



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL

JOSÉ JOHNATA PAIVA DE MELO

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO MOLECULAR DAS SÍNDROMES FEBRIS ATENDIDAS
EM UMA UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO DE RIO BRANCO, ACRE**

RIO BRANCO - AC

2020

JOSÉ JOHNATA PAIVA DE MELO

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO MOLECULAR DAS SÍNDROMES FEBRIS ATENDIDAS
EM UMA UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO DE RIO BRANCO, ACRE**

Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre, como parte dos requisitos para o Título de Mestre.

Orientadora: Cirley Maria de Oliveira Lobato

RIO BRANCO - AC

2020

**DIAGNÓSTICO CLÍNICO MOLECULAR DAS SÍNDROMES FEBRIS ATENDIDAS
EM UMA UNIDADE DE PRONTO ATENDIMENTO DE RIO BRANCO, ACRE**

JOSÉ JOHNATA PAIVA DE MELO

Defesa de dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental da Universidade Federal do Acre, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental.

Banca Examinadora composta pelos professores:



Profa. Cirley Maria de Oliveira Lobato – CCS/UFAC



Prof. João Rafael Valentim Silva – FIOCRUZ/UNINORTE

- Revisor externo



Profa. Juliana Lourenço Abrantes – CCS/UF RJ

- Revisor externo



Prof. Carolina Pontes Soares – CCS/UFAC - Suplente interno

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

M528d Melo, José Johnata Paiva de, 1986 -

Diagnóstico clínico molecular das síndromes febris atendidas em uma unidade de pronto atendimento de Rio Branco, Acre / José Johnata Paiva de Melo; orientadora: Dr^a. Cirley Maria de O. Lobato. – 2020.

69 f.: il.; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental, Rio Branco, 2020.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. Dengue vírus. 2. Chikungunya vírus. 3. Zika vírus. I. Lobato, Cirley Maria de O. (Orientadora). II. Título.

CDD: 660

*Dedicado à Dona Maria Olivia de Paiva e Seu
Irineu Brito de Moura (in memorian), que não
puderam ver este neto formado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar com o dom da vida, com a sabedoria, com a saúde e pelo fortalecimento nos momentos mais difíceis;

A minha querida mãe, Raimunda Salony de Paiva, que me deu a vida, amor, e exemplo de caráter. As minhas queridas irmãs Olivia e Jhonliane pelo carinho e incentivo. Aos demais familiares e amigos que de forma direta e indireta me ajudaram a vencer as etapas deste desafio;

A minha Profa. Dra. Cirley Lobato pela excelente orientação e pelos ensinamentos tanto de vida pessoal como profissional que irão comigo por toda minha vida. Obrigado pela amizade, carinho, respeito e paciência;

A minha Profa. Dra Carolina Pontes Soares pela amizade, respeito, carinho e paciência nos momentos finais deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Andreas Stocker pela amizade, respeito e paciência no auxílio técnico, principalmente, com etapa de análises laboratoriais das amostras;

Aos Prof. Emmerson Costa e Prof. Orivaldo Florêncio pela contribuição com importantes e enriquecedoras sugestões para o desenvolvimento da dissertação;

Ao Enf. Marcos Malvera pela ajuda com a utilização das ferramentas de estatísticas;

A minha amiga bióloga Jocenete Bessa pela contribuição com a coleta das amostras e das fichas de investigação;

A Pós- Graduação em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental por proporcionar e incentivar os seus alunos a buscar o conhecimento científico;

A Secretária Estadual de Saúde do Acre pela contribuição com informações epidemiológicas de saúde, e

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível,” (Charles Chaplin).

RESUMO

As síndromes febris dengue, chikungunya e zika são consideradas arboviroses que podem ser transmitidas pelo mesmo vetor em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O Dengue vírus (DENV) e Zika vírus (ZIKV) pertencem ao mesmo gênero *Flavivirus*, possuem em sua estrutura genômica um RNA envelopado, em sentido positivo e de fita simples. Adicionalmente, o Chikungunya vírus (CHIKV) é um RNA vírus envelopado, em senso positivo e de cadeia simples, pertencente ao gênero *Alphavirus*. No Brasil o DENV circula desde a década de 80, com surtos anuais facilitado pela circulação de quatro sorotipos (DENV1-4) com infecções, geralmente, sintomáticas podendo evoluir para manifestações hemorrágicas ou neurológicas fatais. O CHIKV foi inserido em 2014 causando epidemias e surtos, de uma doença debilitante podendo cursar em intensa artralgia, enquanto que o ZIKV ficou bastante conhecido depois do surto brasileiro em 2015, estando associado as consequências mais graves da infecção pelo vírus, com a Síndrome de Guillain-Barré e vários casos registrados de microcefalia em neonatos no surto. No estado do Acre há circulação simultânea dos três vírus, com predominância dos sorotipos DENV1-2, e foram registrados alguns casos de coinfeção. Diante deste desafio à saúde pública, este estudo objetivou verificar o diagnóstico clínico e molecular destas síndromes febris atendidas em uma Unidade de Pronto Atendimento de Rio Branco no estado do Acre, no período de dezembro de 2017 a abril de 2018. Foram coletadas 61 amostras de plasma de pacientes com suspeita de infecção por estes arbovírus, posteriormente, foram extraídas e analisadas pela técnicas de RT-rPCR em tempo real, utilizando iniciadores (primers) e sondas que que amplificam a região dos genes de interesse. As manifestações clínicas mostraram que 32 dos 61 pacientes eram do sexo masculino, com mediana de idade de 31 anos, residiam em zona urbana na cidade de Rio Branco. Os sintomas mais frequentes observados nos pacientes foram febre, cefaleia e dor retro orbitária, não houveram sinais de alarme e acometimentos hemorrágicos ou neurológicos. Na observação dos resultados sorológicos para DENV, 29 amostras foram analisadas para pesquisa de AgNS1 6 foram positivas, 20 amostras foram analisadas para detecção de IgM 10 foram positivas. Para CHIKV à pesquisa de IgM 4 amostras foram testadas 1 foi positiva. Houve 1 amostra com coinfeção, e 12 amostras não foram realizadas por inconclusivas. Não foi realizado teste sorológicos para ZIKV. Nos testes moleculares do total de 61 amostras analisadas 10 foram positivas para detecção de DENV (alcance de 0 a 6 dias), não havendo positividade para CHIKV e ZIK (alcance de 0 a 9 dias). O Conjunto de um diagnóstico clínico imediato e um diagnóstico molecular com resultados em um tempo razoável, poderiam auxiliar a vigilância epidemiológica na prevenção e controle de potenciais agravos na comunidade.

Palavras-chave: Dengue vírus, Chikungunya vírus, Zika vírus, RT-rPCR.

ABSTRACT

The febrile syndromes dengue, chikungunya and zika are considered arboviruses that can be transmitted by the same vector in tropical and subtropical regions of the world. The Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to the same genus *Flavivirus*, have in their genomic structure an enveloped RNA, positive sense and simple tape. In addition, the Chikungunya virus (CHIKV) is an enveloped, positive-sense and single-stranded RNA belonging to the *Alphavirus* genus. In Brazil, DENV has circulated since the 1980s, with annual outbreaks facilitated by the circulation of four serotypes (DENV1-4) with infections, usually symptomatic, which can progress to fatal hemorrhagic or neurological manifestations. The CHIKV was inserted in 2014 causing epidemics and outbreaks, from a debilitating disease that could lead to intense arthralgia, whereas the ZIKV became well known after the Brazilian outbreak in 2015, associated with the most serious consequences of the virus infection, with the Syndrome of Guillain-Barré and several reported cases of microcephaly in neonates in the outbreak. In the state of Acre there is simultaneous circulation of the three viruses, predominantly DENV1-2 serotypes, and some cases of coinfection have been reported. Faced with this challenge to public health, this study aimed to verify the clinical and molecular diagnosis of these febrile syndromes treated at a Rio Branco Emergency Care Unit in the state of Acre, from December 2017 to April 2018. A total of 61 samples were collected from Plasma from patients suspected of infection by these arboviruses were subsequently extracted and analyzed by Real-time RT-rPCR techniques using primers and probes that amplify the region of the genes of interest. The clinical manifestations showed that 32 of the 61 patients were males, with a median age of 31 years, living in an urban area in the city of Rio Branco. The most frequent symptoms observed in the patients were fever, headache and retro orbital pain, there were no signs of alarm and hemorrhagic or neurological complications. In the observation of the serological results for DENV, 29 samples were analyzed for AgNS1 6 assay were positive, 20 samples were analyzed for IgM detection 10 were positive. For CHIKV to IgM screening 4 samples were tested 1 was positive. There were 1 samples with coinfection, and 12 samples were not performed by inconclusives. No serological tests were performed for ZIKV. In the molecular tests of the total of 61 analyzed samples 10 were positive for detection of DENV (0 to 6 days), with no positivity for CHIKV and ZIK (range 0-9 days). An immediate clinical diagnosis and a molecular diagnosis with results in a reasonable time, could help the epidemiological surveillance in the prevention and control of potential harms in the community.

Keywords: Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, RT-rPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático da estrutura genômica, processamento de poliproteína e clivagem de proteínas do DENV	21
Figura 2 - Ciclo de replicação do DENV	22
Figura 3 - Ciclos de transmissão do DENV	23
Figura 4 - Immunopatogênese da Infecção secundária da Dengue	25
Figura 5 - Teoria da multicausalidade	25
Figura 6 - Evolução clínica e laboratorial da dengue	27
Figura 7 - Estrutura Genômica do CHIKV	30
Figura 8 - Comparação do perímetro cefálico em recém-nascidos com microcefalia	34
Figura 9 - Métodos de diagnóstico laboratorial.....	38
Figura 10: Dinâmica da resposta na infecção primária e secundária por DENV	39
Figura 11 - Esquema das opções de diagnóstico pela dinâmica da resposta imune.....	41
Figura 12 - Esquema representativo de amostras analisadas por testes sorológicos para pesquisa de AgNS1 e IgM e valores absoluto e relativo de amostras positivas.....	53
Figura 13: Perfil do controle positivo para DENV	55
Gráfico 1 - Número de casos suspeitos de infecção de DENV e CHIKV.....	52
Gráfico 2 - Representação gráfica dos sintomas mais frequentes nos casos suspeitos de infecção por DENV e CHIKV	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial das síndromes febris.....	36
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos principais métodos sorológicos e moleculares.....	40
Tabela 3 - PCR Mix para Chikungunya, Dengue e Zika.....	46
Tabela 4 - Ciclo térmico para reação de PCR de Chikungunya, Dengue e Zika.	47
Tabela 5 - Iniciadores (primers) utilizados na RT-PCR em tempo real	48
Tabela 6 - Quantitativo de fitas encontradas relacionadas ao genoma viral.	49
Tabela 7 - Comparação das características epidemiológicas de pacientes com suspeita clínica de infecção por DENV, CHIKV e ZIKV	51
Tabela 8 - Resultado dos testes de RT-rPCR com positividade quantificada	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aminoácidos

ADE - Potencialização dependente-anticorpo (do inglês “antibody-dependent enhancement”)

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

C - Proteína do Capsídeo

CDC - Agência de Saúde Norte Americana (do inglês “Center of Disease Control”)

cDNA - DNA de fita simples

CHIKV - Chikungunya vírus

DENV - Dengue vírus

DENV-1 - Dengue vírus sorotipo 1

DENV-2 - Dengue vírus sorotipo 2

DENV-3 - Dengue vírus sorotipo 3

DENV-4 - Dengue vírus sorotipo 4

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeo 5'-trifosfato ELISA - Teste imunoenzimático (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”)

E - Proteína do Envelope

FD - Febre do Dengue

FHD - Febre hemorrágica da dengue

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

Kb - Kilobases

KDa - Kilodalton

LACEN-AC - Laboratório Central de Saúde Pública do Acre

M - Proteína da Membrana

NCBI - National Library of Medicine/EAU

Nm - Nanómetro

nsP - Proteína não estrutural (do inglês “Non Structural Protein”)

