à procura por serviços de saúde numa perspectiva relacional de gênero. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, 2014.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.

LIMA STS, SOUZA WM, CAVALCANTE JW, *et al.* Fatal outcome of chikungunya virus infection in Brazil [published online ahead of print, 2020 Aug 7]. **Clin Infect Dis**. 2020; ciaa1038. doi:10.1093/cid/ciaa1038

LINDENBACH, B.D; THIEL, H; RICE, C.M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-52.

LIMA, C. T.N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev.Saude Publica**. 2016; 50:36.

LIMA, M., da, R. Q., NOGUEIRA, R. M. R., SCHATZMAYR, H. G. & DOS SANTOS, F. B. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis.** **4**, e738,2010

LIMA, M.R.Q. et al., The inability of a dengue NS1 ELISA to detect Zika infections **Scientific Reports** v.9, issue 1. 2019

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

LOWE. R et al. The Zika vírus epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **Int J Environ Res Public Health.** 2018 Jan 9;15(1):96.

LUM, F-M; NG, L.F.P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research.** 2015; 120:165-74.

MCCANCE, K.L., HUETHER, S.E. Pathophysiology: The biologic basis for disease in adults and children. **Elsevier Health Sciences**, 2014.

MACIEL, I.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.; MARTELLI, C. Epidemiologia e desafios no controle da dengue. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology** v. 37 n.2, p. 111-13, 2008.

MADARIAGA M, TICONA E, RESURRECION C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Braz J Infect Dis.** 2016;20(1):91–98. doi:10.1016/j.bjid.2015.10.004

MAGALHAES T, et al., Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Negl Trop Dis** 2017 (11)

MANSUY, J.M et al. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real time RT-PCR. *Dmb* (2018), doi:10.1016/j.diagmicrobio. 2018.06.019 – IN PRESS

MARTIN, D. A. et al. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1823-1826, 2000.

MATHEUS S, BOUKHARI R, LABEAU B, et al. Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(9):1691-1693. doi:10.3201/eid2209.160725

MÉNDEZ, N. et al. Perfil clinicoepidemiológico de la infección por Chikungunya en casos hospitalarios atendidos en 2015 en Mérida, México. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, DC, v. 41, p. 1-5, 2017.

MERCADO-REYES, M. et al. Dengue, chikungunya and zika vírus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia. **Epidemiology and Infection** 147, e77, 2019.

MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian Journal of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 54, 2010.

MORELI, M. L.; COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2013.

MOTA, M. T. O. et al. Mosquito-transmitted viruses: the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 171, p. 1-13, 2016.

MUKHERJEE S, DUTTA SK, SENGUPTA S, TRIPATHI A. Evidence of dengue and chikungunya virus co-infection and circulation of multiple dengue serotypes in a recent Indian outbreak. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2017;36(11):2273-2279.

MURRAY, N.E.; QUAM, M.B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clin Epidemiol**. 2013; 5:299–309.

NAKKHARA, P. et al. Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 12, p. 789-796, 2013.

NETTO EM, MOREIRA-SOTO A, PEDROSO C, HÖSER C, FUNK S, KUCHARSKI AJ, et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. **MBio**. 2017;8(6).

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.

OLIVEIRA, R.M.A.B.; ARAÚJO, F.M.D.; CAVALCANTI, L.P.G, Entomological and epidemiological aspects of dengue epidemics in Fortaleza, Ceará, Brazil, 2001-2012 **Epidemiol. Serv. Saúde** 27 (1) 15 Fev 2018.

OMARJEE R et al., Importance of case definition to monitor ongoing outbreak of chikungunya virus on a background of actively circulating dengue virus, St Martin, December 2013 to January 2014. **Euro Surveill**. 2014;19

OPAS/CDC. Preparativos e resposta para o vírus de Chikungunya nas Américas. Washington, D.C.: **A OPAS**, 2011.

PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 30-37, 2010.

PESSOA, R et al., Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1 **Medicine** 95(12).

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology version 1; referees: 2 approved, F1000 **Faculty Reviews**, v. 82, p. 1-8, 2016.

PETITDEMANGE C, WAUQUIER N, VIEILLARD V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **J Allergy Clin Immunol**. 2015;135(4):846–855.

POWERS, A.M. Chikungunya. **Clinics in Laboratory Medicine**. 2010;30(1):209-19.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of Chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.

PRAT, C. M. et al. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for Chikungunya virus. **Emerging Infectious Disease**, v. 20, n. 12, p. 2129-32, 2014.

PRESTI, A. L. et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925-932, 2014.

PRIYAMVADA, L.; QUICKE, K. M.; HUDSON, W. H.; et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 28, p. 7852–7, 2016.

PULMANAUSAHAKUL, R. et al. Chikungunya in Southeast Asia: understanding the emergence and finding solutions. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 10, p. e671–e676, 2011.

PAROLA, P. et al. Novel Chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.

PIALOUX G, GAÜZÈRE B-A, JAURÉGUIBERRY S, STROBEL M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **The Lancet Infectious Diseases**. 2007;7(5):319-27.

PIRES, C. L. M. Inquérito Soroepidemiológico da dengue na Regional VI de Fortaleza - Ceará, no período entre outubro de 2013 a abril de 2014. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) -Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

POWERS, A.M. Chikungunya. **Clin Lab Med**. 2010;30(1):209-19.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of Chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2-3, 2008.

- RAJAPAKSE, S.; R, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of Chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89-96, 2010.
- RAMALHO, I.L. et al., Dengue 4 in Ceará, Brazil: characterisation of epidemiological and laboratorial aspects and causes of death during the first epidemic in the state. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p.113, 2018.
- RENAULT P, SOLET JL, SISSOKO D, BALLEYDIER E, LARRIEU S, FILLEUL L, et al. A major epidemic of Chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. **Am J Trop Med Hyg** 2007 Oct;77(4):727-31.
- REZZA, G. et al. Infection with Chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.
- RIBEIRO, B.N.F. Síndrome congênita pelo vírus Zika e achados de neuroimagem. **Radiol Bras** [online]. 2018, vol.51, n.2 [cited 2020-01-26]
- RYMAN, K. D.; KLIMSTRA, W. B. Host responses to alphavirus infection. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 27–45, 2008.
- ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 1955;49(1):28-32.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; ANAYA, J. Impact of emerging arthritogenic arboviruses in Colombia and Latin America. **Revista Colombiana de Reumatología**, v. 23, n. 3, p. 145-147, 2016.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; ANAYA, J. Impact of emerging arthritogenic arboviruses in Colombia and Latin America. **Revista Colombiana de Reumatología**, v. 23, n. 3, p. 145-147, 2016.
- ROUGERON, V. S.*et al.* Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease the emerged to be a new health global risk. **Journal of Clinical Virology**. 2015; 64:144-52.
- RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483-2500, 2015.
- RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p. 130–151, 2012.
- SAHADEO, N.M.H *et al.* Molecular Characterisation of Chikungunya Virus Infections in Trinidad and Comparison of Clinical and Laboratory Features with Dengue and Other Acute Febrile Cases. **PLOS Neglected Tropical Diseases** v.9, n 11, 2015.
- SAHADEO, N S D et al. “Understanding the evolution and spread of chikungunya virus in the Americas using complete genome sequences.” *Virus evolution* vol. 3,1 vex010. 3 May. 2017

- SARDI, S.I *et al.* Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**. 2016;54(9):2348-53.
- SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
- SCHUFFENECKER, I. *et al.* Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M.L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Micro**. 2010;8(7):491-500.
- SILVA MMO, TAURO LB, KIKUTI M, *et al.* Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings From Surveillance for Acute Febrile Illness. **Clin Infect Dis**. 2019;69(8):1353-1359.
- SILVA, N.M. da *et al.* Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, n. 3, e 2017127, 2018^a
- SILVA, T. C. C., *et al.* Aspectos epidemiológicos da Chikungunya no Estado do Espírito Santo, Brasil, 2014 a 2017. *Revista Guará*, v. 6, n. 10, 2018b.
- SILVA LA, DERMODY TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J Clin Invest**. 2017;127(3):737–749.
- SIMIÃO, A. R. Padrão de ocorrência e distribuição espacial da Chikungunya no Ceará, de 2014 a 2018. 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- SIMIAO, Adriana Rocha *et al.* A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 52, e 20190266, 2019.
- SIMON F, *et al.* Chikungunya Infection: An Emerging Rheumatism Among Travelers Returned From Indian Ocean Islands. Report of 47 Cases. **Medicine**. 2007;86(3):123-37.
- SIMMONS, C.P., FARRAR, J.J., NGUYEN V, V., WILLS, B., 2012. Dengue. **N. Engl. J. Med**. 366(15), 1423–1432.
- SISSOKO, D. *et al.* Seroprevalence and risk factors of Chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. **PloS One**, v. 3, n. 8, p. e3066, 2008.
- SOLIGNAT M, GAY B, HIGGS S, BRIANT L, DEVAUX C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**. 2009;393(2):183-97.
- SOURISSEAU, M, *et al.* Characterization of reemerging Chikungunya Virus. **PLoSPathog**. 2007;3(6): e89.