NS1 - proteína não estrutural 1

NS2A - proteína não estrutural 2A

NS2B - proteína não estrutural 2B

NS3 - proteína não estrutural 3

NS4A - proteína não estrutural 4A

NS4B - proteína não estrutural 4B

NS5 - proteína não estrutural 5

N-terminal - terminal amino

ORF - Fase aberta de leitura (do inglês “Open Reading Frame”)

PAHO - Organização Pan-Americana de Saúde (do inglês “Pan American Health Organization”)

Pb - Pares de base

prM - Proteína pré-Membrana

RE - Reticulo endoplasmático

RNA - Ácido ribonucléico

RT-PCR - Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction”)

RT-rPCR –Reação em cadeia da polimerase da Transcrição Reversa em tempo real (do inglês “Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction real time”)

SCD - Síndrome do choque da dengue

SNC - Sistema Nervoso Central

SL - Haste-alça (do inglês “Stem Loop”)

UTR - Região não codificadora (do inglês “untranslated region”)

UV - Radiação ultravioleta

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês “World Health Organization”)

ZIKV - Zika Vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 VÍRUS DA DENGUE	19
2.1.1 Classificação	19
2.1.2 Estrutura genômica	19
2.1.3 Fisiopatologia e aspectos clínicos da doença	22
2.1.3.1 Vetor	22
2.1.3.2 Ciclo de transmissão	22
2.1.3.3 Patogênese	24
2.1.3.4 Manifestações clínicas	26
2.1.4 Contexto histórico e epidemiológico	27
2.2 VÍRUS DA CHIKUNGUNYA	29
2.2.1 Classificação	29
2.2.2 Estrutura genômica	29
2.2.3 Fisiopatologia e aspectos clínicos da doença	30
2.2.4 Contexto histórico e epidemiológico	32
2.3 VÍRUS DA ZIKA	32
2.3.1 Classificação	32
2.3.2 Estrutura genômica	33
2.3.3 Fisiopatologia e aspectos clínicos da doença	33
2.3.4 Contexto histórico e epidemiológico	35
2.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES	35
2.4.1 Diagnóstico clínico diferencial	35
2.4.2 Diagnóstico laboratorial específico	37
2.4.2.1 Diagnóstico molecular e sorológico	37
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 DESENHO DO ESTUDO	43
4.2 LOCAL DO ESTUDO	43
4.3 PARTICIPANTES	43

4.3.1 Critérios de inclusão	43
4.3.2 Critérios de exclusão	43
4.4 COLETA DE DADOS	43
4.5 COLETA, MANUSEIO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	44
4.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	44
4.6.1 Extração dos ácidos nucleicos.....	44
4.6.2 Detecção pela PCR em tempo real	45
4.7. ANÁLISE DOS DADOS	50
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO	69
QUESTIONÁRIO DA PESQUISA	69

1 INTRODUÇÃO

A maioria das arboviroses constituem grave problema de saúde pública em todo o mundo, principalmente, nas regiões subtropicais e tropicais por oferecem condições ecológicas favoráveis e apresentarem expressividade em morbidade e/ou mortalidade, neste sentido destacam-se, dentre as arboviroses, a dengue, chikungunya e a febre do zika^{1,2,3,4,5}.

O vírus da dengue (DENV) apresenta características antigênicas distintas devido a quatro sorotipos diferentes (DENV 1-4), no entanto, assim como o vírus da zika (ZIKV) pertencem ao mesmo gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae*, seus materiais genéticos são constituídos por uma fita simples de RNA de senso positivo, com aproximadamente 11kb de comprimento. São traduzidos em uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais, a proteína C que constitui o capsídeo que reveste o nucleocapsídeo com forma icosaédrico, a proteína E que forma o envelope estando relacionada com a entrada na célula hospedeira, a fusão lisossomal e a montagem viral, e a proteína prM que é precursora da membrana formando um complexo com a proteína E impedindo a entrada prematura do vírus na célula, e cliva, ainda, mais sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5)^{6,7,8,9,10}.

A glicoproteína E de envelope é composta por três domínios relacionados ao processo de neutralização de diferentes anticorpos específicos e reação cruzada, ao centro da proteína o domínio I (DI) e os domínios II (DII) e III (DIII) subsequentes, que em conjunto com as proteínas de membrana prM desencadeiam a resposta imune do hospedeiro, portanto consideradas as mais imunogênicas^{1,7,8,9}.

Embora muitos estudos descrevam a replicação flaviviral ocorrendo no citoplasma da célula hospedeira, um estudo tem sugerido que o núcleo celular poderia abrigar os antígenos do ZIKV, no entanto, as informações sobre a patogênese, ainda, são pouco conhecidas, acredita-se que repliquem-se ao infectarem células dendríticas e, posteriormente, disseminando-se para os linfonodos, corrente sanguínea, órgãos e tecidos^{11,12,13,14}.

Assim que o sistema imune do hospedeiro reconhece a partícula infectante do DENV, os linfócitos B sofrem diferenciação em células secretoras de anticorpos e linfócitos B de memória. Na primeira infecção os anticorpos IgG neutralizam o sorotipo, garantindo a proteção a longo prazo, ao passo que, em uma segunda infecção, por um sorotipo diferente, reagem, a curto prazo, subneutralizando o antígeno, esse mecanismo é conhecido como reação cruzada, e em alguns casos propicia o agravamento da doença. Estudos apontam que há um aumento considerável de anticorpos IgM e IgG específicos de um Flavivirus reagindo de forma cruzada para outro Flavivirus de um mesmo grupo^{1,6,8,9,15}.

O vírus da chikungunya (CHIKV) é membro da família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, seu é genoma constituído por uma cadeia simples de RNA, de polaridade positiva, com tamanho aproximadamente de 12 Kb. Possui duas Fase de Leitura Aberta (ORF's), a primeira codifica quatro proteínas não estruturais, nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 e, a segunda codifica três proteínas estruturais C, P62 (madura em E2 e E3) e E1 que se associam como um heterodímero, formando um dímero E1/E2 ou um trímero E1/E2/E3. A proteína estrutural C forma o nucleocapsídeo, a E1 realiza fusão das membranas viral e hospedeiro, E2 liga-se ao receptor da célula hospedeira responsável pela diversidade de cepas virais, a E3 participa na montagem das partículas virais e 6k é incorporada durante o brotamento viral^{16,17}.

O CHIKV tem tropismo por fibroblastos da pele, podendo infectar também células dendríticas, macrófagos e monócitos, estas sinalizam ao sistema imune, que libera diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Interferons, Interleucinas e outras) para limitar a disseminação viral. Com o decorrer essas células adentram na corrente sanguínea, propagando-se diferentes tecidos e órgãos, dentre eles, cérebro, fígado, articulações e tecido muscular^{18,19,20}.

No Brasil essa tríade representam um sério problema de saúde pública devido, principalmente, as condições favoráveis para a reprodução do vetor (artrópode do gênero *Aedes*). A transmissão do vírus ocorre durante o repasto sanguíneo, a incubação no vetor dura em média 10 dias, sendo virêmico por toda a vida. O período de incubação no homem infectado por DENV dura em média de 5 a 7 dias do início dos primeiros sintomas, enquanto que, na infecção por CHIKV em média de 3 a 7 dias, e na infecção por ZIKV em média 3 a 6 dias^{1,2,4,5}.

Estudos tem descrito a possibilidade de transmissão do ZIKV por via sexual uma vez que foi encontrado a presença do vírus em fluidos corporais (urina, saliva, sêmem e fluidos vaginais). Também é possível ocorrer transmissão associada a transfusão sanguínea, uma vez que o RNA deste vírus foi detectado em doadores de sangue assintomáticos durante um surto entre 2013 e 2014, na Polinésia Francesa^{21,22,23}.

Em geral essas arboviroses apresentam manifestações clínicas iniciais semelhantes como: febre, cefaleia, dor retro orbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, calafrios, erupção da pele, leucopenia e trombocitopenia. O DENV circula desde a década de 80, com surtos anuais, podendo manifestar-se de forma assintomática ou quando sintomática podendo ser caracterizada em três fases clínicas: a fase febril é conhecida como a febre clássica da dengue (FD), a fase crítica é caracterizada pela febre hemorrágica da dengue (FHD) podendo evoluir para a síndrome do choque da dengue (SCD) e ao óbito se não tratada com rapidez, e a fase de recuperação conhecida como período de convalescência. O CHIKV foi inserido em 2014

causando epidemias e surtos, de uma doença debilitante podendo cursar em intensa artralgia, enquanto que o ZIKV ficou bastante conhecido no Brasil depois do surto em 2015, estando associado as consequências mais graves da infecção pelo vírus, com a Síndrome de Guillain-Barré e vários casos registrados de microcefalia em neonatos no surto^{2,4,5,24,25}.

No estado do Acre há registros da circulação simultânea de DENV1-2, sem confirmação para outro sorotipo, atualmente correm surtos anuais na região principalmente de dengue seguido de casos confirmados de chikungunya, enquanto que em novembro de 2015 foram notificados os primeiros de zika, o que resultou de janeiro a maio de 2016 em 1.269 casos suspeitos de zika²⁶.

Atualmente vacinas e medicamentos antivirais específicos ainda não existem para essas arboviroses, o tratamento é sintomático, com o uso analgésicos e antipiréticos, evitando-se o uso de medicações que contenham salicilatos para evitar a indução hemorrágica^{2,4,26,25}.

Quanto ao diagnóstico laboratorial pode ser realizado por métodos diretos e indiretos. Na fase aguda da doença os métodos diretos são mais eficientes, sendo possível identificar o genoma viral e seus componentes na amostra, tendo maior precisão e especificidade, embora, sejam menos acessíveis a sua realização devido aos altos custos para a realização. Já os métodos indiretos são uteis após o período de viremia, quando o sistema imune do indivíduo já produziu anticorpos IgM ou IgG, estes testes possuem alta sensibilidade e baixa especificidade, sendo mais acessíveis devido ao baixo custo para a sua realização^{2,26,27}.

Dentre as técnicas empregadas destacam-se as técnicas sorológicas e moleculares, entre as mais usadas temos os ensaios imunoenzimáticos para captura de IgM (MAC ELISA) e de IgG (G-ELISA), os testes rápidos imunocromatografos atuam detectando IgM, IgG ou capturando antígeno viral NS1, e para identificação do genoma viral a técnica mais conhecida é a Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR), podendo ser realizada em um formato em tempo real (RT-rPCR) para detectar simultaneamente vários arbovírus, tais como DENV, CHIKV e ZIKV^{28,20,29}.

Os anticorpos IgM podem ser detectáveis no soro ou plasma com 3 a 5 dias do início dos primeiros sintomas, atingindo níveis máximos em 7 a 8 dias, após o sétimo dia ocorre a soroconversão período mais confiável para a detecção de anticorpos, com 1 a 2 meses vai diminuindo a titulação. Enquanto que os anticorpos do tipo IgG podem ser detectáveis em títulos muito baixos a partir de 4 dias, com pico em duas semanas perdurando por 2 a 3 anos após a infecção, o que possibilita a detecção da doença no período de convalescência^{29,30,31,32}.

O Antígeno NS1 está presente na circulação sanguínea desde o primeiro dia de infecção até o início da soroconversão IgM para IgG (em média a soroconversão inicia-se após o sétimo

dia), inclusive durante as reinfecções. O RNA_v pode ser encontrado no período de viremia da doença em média de 0 a 5 dias do início dos primeiros sintomas, na urina permanece por mais de 10 dias e no sêmen por mais de dois meses^{33,34}.

Os métodos sorológicos variam em sensibilidade e especificidade, em regiões endêmicas com circulação simultânea de diferentes arboviroses, podem ocorrer reações cruzadas, obtendo-se vários resultados falso-positivos, sendo necessário outros testes para confirmação. As técnicas moleculares são mais precisas e específicas tornam-se importantes para a detecção confiável^{2,4,29}.

O diagnóstico clínico imediato aliado ao uso de técnicas de diagnóstico molecular preciso e específico podem confirmar definitivamente os vírus e sorotipos circulantes e as regiões endêmicas, auxiliando a vigilância epidemiológica na antecipação de medidas preventivas e de controle de potenciais agravos na comunidade³⁵.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS DA DENGUE

2.1.1 Classificação

Considerado um arbovírus (ARthropod BORne VÍRUS), pois é transmitido por artrópodes, o DENGUE VÍRUS (DENV) pertence à família Flaviviridae e gênero Flavivirus e, há 4 sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e todos podem causar tanto a forma clássica da doença quanto formas mais graves^{8,9,36,37,38}.

A recombinação de genótipos ou subtipos diferentes em um mesmo hospedeiro tem sido registrado em todos os 4 sorotipos e, embora os torne mais eficientes para adaptar-se, não significa que formam quasiespecies, mas sim diversidade genética^{6,7,9}.

Este gênero tem mais de 70 espécies virais distribuídas em todo o mundo, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical podendo causar diversas doenças de forma endêmica, sendo, por tanto, de grande relevância para a saúde pública^{7,8}.

2.1.2 Estrutura genômica

Sua morfologia é esférica com aproximadamente 40-50 nm de diâmetro, o seu genoma possui um nucleocapsídeo icosaédrico composto por um capsídeo (C) envolto por uma membrana lipoproteica (M) derivada da célula hospedeira, com proteínas pré-membrana (prM) e de membrana e do envelope (E). A partícula viral completa tem uma densidade de 1,19 a 1,23 g/ml, podendo ser inativada por radiação ultravioleta (UV), aquecimento a 56° C por 30 minutos ou, ainda, por solventes lipídicos como, éter, ureia, aldeídos, lipases, proteases, clorofórmio e desoxicolato^{1,6,10}.

É constituído por RNA simples de fita única com sentido positivo, com aproximadamente 11 kilobases (kb) de comprimento, dependendo do sorotipo tem aproximadamente 10.700 nucleotídeos e cerca de 3.400 aminoácidos (AA) e com uma única fase aberta de leitura (ORF) onde codifica uma poliproteína e por meio de clivagem constitui 3 proteínas estruturais: a proteína C que forma o capsídeo, uma glicoproteína prM precursora da membrana da proteína M e a proteína E que formam o envelope e mais 7 proteínas não estruturais: (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B E NS5)^{8,9,40,41,42} (**Figura 1**).

O fator de virulência pode estar associado há diversas regiões genicas com alta

frequência de mutações sendo os genes para as proteínas prM, E, NS1 e NS3 relevantes na infecciosidade⁸. A proteína C tem aproximadamente de 11 a 13 kDa e contém de 112 a 27 aminoácidos, contribui na formação do complexo ribonucleoproteico empacotando o RNA, é carregada positivamente com resíduos de lisina e arginina nas extremidades C-nascente e C-terminal, separados por uma região interna hidrofóbica, que atua como uma sequência sinal para a translocação da prM para o interior do lúmen do retículo endoplasmático^{8,9}.

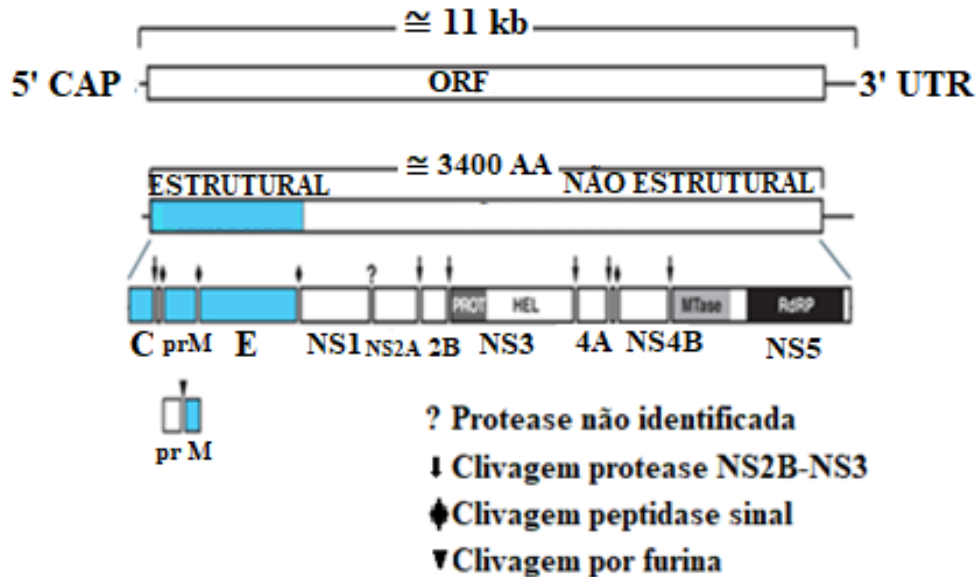
A glicoproteína prM com cerca de 75 aminoácidos, 22 a 26 kDa e precursora da proteína M, é responsável por impedir que a proteína E sofra reorganização induzida por pH e fusão prematura pela via secretora. Seu segmento pr é clivado por uma protease celular furina, permitindo que a proteína M forme um dímero e fique ancorada no envelope e finalmente pr é liberado no extracelular. A maior proteína de superfície é a proteína E, tem cerca de 51 a 60 kDa, possui 12 resíduos conservados de cisteína, participa na estrutura viral, liga-se ao receptor celular do hospedeiro, sendo o principal alvo dos anticorpos neutralizantes, também tem se observado mutações o que pode aumentar a virulência das cepas, dessa forma o gene E tem sido o mais utilizado em estudos médicos^{6,8,43,44}.

Com 354 aminoácidos a glicoproteína NS1, 46kDa, é a primeira proteína não-estrutural, pode ser encontrada no interior do retículo endoplasmático, associada a membrana celular e na forma solúvel no meio extracelular, sendo alvo da imunidade humoral do hospedeiro^{43,44}.

NS2 tem duas proteínas NS2A com 218 a 231 aminoácidos e cerca de 22 kDa, contribui no processamento de NS1, já a NS2B tem aproximadamente 14,5 kDa, com 130 a 132 aminoácidos e, está envolvido no processo da protease do complexo NS2B-NS3, por conseguinte, NS3 (69 kDa) possui de 618 a 623 aminoácidos, interage com a proteína receptora do hospedeiro, além de possuir atividade helicase e de protease. NS4A (16kDa) e NS4B (27kDa) são proteínas hidrofóbicas, podem atuar como co-fatores nos complexos de replicação viral, no entanto, suas funções, ainda, são desconhecidas. NS5 (103 kDa) com 900 a 905 aminoácidos, sendo a maior proteína dos Flavivirus, atua como RNA polimerase e RNA dependente, além disso, participa na formação do terminal 5' UTR do RNA^{7,40,16}.

O DENV é flanqueado por duas regiões não codificadoras, 5' UTR (~100 Pb) possui uma haste com uma alça acima e uma ramificação lateral e participa junto com o complexo NS3-NS5 e ação da metiltransferase da NS5 na tradução do genoma, enquanto que a extremidade terminal 3' UTR (~450 Pb), possui uma haste-alça 3' SL (Stem Loop) e diversos elementos repetidos de CS1 (complementary or cyclization sequences) e formam complexo que está envolvido na transcrição e replicação do RNA^{6,11,12,13}.

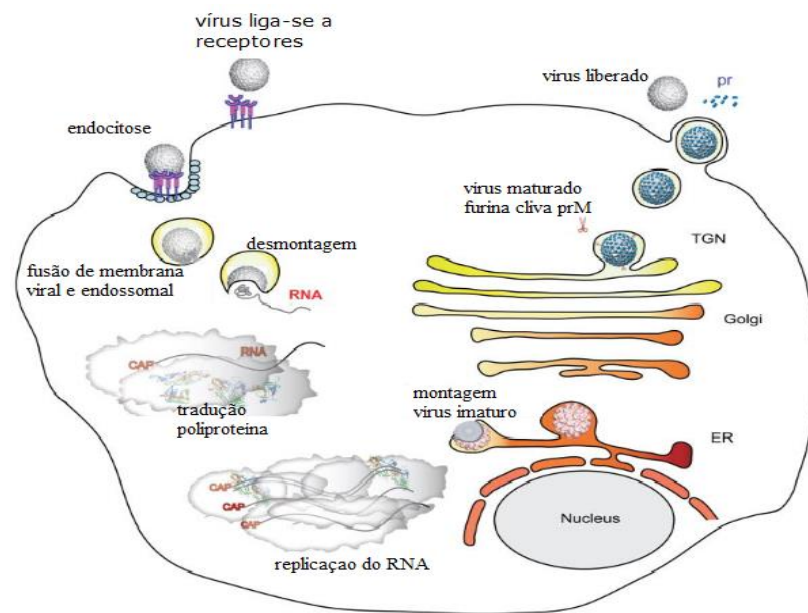
Figura 1: Desenho esquemático da estrutura genômica, processamento de poliproteína e clivagem de proteínas do DENV



Fonte: Lindenbach, 2007, (Adaptado).

O DENV tem tropismo positivo por células fagocíticas, dentre elas, monócitos/macrófagos, células de Langerhans e células dendríticas, no entanto, estudos tem demonstrado infecção em linfócitos B, linfócitos T, células natural Killer, endoteliais, hepatócitos e neurônios^{12,45,46}.

Liga-se a receptores celulares do hospedeiro por endocitose ao entrarem na célula sofrem trimerização da proteína E, devido pH baixo na região pré-lissomal, em seguida ocorre fusão com a membrana celular e, por conseguinte liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, então, o genoma, já dissociado do capsídeo, com uma única fita simples ORF de senso positivo codifica uma poliproteína que é processada pela serino-protease viral (NS2B/NS3) responsável pela clivagem de proteínas não estruturais: NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K e NS4B/NS5 e replicam o RNA viral na região da membrana do retículo endoplasmático (RE) e, a sinalase e furina do hospedeiro são responsáveis pela clivagem das proteínas estruturais: C/prM, prM/E, E/NS1 e 2K-NS4B, as quais juntamente com o RNA participam na maturação e secreção dos virions maduros, que ocorre no complexo de Golgi e, são liberados por exocitose. Ainda é desconhecido a enzima responsável pela clivagem da proteína NS1/NS2A^{9,11,47,48}(**Figura 2**).

Figura 2: Ciclo de replicação do DENV

Fonte: Sampatch, 2009, (Adaptado).

2.1.3 Fisiopatologia e Aspectos clínicos da doença

2.1.3.1 Vetur

Aedes aegypti é um artrópode da família Culicidae com menos de 1centímetro, encontrado em regiões tropical e subtropical. Oriundo do Egito e, posteriormente, difundido pelo mundo inteiro. No Brasil é, popularmente, conhecido como mosquito-da-dengue ou mosquito rajado, sendo o principal transmissor do DENV. Possui uma coloração castanha-escura, com abdómen escuro, podendo haver manchas branco-prateadas e suas pernas com faixas brancas. Tem preferência diurna, principalmente, ao início e fim do dia e, as fêmeas põem seus ovos a margem superficial da água, preferencialmente limpa, os mesmos, em fase embrionária podem sobreviver a desidratação por cerca de 1 ano. O ciclo de vida desde a oviposição até a fase adulta é de aproximadamente 10 dias divididos em: ovo, 4 fases de larva, pupa e fase adulta, com vida média de 45 dias^{49,50,51}.