- SOUZA, T.M.A. Vigilância do vírus chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes. 2016. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.
- STORCH, G. Diagnostic Virology. In: D. M. H. Knipe, Peter M. (Ed.). *Fields Virology*: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, 2007. Diagnostic Virology, p.566-604
- STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009.
- STEINHAGEN K, PROBST C, RADZIMSKI C, SCHMIDT-CHANASIT J, EMMERICH P, VANESBROECK M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. **Euro Surveill**. 2016;21(50).
- STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**. 353, 823–6, 2016
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.
- STRAUSS, Ellen G.; STRAUSS, James H. Structure and replication of the alphavirus genome. In: **The Togaviridae and Flaviviridae**. Springer New York, p. 35-90, 1986.
- SUDEEP, A. B.; PARASHAR, D. Chikungunya: an overview. **Journal of Biosciences**, v. 33, n. 4, p. 443-449, 2008.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic Alphaviruses an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.
- SUWANMANEE S, SURASOMBATPATTANA P, SOONTORNWORASIRI N, HAMEL R, MANEEKAN P, MISSÉ D, LUPLERTLOP N, Monitoring arbovirus in Thailand: surveillance of dengue, chikungunya and Zika virus, with a focus on coinfections, **Acta Tropica** (2018)
- TANABE ISB, TANABE ELL, SANTOS EC, et al. Cellular and molecular immune response to Chikungunya virus infection. **Front Cell Infect Microbiol**. 2018; 8:345.
- TEIXEIRA, M.G; BARRETO, M. L GUERRA, Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. **Inf. Epidemiol. Sus**, Brasília, v. 8, n. 4, p. 5-33, dez. 1999
- TEIXEIRA, M. G. et al. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Tropical Medicine and International Health*, v. 7, n. 9, p.757-762, 2002
- TENG, T. S. et al. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. **Future Virology**, v. 6, n. 8, p. 975-984, 2011.

TENG, T. S. et al. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. **Future Virology**, v. 6, n. 8, p. 975-984, 2011.

THIBERVILLE, S.D. et al. Chikungunya Fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res** 2013 Sep;99(3):345-370.

THIBOUTOT MM, KANNAN S, KAWALEKAR OU, SHEDLOCK DJ, KHAN AS, et al. Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic?. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 4(4) 2010

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. **PLOS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. e1002412, 2011.

TSETSARKIN, K.A, *et al.* A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoSPathog.** 2007;3(12): e201.

UCHIME, O. *et al.* The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. **Journal of Virology**, v. 87, n. 18, p. 10255-10262, 2013.

VAN GENDEREN, Farah T. et al. First chikungunya outbreak in Suriname; clinical and epidemiological features. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004625, 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saude Pública**, v. 17 (suplemento), n. 1, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inquérito soro-epidemiológico na Ilha de São Luís durante epidemia de dengue no Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 2, p.171-179, 1999.

VOGELS, C.B.F *et al.* Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? **PLOS Biology** 17(1): 2019

VEGA-RÚA, A. *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **J Virol.** 2014;88(11):6294–6306.

VILLAMIL-GÓMEZ, W.E, et al. AJ. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *Journal of Infection and Public Health.* 2016;9(5):684-6.

VOLK, S. M. *et al.* Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of Virology**, v. 84, n. 13, p. 6497-6504, 2010.

VOSS, JE; et al. “Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography.” **Nature** 468 (7324): 709–12, 2010.

WAGGONER JJ, GRESH L, VARGAS MJ, et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis*. 2016;63(12):1584-1590.

WAUQUIER N, BECQUART P, NKOGHE D, PADILLA C, NDOJOYI-MBIGUINO, LEROY EM. The acute phase of Chikungunya Virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(1):115-23.

WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, v. 130, p. 69-80, 2016.

WEAVER, S. C. et al. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, v. 94, n. 3, p. 242-257, 2012.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research*, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WEAVER, Scott C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 11, n. 9, p. 1087-1101, 2012.

WEAVER, S.C.; LECUIT, M. "Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease". *New England Journal of Medicine* 372 (13): 1231–1239, 2015.

WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva.2013

WIKAN, N. Chikungunya Virus Infection of Cell Lines: Analysis of the East, Central and South African Lineage. *PLoS ONE*. 2012;7(1) :e31102.

ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic Alphaviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 140, n. 3, p. 281-286, 2010.

ZAMBRANA, J. V. et al. Seroprevalence, risk factor, and spatial analyses of Zikavirus infection after the 2016 epidemic in Managua, Nicaragua. *PNAS*, v. 115, n. 37, 2018.

ZELLER H.; BORTEL, W.V.; SUDRE, B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 214, n.5, p. 436-440, 15 Dez 2016.

ZÉ-ZÉ, L. VIROSES TRANSMITIDAS POR MOSQUITOS. In: *Doenças Associadas a Artrópodes Vetores e Roedores*, Lisboa, 2014, cap. II, p. 45-51.