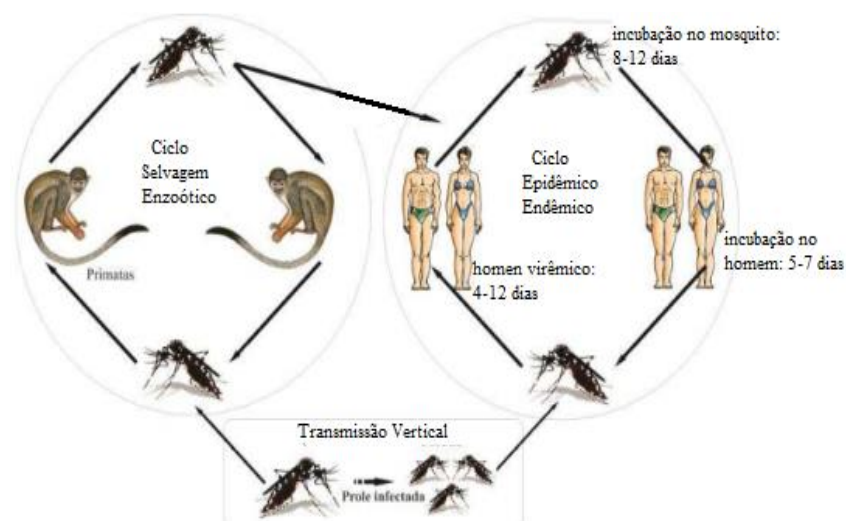
2.1.3.2 Ciclo de transmissão

O DENV, dentre outros vírus, pode ser transmitido pelo díptero *Ae. albopictus*, também conhecido como mosquito tigre ou mosquito da floresta, adapta-se melhor em zona rural e à volta das cidades, alimenta-se de sangue humano e de outros animais e a infecção viral ocorre principalmente no intestino médio, no entanto, a capacidade vetorial é menos eficiente, visto que, o *Ae. aegypti* é altamente antropofílico, peridomiciliar e a infecção viral ocorre no intestino médio disseminando para outros tecidos, não havendo um efeito patogênico direto para o vetor^{51,52}.

Tanto o macho quanto a fêmea alimentam-se de néctar, seiva e sangue, podendo contrair o vírus com o sangue de um hospedeiro em fase de viremia, 4 a 12 dias, após um período de 8 a 12 dias já são infectivos por toda a sua vida. No homem, o vírus fica incubado de 2 a 15 dias, com médias de 5 a 7 dias, quando surgem os primeiros sintomas da doença^{51,52}.

A fêmea do *Ae. aegypti* é a principal transmissora dos sorotipos do DENV e de tantos outros vírus, seguida *Ae. albopictus*, ao serem fecundadas, necessitam de sangue para continuar a maturação dos ovos, podendo ocorrer transmissão vertical. Por meio de sua probóscide realiza sucção de sangue humano e, ao mesmo, tempo regurgitada secreção salivar com fatores de anticoagulação, evitando que o alimento coagule, desse modo, o vírus entra na corrente sanguínea do hospedeiro, essa transmissão é descrita como ciclo endêmico/epidêmico, já no ciclo enzoótico/selvagem envolve diferentes espécies de díptero e hospedeiro vertebrado primata não humano^{53,54,55} (**Figura 3**).

Figura 3: Ciclos de transmissão do DENV



Fonte: Whitehead, 2007, (Adaptado).

2.1.3.3 Patogênese

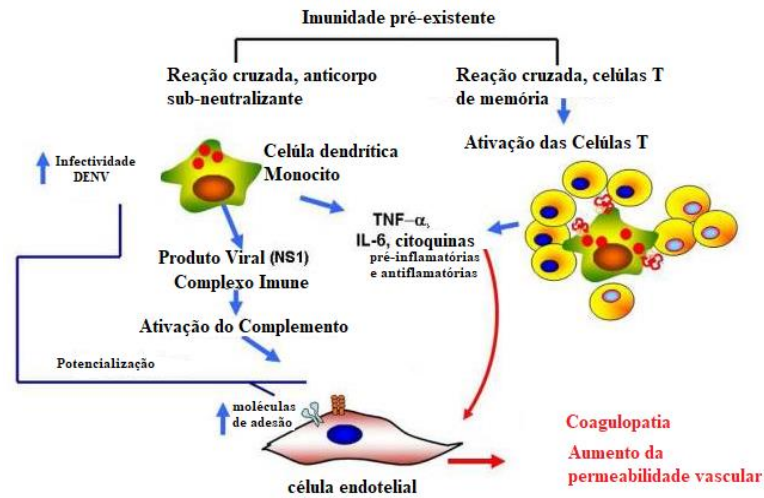
Sabe-se que na infecção primária por um mesmo sorotipo do DENV, a resposta imune humoral ocorre de forma lenta e duradoura e, na infecção secundária, a titulação de anticorpos se elevam rapidamente, ambas infecções podem ser assintomáticas ou sintomáticas com a presença da forma clássica da doença: Febre do Dengue (FD) e, mesmo, a forma grave: a Febre hemorrágica do Dengue (FHD) e, mesmo, Síndrome do Choque do Dengue (SCD)^{2,56}.

Ainda não está bem claro os mecanismos pelo qual o vírus causa a forma grave da doença, duas hipóteses tem sido propostas para explicar FHD/SCD, virulência do DENV e, a infecção secundária por um sorotipo diferente da primeira exposição^{15,57}.

Estudos apontam uma maior virulência de algumas cepas de determinados sorotipos, sendo o DENV-2 altamente nocivo e, em regiões endêmicas pode ocorrer a coinfeção por diferentes sorotipos e, mesmo, múltiplas espécies de arbovírus^{41,57,58,59}.

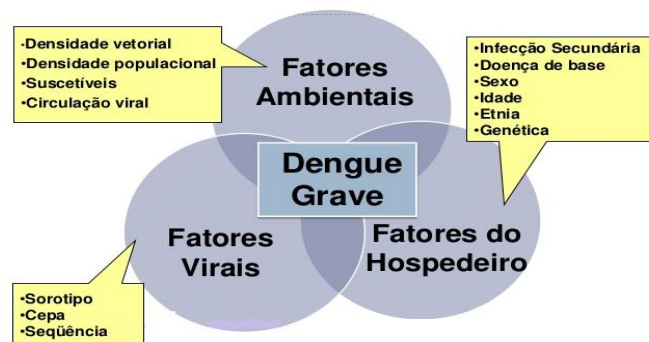
A hipótese da infecção secundária (sequencial) sugere a existência de anticorpos heterólogos antidengue da classe IgG, adquiridos ativa ou passivamente (via placentária) e, que juntamente com a participação de linfócitos B e T atuam de forma cruzada entre sorotipos diferentes, subneutralizando epitopos, potencializando a infectividade (antibody dependent enhancement, ADE) e possibilitando a entrada viral nas células com receptores Fc, resultando em nível elevado da carga viral e, como consequência podendo levar a FHD/SCD, esse fenômeno imunológico é conhecido como “pecado antigênico original”¹⁵.

Em uma infecção secundária os linfócitos T de memória entram em contato com macrófagos infectados por sorotipo heterólogo, tendo uma resposta imune cruzada, estimulando a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias e outros mediadores, como consequência aumentam a permeabilidade vascular, a trombocitopenia, a hemorragia contribuindo para a ocorrência da FHD. O FNT- α , uma citocina pró-inflamatória, é encontrado em níveis altos, influenciando na secreção de histaminas pelos basófilos, na produção de fator de ativação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (ON) contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular, do extravasamento de plasma, e da plaquetopenia, enquanto, que a IL-6 elevada, uma citocina anti-inflamatória, atua como um pirógeno e, influenciando, posteriormente, na destruição de plaquetas^{60,61,62,63} (**Figura 4**).

Figura 4: Imunopatogênese da Infecção secundária da Dengue

Fonte: Srikiatkachorn, 2009, (Adaptado).

No entanto, essas hipóteses não esclarecem como casos de FHD/SCD podem ocorrer em infecções primárias e, não ocorrer em infecções secundárias, surge a hipótese da multicausalidade, integração de diversos fatores relacionados ao sorotipo, genótipo e sequência de vírus infectante, também, fatores relacionados ao hospedeiro, como a idade, com maior risco para crianças e idosos, a etnia, com maior risco para brancos que negros, as doenças crônicas, como a anemia falciforme, a asma brônquica, a diabetes mellitus e fatores genéticos e a fatores relacionados ao ambiente epidemiológico, como a densidade populacional, a densidade e capacidade vetorial, a circulação viral e a suscetibilidade^{62,63} (**Figura 5**).

Figura 5: Teoria da multicausalidade

Fonte: Guzman, 2009, (Adaptado).

2.1.3.4 Manifestações clínicas e laboratoriais

Quando sintomática, três fases clínicas da doença são caracterizadas, a fase febril, a fase crítica e a fase de recuperação⁵⁶.

A fase febril, conhecido como Dengue clássico, é a forma mais comum da doença, manifestando-se com súbita febre de 39°C a 40°C, associada a cefaleia, mialgia, artralgia e dor retroorbitária, podendo apresentar, ainda, anorexia, náuseas, vômitos e, mesmo, diarreia. Aproximadamente, no terceiro dia da doença surge exantema máculo-papular, podendo atingir face, tórax e membros, gradativamente. Essa fase tem duração de terceiro a sete dias, com período de defervescência, podendo haver hemorragias, destacando-se, as petéquias, o epistáxi e a gengivorragia, seguido de prurido cutâneo e astenia. Aponta-se em exames laboratoriais a trombocitopenia, a linfocitose e ligeiro aumento das provas hepáticas^{2,56}.

Na fase crítica, a FHD evolui após a defervescência podendo surgir sinais de alarme, como dor abdominal intensa e contínua á palpação, vômitos persistentes, sangramento de mucosa, hipotensão postural, poliserosite (derrame pleural/pericárdio e ascite), policitemia e letargia e/ou irritabilidade. Aos exames laboratoriais destaca-se a trombocitopenia inferior a 100.000 plaquetas/mm³, hipofibrinogênio e eritrocitosis acentuada. Com esses sinais e sintomas a FHD pode ser classificada em vários graus^{2,64,65} (**Figura 6**).

A FHD é classificada em quatro categorias de acordo com severidade dos sintomas e dos exames laboratorial, sendo que o grau III e IV caracteriza a SCD^{2,56}:

Grau I – febre, cefaleia, dor retro orbitaria, mialgia, artralgia, “prova do laço” positiva, leucopenia, trombocitopenia, sem evidencia de extravasamento plasmático;

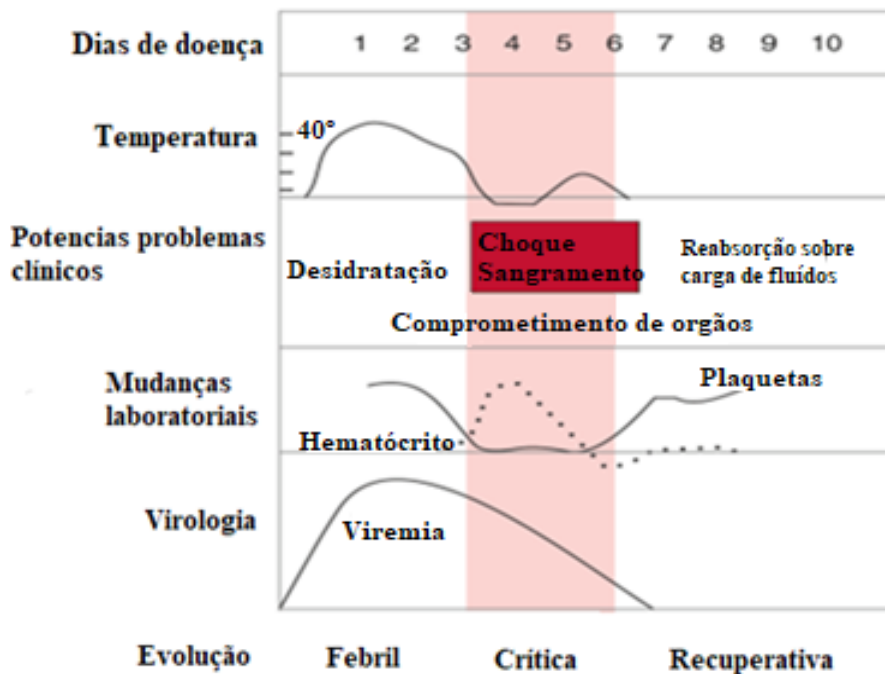
Grau II – febre, cefaleia, dor retro orbitaria, mialgia, artralgia, “prova do laço” positiva, hemorragia espontânea, trombocitopenia < 100.000, hematócrito superior a 20% do valor normal;

Grau III – falência circulatória com pulso rápido e fraco, hipotensão, agitação, pele fria e viscosa, trombocitopenia < 100.000, hematócrito superior a 20% do valor normal e;

Grau IV – Choque profundo, com pressão e pulso indetectáveis, trombocitopenia < 100.000, hematócrito superior a 20% do valor normal.

Quando um volume de plasma é perdido devido a permeabilidade vascular pode se instalar, rapidamente, a SCD e, em um intervalo de 12 a 24 horas ao óbito ou a recuperação se realizado terapia antichoque adequada. Na fase recuperativa ou período de convalescência, pode ocorrer um rash cutâneo, o plasma extravasado é reabsorvido e a recuperação clinica é progressiva^{2,56}.

Figura 6: Evolução clínica e laboratorial da dengue



Fonte: WHO, 2009, (Adaptado).

Até o momento, não há tratamento antiviral específico para a dengue, e nem uma vacina disponível no mercado. A terapia é realizada com hidratação, repouso e medicamentos paliativos para a febre e dor. Diversas estratégias estão sendo realizadas para se prevenir a infecção pelo DENV, desde o controle do vetor, desenvolvimento de métodos diagnóstico mais robustos e a elaboração de uma vacina eficaz^{2,54,56}.

2.1.4 Contexto histórico e epidemiológico

Cerca de 265 a 420 a.C, período da dinastia Chin, uma enciclopédia chinesa de doenças, sintomas e remédios, já havia descrito uma doença conhecida como “água envenenada” associada a insetos voadores com sintomas semelhantes aos da dengue. Durante os séculos XV a XIX, principalmente, com a expansão comercial e o aumento do comércio de escravos, o vetor espalhou-se pelo mundo e, vários surtos de uma doença similar a dengue estão registrados. Em 1635 surto nas Antilhas Francesas, em 1699 surto no Panamá, em 1779 surto no Egito, Cairo e Indonésia, em 1780 surto na Filadélfia^{37,66}.

Estudos apontam que entre 1779 e 1916 ocorreram oito pandemias com duração de três a sete anos, abrangendo a África, as Américas, a Ásia, a Austrália e a Europa. Os primeiros surtos de dengue hemorrágica surgiram em 1953 nas Filipinas, em 1958 na Tailândia e em 1960 no Vietnã, confirmando a circulação de vários sorotipos em uma mesma região e possivelmente atribuído as transformações geoambientais causadas pela pós guerra mundial^{66,67}.

Entre os anos de 1955 a 2007, estima-se que ocorreram mais de 50 milhões por ano, de casos de infecções por dengue, reportados em mais de 60 países. Nas Américas Central e Sul, entre as décadas de 60 e 70 houve erradicação do *Ae. Aegypti*, no entanto, com passar dos anos as medidas foram descontinuadas, causando reinfestação com surtos cíclicos de a cada 3-5 anos, destacando-se a epidemia em Cuba, em 1981, com manifestação da FHD/SCD resultando em 344.203 casos notificados e 158 óbitos^{2,59}.

No Brasil, em 1982 foram registrados clínica e laboratorialmente os primeiros casos de dengue sorotipos DENV-1 e DENV-4 na cidade de Boa Vista, Roraima. Em 1990 surgiu o DENV-2, em 2001 o DENV-3 ambos na cidade do Rio de Janeiro. Atualmente circulam simultaneamente os quatro sorotipos de DENV, com predomínio do tipo DENV-4^{68,69}.

Em 2018, foram notificados 265.934 casos prováveis de dengue no país, destes, 174.724 (65,7%) foram confirmados, sendo, 3.616 casos de dengue com sinais de alarme, 321 casos de dengue grave e 155 óbitos. Em comparação ao mesmo período, em 2017, foram registrados 239.389 casos prováveis de dengue, 2.709 casos de dengue com sinais de alarme, 293 casos de dengue grave e 185 óbitos. Evidenciam-se com as maiores taxas de incidência de casos prováveis de dengue em 2018, as regiões Centro-Oeste, com 635,9 casos/100 mil habitantes e, o Nordeste, com 118,5 casos/100 mil habitantes. Entre as Unidades da Federação, destacam-se Goiás, com 1.249,1 casos/100 mil habitantes, Rio Grande do Norte, com 679,5 casos/100 mil habitantes e Acre, com 814,7 casos/100 mil habitantes⁷⁰.

No Acre, no ano de 2016 foram notificados 7.446 casos prováveis de dengue, destes, 750 (10%) confirmados, 4.538 (61%) descartados, 1.087 (15%) foram encerrados como inconclusivos por terem excedido o tempo oportuno de encerramento (60 dias) e 1.071 (14%) estão em investigação aguardando confirmação ou descarte. Em comparação ao mesmo período, em 2015, houve uma redução de 30% das notificações, foram notificados 10.672 casos, destes, 4.495 (42%) confirmados, 5.634 (53%) descartado e 543 (5%) foram encerrados como inconclusivos. Não houve registro de FHD/SCD e óbito²⁷. Com relação ao sorotipo circulante, em 2016, foram identificados 20 casos de DENV-2, sem confirmação para outro sorotipo e, em 2015, 4 casos identificados de DENV-1, sem confirmação para outro sorotipo⁷¹.

2.2 VÍRUS DA CHIKUNGUNYA

2.2.1 Classificação

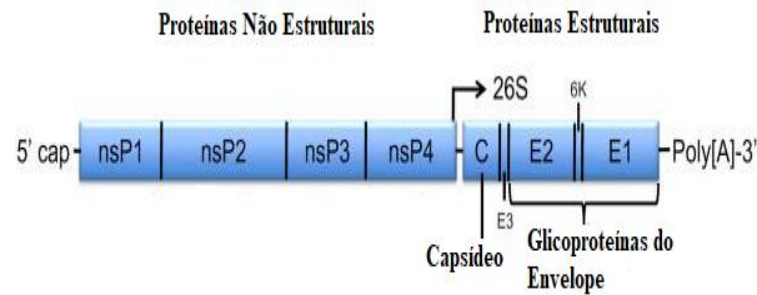
O vírus da chikungunya (CHIKV) é do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*, estando no grupo *Alphavirus* do velho mundo, pertencente ao complexo de vírus da floresta de Semliki, com base nas características genéticas e antigênicas semelhantes, sendo considerado uma arbovirose^{16,17,18,72}.

2.2.2 Estrutura genômica

Mede aproximadamente 65-70 nm de diâmetro em forma esférica. Possui capsídeo icosaédrico composto por 240 monômeros de proteínas e, uma envelope lipídico revestido por 80 partículas proteicas agrupadas por heterodímeros de glicoproteínas (E1 e E2). Seu é genoma constituído por uma cadeia simples de RNA de sentido positivo, com aproximadamente 12 Kb, possui duas extremidades, 5' limitada com uma 7-metilguanossina e na outra ponta a 3' com poliadenilada. Existem duas ORF's, a primeira codifica proteínas não estruturais, nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 e, a segunda codifica proteínas estruturais C, P62 (madura em E2 e E3) e E1 que se associam como um heterodímero, formando um dímero E1/E2 ou um trímero E1/E2/E3^{18,19,20,72}(**Figura 7**).

A proteína nsP1 é necessária para o encapsamento viral, tem ação enzimática MTase, podendo associar-se com proteínas de membrana. A nsP2 possui três domínios: N-terminal com ação helicase, GTPase e ATPase, C-terminal atividade de protease cliva proteínas não estruturais e o terceiro domínio tem ação enzimática MTase. A nsP3 necessária para a síntese de RNA e acredita-se estar associada a virulência. A nsP4 auxilia na replicação genômica e transcrição subgenômica 26s^{19,20,73,74}.

A proteína estrutural C forma o nucleocapsídeo, a E1 realiza fusão das membranas viral e hospedeiro, E2 liga-se ao receptor da célula hospedeira responsável pela diversidade de cepas virais, a E3 participa na montagem das partículas virais e 6k é incorporada durante o brotamento viral^{73,74}.

Figura 7: Estrutura Genômica do CHIKV

Fonte: Weaver, 2015, (Adaptado).

2.2.3 Fisiopatologia e aspectos clínicos da doença

O CHIKV possui um único sorotipo e, três genótipos conhecidos, o genótipo Ocidental ou do Oeste Africano (Waf) Oriental ou do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA) e o genótipo Asiático e a Linhagem do Oceano Índico (IOL). Diversos estudos tem associado diversas manifestações clínicas neurológicas, doença em neonatos e mesmo óbitos a Linhagem IOL, sendo considerada bastante virulenta^{75,76}.

No ciclo de replicação, a proteína E2 liga-se ao receptor da celular hospedeira e sofre endocitose. E1 libera um peptídeo hidrofóbico que se insere na membrana endossomal, estimulando a liberação do núcleocapsídeo no citoplasma que, posteriormente se desintegra liberando o genoma, ligando aos ribossomos como RNAm, dando início a tradução de proteínas, formando uma fita de RNA de sentido negativo que após transcrição torna-se RNA de senso positivo, então, as novas partículas virais são montadas e, posteriormente, uma nova partícula viral infectante é liberada por exocitose^{18,19,20,74}.

O CHIKV possui tropismo por fibroblastos da pele, infectando, também, células dendríticas, macrófagos e monócitos. As células infectadas sinalizam ao sistema imune, que libera diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Interferons, Interleucinas e outras) para limitar a disseminação viral. Com o decorrer essas células adentram na corrente sanguínea, propagando-se diferentes tecidos e órgãos, dentre eles, cérebro, fígado, articulações e tecido muscular^{74,75,76,77}.

O CHIKV pode ser transmitido ao ser humano e outros animais pela picada de fêmeas infectadas dos mosquitos *Ae. aegypti*, habitualmente, peridomiciliar e do *Ae. albopictus*, geralmente, em zona rural e peri-urbana. Existem casos de transmissão vertical em intraparto

de gestantes virêmicas e recentemente foi observado a presença de CHIKV no leite materno, podendo provocar infecção neonatal grave (atraso no desenvolvimento mental, paralisia cerebral e microcefalia)^{4,78,79}.

O período de incubação no homem, é em média de três a sete dias com variação de um a doze dias, com período de viremia de até dez dias com média de dois dias antes do início dos primeiros sintomas, perdurando por mais oito dias. A incubação no vetor dura em média dez dias, sendo virêmico por toda vida^{80,81}.

Cerca de 70% dos pacientes infectados pelo CHIKV, desenvolvem sintomas quando comparados as demais arboviroses. Os sintomas na fase aguda ou febril são parecidos ao da dengue, febre aguda (>39°C), cefaleia, náusea, mialgia, artralgia ou poliartralgia acompanha ou não de edema e exantema com ou sem prurido, diferindo na intensidade da artralgia^{4,80,81}.

Na fase subaguda, geralmente, a febre desaparece e a artralgia pode persistir ou agravar, incluindo poliartrite distal e tenossinovite hipertrófica subaguda em falanges, punhos e tornozelos levando a Síndrome do túnel do carpo. Além disso, pode surgir lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas^{4,82,83}.

A fase grave acomete, com maior frequência, crianças, idosos com mais de 65 anos e pacientes com comorbidade associadas (história de convulsão febril, diabetes, asma, insuficiência cardíaca, alcoolismo, doenças reumatológicas, anemia falciforme, talassemia e hipertensão arterial sistêmica)^{4,83}. É caracterizada por persistência dos sintomas da fase subaguda, principalmente a dor articular (com ou sem edema), a dor musculoesquelética, a dor neuropática, a limitação de movimentos, síndrome do túnel do carpo^{83,84}.

Em alguns casos pode ocorrer, ainda, uma forma atípicas da doença, com manifestações clínicas neurológicas (meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, Síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias), oculares (neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte), cardiovascular (miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia e instabilidade hemodinâmica), na pele (hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesículo bolhosa e ulcerações aftosa-like), nos rins (nefrite e insuficiência renal aguda) e outros (discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético e insuficiência adrenal)^{4,81,82,85}.

Ainda não existe tratamento antiviral específico para chikungunya, a terapia é paliativa, com hidratação, repouso e a administração de dipirona ou paracetamol e, em alguns casos tramadol. Não é indicado os anti-inflamatórios não hormonais (AINH) devido ao risco de sangramento aumentado^{4,81,82,83,85}.

2.2.4 Contexto histórico e epidemiológico

A palavra Chikungunya é proveniente da língua banto de grupo étnico da província MaKonde (Tanzânia), refere-se posição curva do paciente devido a dor articular debilitante, durante um surto febril em 1952. Desde então, infectou pessoas na África, Ásia, Europa e as Américas^{85,86}.

O primeiro caso autóctone nas Américas foi relatado em 2013, na Ilha de Saint Martin. No Brasil foi descrito em setembro de 2014 no estado do Amapá e, posteriormente, um genótipo diferente foi identificado no estado da Bahia^{87,88}.

Em 2017, foram registrados 185.593 casos prováveis de chikungunya em comparação com 87.687 casos prováveis registrados no país em 2018, uma incidência de 42,1 casos/100 mil habitantes, destes, 68.962 (78,6 %) foram confirmados e 26.771 foram descartados. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis com 52.966 (60,4%) casos em relação ao total do país, seguido das regiões Centro-Oeste com 13.862 (15,8 %) casos, Nordeste com 11.287 (12,9 %) casos, Norte com 9.315 (10,6 %) casos e Sul com 257 (0,3 %) casos. Em 2018, foram confirmados laboratorialmente 39 óbitos, e existem 42 óbitos sob investigação, no mesmo período, em 2017 foram 192 óbitos e existem 37 sob investigação⁷⁰.

No estado do Acre, em 2016 entre as semanas epidemiológicas 1 a 18 (03/01/2016 a 07/05/2016) foram notificados 844 casos suspeitos de febre chikungunya, destes, 656 (78%) casos foram na cidade de Rio Branco. Em comparação, no mesmo período de 2015 nenhuma notificação foi registrada para chikungunya²⁷.

A partir de março de 2016 o Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, passou a realizar sorologia para detecção do anticorpo IgM para o diagnóstico de CHIKV. Das 407 amostras enviadas, 29 (7%) foram reagentes, 361 (89%) não reagente, 10 (2%) indeterminado e 07 (2%) não foram testadas. As amostras coletadas anteriormente a esse período foram analisadas no o Laboratório de referência da Região Norte Instituto Evandro Chagas²⁷.

2.3 VÍRUS DA ZIKA

2.3.1 Classificação

O vírus da zika (ZIKV) é considerado uma arbovirose emergente, pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, estando relacionado com os vírus da dengue, febre amarela, vírus do Nilo Ocidental e encefalite japonesa^{89,90}.

2.3.2 Estrutura genômica

O ZIKV possui RNA de fita simples e senso positivo, tem aproximadamente 11kb de comprimento, contendo 10.794 nucleotídeos que codificam 3.419 aminoácidos. Dentre as 3 proteínas estruturais (C, prM e M) e as 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) a mais imunogênica (**Figura 1**), do ZIKV é a glicoproteína E, que é dividida em três domínios (DI, DII e DIII), importantes no processo de neutralização e reação cruzada, sendo que todos apresentam elevada afinidade por diferentes anticorpos específicos^{89,90,91}.

2.3.3 Fisiopatologia e aspectos clínicos da doença

Embora muitos estudos descrevam a replicação flaviviral ocorrendo no citoplasma da célula hospedeira, um estudo tem sugerido que o núcleo celular poderia abrigar os antígenos do ZIKV⁷⁴. As informações sobre a patogênese, ainda, são pouco conhecidas, acredita-se que repliquem-se ao infectarem células dendríticas e, posteriormente, disseminando-se para os linfonodos, corrente sanguínea, órgãos e tecidos^{92,93}.

A transmissão do ZIKV ocorre por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, tendo sido o vírus isolado em espécies como, *Ae. africanus*, *Ae. aegypti* e *Ae. hensilli* mantendo o ciclo enzoótico. No ser humano o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* tornam-se potencial vetor na transmissão^{93,94,95}.

Diversos estudos apontam presença de ZIKV em fluidos corporais (urina, saliva, sêmen e fluidos vaginais) que podem estar envolvidos na transmissão por via sexual²¹. Também é possível ocorrer transmissão associada a transfusão sanguínea, uma vez que o RNAv foi detectado em doadores de sangue assintomáticos durante um surto entre 2013 e 2014, na Polinésia Francesa²³.

Foi detectado RNAv no leite materno de duas mães infectadas pelo ZIKV, mas não houve replicação viral na cultura de células. Não existem, até o momento, estudos que descrevam transmissão pelo leite materno²².

O período de incubação no homem varia entre 3 a 12 dias após a picada do mosquito, os primeiros sintomas podem iniciar entre 3 e 6 dias. Durante esta fase é possível realizar o diagnóstico específico para ZIKV pelo RT-rPCR, iniciado o período de viremia surge os anticorpos IgM, podendo ser realizado testes sorológicos³⁴.

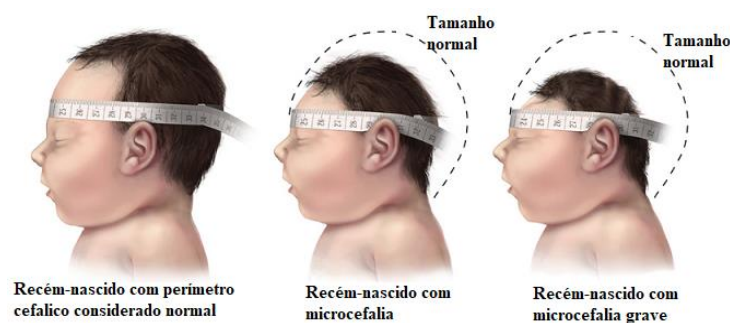
As manifestações clínicas podem variar dependendo da localidade, inicialmente os

sintomas são semelhantes aos de outras arboviroses, sem maiores complicações. A febre é baixa, podendo chegar, em alguns casos, a 39°C cedendo de 1 a 2 dias após o surgimento de exantema, que persiste de 2 a 14 dias, além disso, é referido mialgia, artralgia e dor lombar discretas e conjuntivites, geralmente, sem secreção purulenta. Anorexia, náuseas, vômitos, vertigem e dor retro orbital podem surgir de forma inespecífica. Ainda há poucas informações sobre as alterações hematológicas, embora, haja relatos de casos que descrevem um aumento da desidrogenase lática e da proteína C reativa e discreta leucopenia e trombocitopenia⁹⁷.

Outras manifestações estão sendo observadas em associação com a infecção por ZIKV. Em 2013, na Polinésia Francesa, durante um surto de infecção por ZIKV, foi registrado um aumento na prevalência de casos de Síndrome de Guillain-Barré (SGB. Em outubro de 2015, na região nordeste do Brasil, durante um surto de ZIKV foi observado durante a gestação, defeitos congênitos, insuficiência placentária, restrição de desenvolvimento intrauterino, morte fetal, e aumento no número de casos de recém-nascidos com microcefalia⁹⁸. Esta é diagnosticada após o nascimento pela medida do perímetro cefálico, no sexo feminino, será $\leq 31,5$ centímetros, e no sexo masculino $\leq 31,9$ centímetros. Em caso de microcefalia grave o perímetro cefálico é menor ainda (**Figura 8**)²⁶. Com relação a coinfeção, em 2014, na Nova Catalunha foram descritos dois casos coinfeção de DENV e ZIKV⁹⁹.

No momento ainda não existem vacinas e nem medicamentos antivirais específicos, o tratamento é sintomático, com o uso analgésicos e antipiréticos, deve-se evitar medicações que contenham salicilatos para evitar a indução hemorrágica. Os suspeitos de SGB devem ser monitorados em unidades de terapia intensiva, podem ser empregados a plasmaferese ou imunoglobulina hiperimune intravenosa, os casos de microcefalia devem ser acompanhados por profissionais preparados^{5,24}.

Figura 8: Comparação do perímetro cefálico em recém-nascidos com microcefalia



Fonte: Center of Disease Control and Prevention (CDC - EUA, 2016, Adaptado).

2.3.4 Contexto histórico e epidemiológico

O ZIKV foi isolado pela primeira vez, em 1948, em um macaco sentinela Reshus, durante pesquisa sobre a febre amarela da selva, na Floresta de Zika, Uganda. Em 1948 o vírus foi isolado em mosquitos da espécie *Aedes africanus*, na mesma floresta. Em 1956 estudos demonstraram que o *Ae. aegypti*, alimentado artificialmente, transmitia o vírus para macacos e ratos¹⁰⁰.

Estudos realizados na Nigéria, durante 1968 e 1971-1975, isolaram o vírus de humanos, 40% tinham anticorpos neutralizantes. Casos foram relatados na Indonésia durante o ano 1977-1978, e reapareceu novamente em um surto na Micronésia em 2007 com 49 infectados¹⁰¹⁻³. Em 2013 ressurgiu na Polinésia Francesa com cerca de 300 pacientes infectados⁹⁸.

No Brasil, durante maio de 2015, o primeiro caso foi notificado como uma doença exantemática, devido a semelhança dos sintomas com o da dengue, caracterizada como “Síndrome Dengue-Like”⁹⁰. Em 2017, foram registrados 17.593 casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika no país, em comparação a 2018 foram registrados 8.680 casos prováveis, destes, 3.984 (45,9%) casos foram confirmados, sendo que a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis com 3.149 casos (36,3%), seguido das regiões Nordeste com 2.425 casos (27,9%), Centro-Oeste com 1.733 casos (20,0%), Norte com 1.326 casos (15,3%) e Sul com 47 casos (0,5%)⁷⁰.

No estado do Acre, os primeiros casos suspeitos de zika foram notificados em novembro de 2015, o que resultou em 42 casos suspeitos até início de janeiro de 2016, todos no município de Rio Branco. Em 2016 de janeiro a maio registrou-se 1.269 casos suspeitos distribuídos nas cidades de Acrelândia, Bujari, Capixaba, Cruzeiro do Sul, Epitaciolândia, Feijó, Manuel Urbano, Plácido de Castro, Porto Acre, Senador Guiomard, Sena Madureira, Xapuri, Rio Branco e Tarauacá. Do total entre os anos de 2015 e 2016, 14 (1%) dos casos foram confirmados pelo Instituto Evandro Chagas, 1 caso confirmado pelo laboratório LABCO NOÛS, 17 (1%) descartados e 1.279 (98%) seguem em investigação epidemiológica e ou laboratorial até o momento²⁷.

2.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DAS ARBOVIROSES

2.4.1 Diagnóstico clínico diferencial

A maioria das arboviroses tem manifestações clínicas iniciais similares, para tanto,

foram categorizadas em síndromes clínicas: a síndrome febril, síndrome exantemática febril, síndrome hemorrágica febril, síndrome dolorosa abdominal, síndrome do choque e a síndrome meníngea^{2,4,5,56}.

No entanto, com o decorrer do tempo, podem levar a sintomas específicos, em casos de dengue pode manifestar-se como um dos primeiros sintomas a febre intensa, podendo evoluir para FHD e, mesmo, a SCD. A artralgia crônica se manifesta, geralmente, nos casos de chikungunya, podendo conduzir a incapacidade persistente. Nos casos de zika estudos tem descrito diversos acometimentos neurológicos como a SGB e as malformações congênitas. Daí um diagnóstico diferencial, rápido e preciso se torna essencial para que o paciente inicie o tratamento imediatamente (**Tabela 1**)^{2,4,5,56}.

Tabela 1: Diagnóstico diferencial das síndromes febris.

Manifestação clínica/laboratorial	Dengue	Chikungunya	Zika
Intensidade da febre	++	+++	+/-
Exantema	+(D5-D7)	++(D1-D4)	++++(D2-D3)
Mialgia	++	+	+
Artralgia	+/-	+++	+
Dor retrorbital	+++	+	++
Conjuntivites	+/-	-	+++
Sangramentos	++	+/-	-
Choque	-/+	-	-
Plaquetopenia	+++	+	-
Leucopenia	+++	++	-
Lifopenia	++	+++	-
Neutropenia	+++	+	-
Acometimento neurológico	+	++	+++
Risco de morte	+++	++	+
Evolução após fase aguda	Fadiga	Artralgia crônica	

Fonte: (Ministério da Saúde. Dengue: Diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança, 2016, Brito e Cordeiro, 2016, adaptado).

+++ = 70-100% dos pacientes; ++ = 40-69%; + = 10-39%; +/- = <10%; - = 0%.

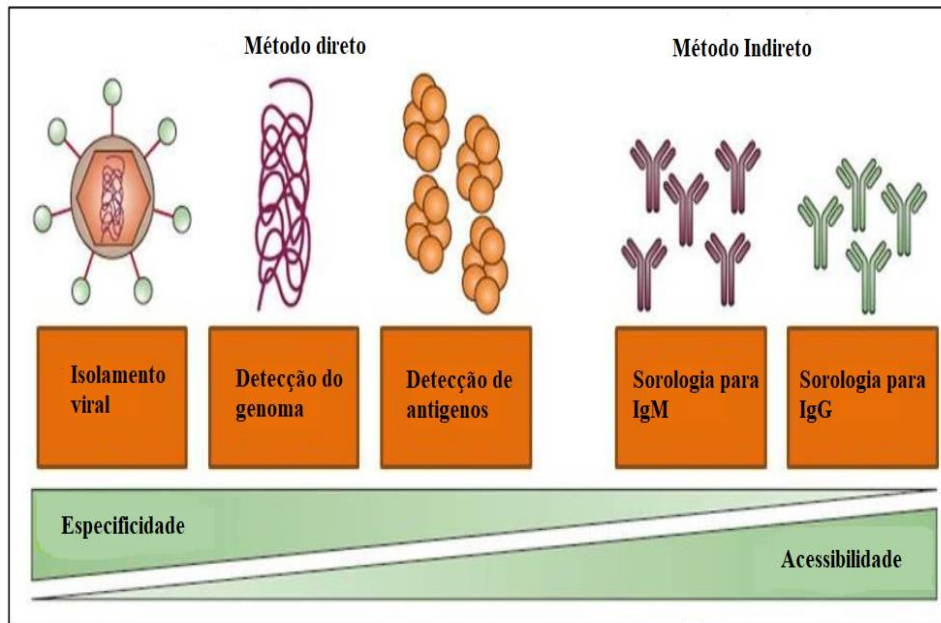
* Pode haver risco de morte nos casos neurológicos como a SGB decorrente de zika ou para crianças com malformações congênitas graves.

2.4.2 Diagnóstico laboratorial específico

As arboviroses por terem sintomas iniciais inespecíficos podem ser facilmente confundidas, tornando o diagnóstico clínico diferencial bastante difícil. Com isso faz necessário o diagnóstico laboratorial, principalmente, em regiões endêmicas onde há circulação simultânea desses vírus²⁵. Recentemente uma pesquisa realizada em Recife entre 2015 e 2016, constatou que 60% dos pacientes com sintomas característicos da dengue estavam, de fato, com chikungunya ou zika. Isso demonstra que nem sempre a clínica do paciente reflete o real agente infeccioso, daí a importância do diagnóstico laboratorial específico¹⁰⁴.

2.4.2.1 Diagnóstico sorológico e molecular

O diagnóstico específico das infecções por arboviroses pode ser realizado por métodos diretos e indiretos. Na fase aguda da doença os métodos diretos são mais eficientes, sendo possível identificar o genoma viral e seus componentes na amostra, tendo maior precisão e especificidade, embora, sejam menos acessíveis a sua realização devido aos altos custos para a realização. Já os métodos indiretos são úteis após o período de viremia, quando o sistema imune do indivíduo já produziu anticorpos IgM ou IgG, estes testes possuem alta sensibilidade e baixa especificidade, no entanto, são mais acessíveis devido ao baixo custo para a sua realização^{28,29} **(Figura 9)**.

Figura 9: Métodos de diagnóstico laboratorial

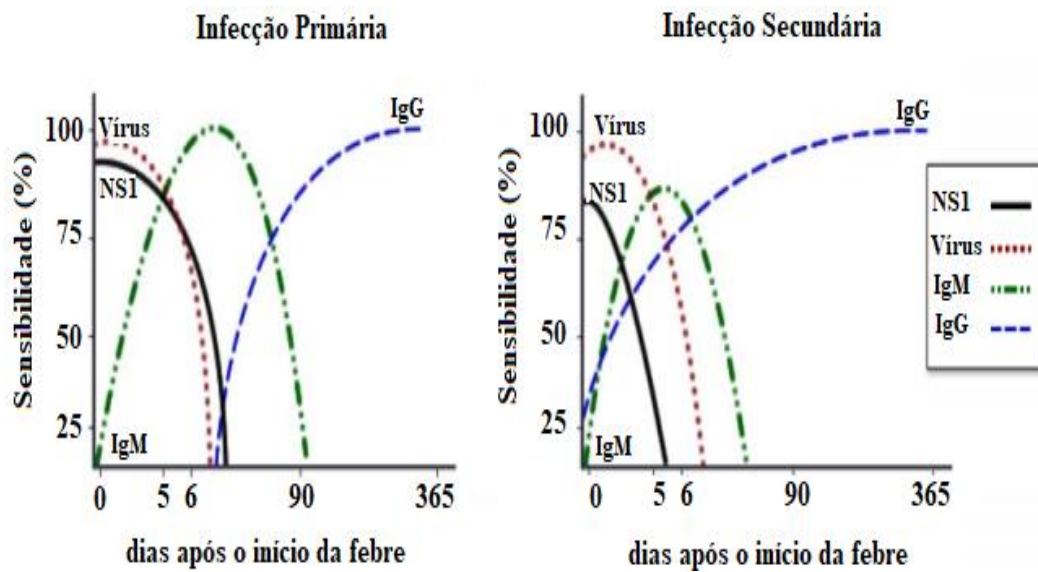
Fonte: Peelling et al., 2010, (Adaptado).

A técnica de isolamento consiste em inocular soro de pacientes, em período de viremia, em linhagens celulares de camundongos ou de mosquitos (*Ae. albopictus* – clone C6/36), após o vírus ser isolado, é identificado por imunofluorescência, a partir de anticorpos monoclonais específico para o vírus, a confirmação laboratorial pode variar de 7 a 12 dias^{28,29}.

Dentre os testes sorológicos os métodos de inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (FC), teste de neutralização (TN) requerem coleta de amostras pareadas e, além disso, exibem alta reatividade cruzada^{28,29}. Já os ensaio imunoenzimáticos para captura de IgM (MAC ELISA) e de IgG (G-ELISA), e os testes rápidos imunocromatografos atuam detectando IgM, IgG ou capturando antígeno viral NS1, atualmente estes tem sido os ensaios imunoenzimáticos mais utilizados devido ao baixo custo e facilidade de execução^{29,97}.

A desvantagens dos testes sorológicos é a elevada ocorrência reações cruzadas, principalmente, pelo DENV após uma infecção secundária com outras arboviroses do mesmo gênero, inclusive de pessoas que não tiveram contato com o vírus mas foram vacinados com a febre amarela, gerando resultados falso-positivos^{29,30,32} (**Figura 10**).

Figura 10: Dinâmica da resposta na infecção primária e secundária por DENV



Fonte: Center of Disease Control and Prevention (CDC - EUA, 2018, Adaptado).

A detecção de ácidos nucleicos virais é realizada pela técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa (RT-PCR), pode ser concebida em um formato one step para detectar simultaneamente outros arbovírus, tais como DENV, CHIKV e ZIKV, faz análises qualitativas e consisti em duas etapas principais: a transcrição reversa do RNA_v em DNA de fita simples (cDNA) e a conversão em DNA de fita dupla e sua amplificação^{89,97}. A RT-PCR em tempo real (rRT-PCR) é uma variação aprimorada do RT-PCR, faz análises quantitativas do genoma viral nos fluidos orgânicos e consiste em apenas uma única etapa, incluindo uma sonda e iniciadores (primers) que se ligam as regiões dos genes de interesse^{31,32}.

Ambas técnicas de PCR tem alta precisão e especificidade, no entanto, podem apresentar reações cruzadas, falsos-negativo devido à pouca especificidade de primers para os *Flavivirus*, alto custo dos kits comerciais, de equipamentos, pessoal especializado^{31,32,89,97} (Tabela 2).

Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos principais métodos sorológicos e moleculares.

Método	Vantagens	Desvantagens
Ensaio sorológico	Fácil desempenho	Reações cruzadas
	Custo e automação acessíveis	Falsos-positivo
	Alta sensibilidade	
RT-PCR	Alta especificidade	Reações cruzadas
	Alta precisão	Falsos-negativos
		Alto custo
		Restrito à 1ª semana
PCR em tempo real	Alta especificidade	Reações cruzadas
	Alta precisão	Alto custo
	Quantificação viral	Restrito à 1ª semana
	Rapidez na execução	
	Menos falsos-negativo	

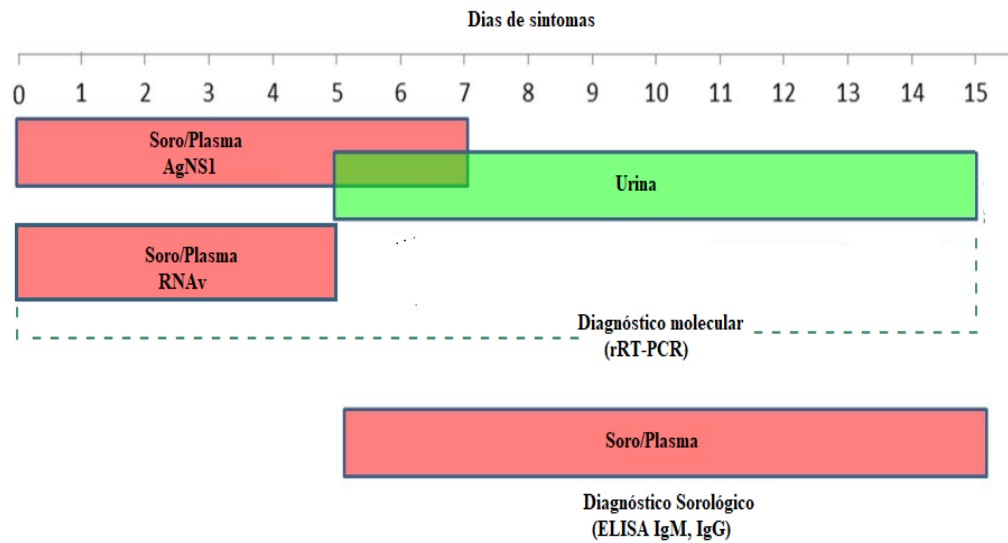
Fonte: Peelling et al., 2010 (Adaptado).

Os anticorpos IgM podem ser detectáveis no soro ou plasma com 3 a 5 dias do início dos primeiros sintomas, atingindo níveis máximos em 7 a 8 dias, após o sétimo dia ocorre a soroconversão período mais confiável para a detecção de anticorpos, com 1 a 2 meses vai diminuindo a titulação. Enquanto que os anticorpos do tipo IgG podem ser detectáveis em títulos muito baixos a partir de 4 dias, com pico em duas semanas perdurando por 2 a 3 anos após a infecção, o que possibilita a detecção da doença no período de convalescência^{33,34}.

O Antígeno NS1 está presente na circulação sanguínea desde o primeiro dia de infecção até o início da soroconversão IgM para IgG (em média a soroconversão inicia-se após o sétimo dia), inclusive durante as reinfecções³¹.

O RNAv pode ser encontrado no período de viremia da doença em média de 0 a 5 dias do início dos primeiros sintomas, na urina permanece por mais de 10 dias e no sêmen por mais de dois meses^{33,96} (**Figura 11**).

Figura 11: Esquema das opções de diagnóstico pela dinâmica da resposta imune



Fonte: Center of Disease Control and Prevention (CDC - EUA, 2018, Adaptado).

O uso de técnicas de diagnóstico molecular embora tenham alto custo, são consideradas mais precisas e específicas para confirmar definitivamente o agente etiológico dessas síndromes febris, dessa forma, poderiam ser identificado os vírus e sorotipos circulantes e as regiões endêmicas, auxiliando a vigilância epidemiológica na antecipação de medidas preventivas e de controle de potenciais agravos na comunidade³⁵.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o diagnóstico clínico e molecular das síndromes febris Dengue, Chikungunya e Zika, atendidas em uma unidade de pronto atendimento de Rio Branco, Acre, no período de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar o genoma viral do DENV, CHIKV e ZIKV no plasma de pacientes por técnicas moleculares (RT-rPCR);
- b) Descrever o diagnóstico clínico por sintomas mais frequentes e faixa etária mais acometida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

As amostras de plasma sanguíneo de 61 pacientes de qualquer idade e sexo, com suspeita clínica de infecção por DENV, CHIKV ou ZIKV que foram atendidos em uma Unidade de Pronto Atendimento da cidade de Rio Branco, Acre, no período de dezembro/2017 a fevereiro/2018, foram incluídas neste estudo transversal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Hospitalar Estadual do Acre sob protocolo nº CAAE 62474816.1.0000.5009.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

As amostras foram coletadas na área de coleta de sangue da Unidade, e, posteriormente, foram analisadas por RT-rPCR realizado pela equipe profissional do Laboratório de Pesquisa em Infectologia-LAPI do Hospital Universitário Professor Edgard Santos-HUPES em Salvador, Bahia.

4.3 PARTICIPANTES

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram convidados a participar deste estudo pacientes de qualquer idade e sexo, atendidos na Unidade de Pronto Atendimento com suspeita clínica notificada pela vigilância epidemiológica da unidade de pronto atendimento de infecção por DENV, CHIK ou ZIKV.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com suspeita clínica, diagnóstico e notificação de qualquer outra suspeita de infecção viral ou fora do prazo de coleta oportuna, acima de 6 dias do início dos primeiros sintomas da doença, para diagnóstico pelas técnicas moleculares (RT-rPCR).

4.4 COLETA DE DADOS

Os participantes do estudo responderam a um questionário adaptado (**Anexo I**) das fichas de investigação de dengue e Chikungunya do Sistema de Informação de Agravos de notificação do Ministério da Saúde, 2016 (Brasília, BR) com informações clínicas e epidemiológicas¹⁰⁵.

Os testes sorológicos para pesquisa de AgNS1, IgG e IgM, foi realizado pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Acre – LACEN, os resultados foram disponibilizados em ambiente virtual, Sistema de Gerenciamento de Atendimento Laboratorial (GAL), neste trabalho observou-se estes resultados com o intuito de análise comparativa com os resultados dos testes moleculares realizados.

4.5 COLETA, MANUSEIO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a analisar as amostras de cada paciente foram coletados aproximadamente 2 ml de em sangue um *Vacutainer* BD com ETDA. Os plasmas foram obtidos por centrifugação a 3.000 rpm, durante 15 minutos, após a centrifugação foram alíquotados em criotubos em um recipiente contendo Gelox (Coolers-reusáveis a temperatura de -60°C) congelados e armazenados em seguida no -80°C no laboratório Charles Mérieux, até a extração.

4.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para verificar o diagnóstico molecular foram realizadas a extração de RNA de plasma sanguíneo e ensaio de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-rPCR). Os procedimentos de teste seguiram as recomendações do fabricante.

4.6.1 Extração dos ácidos nucleicos

Para extração dos ácidos nucleicos dos vírus foi utilizado o *Kit High Purê Viral Nucleic Acid* (Roche, Basel, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 200 µl de amostras de plasma foram tratados em um tampão de lise (contendo Proteinase K) em seguinte misturado com uma solução de alta concentração de sais pipetado em cima de uma coluna de sílica e centrifugado para deixar o líquido passar e garantir o isolamento de RNA total. Após a ligação do RNA à coluna de sílica, o sobrenadante foi removido por tampão de lavagem (60% de álcool etílico). Após as lavagens o RNA foi eluído em 60µl de água ultrapura.

4.6.2 Detecção pela RT-onestep-q-PCR

Os ácidos nucleicos extraídos foram analisados pela RT-onestep-q-PCR. Para amplificar uma fita de RNA, foi necessário como primeiro passo a criação de uma cópia de DNA dessa fita (cDNA) Pela enzima reverse transcriptase e em seguida uma amplificação exponencial usando uma Taq-Polimerase. Para esta reação foram necessários dois primers (oligonucleotídeos de 18 até 30 pares de base de DNA). Um deles (Primer forward ou Primer sense) faz parte da fita alvo e está posicionado no começo da sequência, que deveria ser amplificada e o outro (Primer reverso ou anti-sense) faz parte da fita do complemento reverso e marca o final da sequência amplificada. Na realização da produção de cDNA apenas o primer reverso é necessário.

Para realizar a q-PCR do tipo Taqman® foi necessário uma sonda (oligonucleotídeo especial marcado com dois fluoróforo). Esta sonda foi posicionada entre os dois primers também como parte do genoma do vírus como o primer forward, e possui aproximadamente 40 pares de base. Ela foi usada para quantificar os produtos de PCR depois de cada ciclo de amplificação. No fim 5' dessa sonda foi colocado um fluoróforo chamado "Reporter" e no fim 3' um outro, que chama-se "Quencher". O repórter foi estimulado com um raio de luz do certo comprimento de ondas o que provocou a transformação da energia para um outro nível de ondas para emití-las. Com o quencher próximo, ele absorve essa luz e o sinal não é emitido.

Na amplificação pelo PCR, a polimerase não pode fazer a conexão com o fim 5' da sonda e começa substituí-la, base por base pelos dNTP na solução de reação. O repórter e o quencher ficam soltos e estando livremente flutuando na solução. Nessa forma, o quencher não absorve mais a luz emitida pelo repórter, e portanto a mesma está medível.

Utilizou-se o kit: "Superscript III® one step PCR Kit with Platinum® Taq-Polymerase" da Invitrogen (Thermo-Fisher). A transcriptase reversa deste kit a "Superscript III" é muito termo - estável e permitiu a produção de cDNA até 58°C, o que facilitou a amplificação de áreas com muito G e C. A Taq-Polimerase foi bloqueada pelo anticorpo Platinum® para prevenir, que começasse a produzir fita no momento da pipetagem do máster-mix ou durante a reação de transcriptase reversa. O anticorpo foi desnaturado depois da fase de RT com aumento de temperatura a 94°C por 3 minutos. Em seguida foram realizados 45 ciclos de RT-rPCR. O primeiro com desnaturação das fitas duplas produzidas no último ciclo da PCR e, em seguida, alinhamento do primer até o final da sequência.

Cada oligonucleotídeo possui uma temperatura de melting, o que significa que a temperatura quando um mix hipotético de uma relação 1:1 do próprio oligonucleotídeo e do

complemento reverso dele estão exatamente em 50% dos possíveis casos conectados e, em 50% livre na solução. Normalmente, essa temperatura está entre 55°C até 65°C, para prevenir que um primer forward se conecte antes de uma sonda (neste caso, a polimerase vai prolongar o primer e ocupar o espaço da sonda). Enquanto que a sonda foi desenhada com uma temperatura de melting 10°C até 15°C maior do que o primer, garantindo que ela se conectasse antes do primer sendo, portanto, digerida pela polimerase.

O mix de reação foi exatamente adaptado às necessidades de cada reação: tampão contendo KCl, NaCl e MgCl₂ (ou MgSO₄) nas concentrações certas, mais os dNTP, os primers, a sonda e alguns microlitros do eluato da extração, conforme detalhado na **Tabela 3**. O equipamento usado para essas análises é o Real time PCR System 7500 da Applied Biosystems.

Tabela 3: PCR Mix para Chikungunya, Dengue e Zika.

Chikungunya vírus	Volume (µL) de uma reação
H ₂ O livre de RNase	3,25
ReactionMix: dNTPs (0,4mM) ,MgSO ₄ (3,2mM) , Buffer (2x)	12,50
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1,25
ChikV-AS-F (10 µM)	0,75
ChikV-AS-R (10 µM)	0,75
ChikV-AS-P (10 µM)	0,50
SuperScript III/ Platinum Taq Mix (25x)	1,00
RNA-Template	5,00
Master Mix	20,00
Volume total	25,00
Dengue vírus	Volume (µL) de uma reação
H ₂ O livre de RNase	2,25
ReactionMix: dNTPs (0,4mM), MgSO ₄ (3,2mM) , Buffer (2x)	12,50
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1,25
DenV-AS-F1 (10 µM)	0,50
DenV-AS-F2 (10 µM)	0,50
DenV-AS-R1 (10 µM)	0,40
DenV-AS-R2 (10 µM)	0,40
DenV-AS-R3 (10 µM)	0,40
DenV-AS-R4 (10 µM)	0,40
DenV-AS-P (10 µM)	0,40
SuperScript III/ Platinum Taq Mix (25x)	1,00
RNA-Template	5,00
Master Mix	20,00
Volume total	25,00

Zika vírus	Volume (µL) de uma reação
H2O livre de RNase	3,25
ReactionMix: dNTPs (0,4mM), MgSO4 (3,2mM) , Buffer (2x)	12,50
RNase Inhibitor (40 U/µl)	1,25
ZikaV-AS-F (10 µM)	0,75
ZikaV-AS-R (10 µM)	0,75
ZikaV-AS-P (10 µM)	0,50
SuperScript III/ Platinum Taq Mix (25x)	1,00
RNA-Template	5,00
Master Mix	20,00
Volume total	25,00

A temperatura e o tempo da RT e de alinhamento como a concentração dos oligonucleotídeos e do Mg são características para cada reação de PCR e foram definidos durante a fase de otimização da PCR descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4: Ciclo térmico para reação de PCR de Chikungunya, Dengue e Zika.

Chikungunya			
Temperatura	Tempo	Repetições	Medida
50°C	10'		
55°C	10'		
94°C	3'		
94°C	20"		
59°C	35"	x 45	Medida
Dengue			
Temperatura	Tempo	Repetições	Medida
50°C	10'		
55°C	10'		
94°C	3'		
94°C	20"		
56°C	35"	x 45	Medida
Zika			
Temperatura	Tempo	Repetições	Medida
50°C	10'		
55°C	10'		
94°C	3'		
94°C	20"		
59°C	35"	x 45	Medida

'minutos; " segundos.

Os primers utilizados na reação estão listados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Iniciadores (primers) utilizados na RT-rPCR.

Nome do Primer	Sequencia	Posição
DENV-AS-F1	5'-CRG ATY TCT GAT GAA YAA CCA ACG-3'	087 – 110
DENV-AS-F2	5'-CAG ATC TCT GGA AAA ATG AAC CAA CG-3'	087 – 112
DENV-AS-P	5'-FAM-CTW TCA ATA TGC TGA AAC GCG HGA GAA ACC G-MGB-NFQ-3'	131 – 161
DENV-AS-R1	5'-GAG AAT CTC TTC RCC AAC TGT G-3'	197 - 179
DENV-AS-R2	5'-GAG AAT CTC TTY GTC ARC TGT-3'	197 – 178
DENV-AS-R3	5'-GAG AAT CTC TTC GTC AGC TGC T-3'	197 – 179
DENV-AS-R4	5'-GAG AAT CTC TTC ACC AAC CCY T-3'	197 – 179
CHIKV-AS-F	5'- GAC GTG TTG TAC GTM GAC GA -3'	2420 – 439
CHIKV-AS-R	5'- GCA TTT TGC CTT CGT AAT GCA ACG -3'	2672- 2649
CHIKV-AS-P	5'-HEX- CCG AAR CAR TGC GGC TTC TTC AAT ATG ATG CAG ATG AAA GT-BHQ-3'	2522– 562
ZIKV-AS-F	5'- GAT TTG GAA ACG AGA GTT TCT GGT C -3'	082 – 106
ZIKV-AS-R	5'- CAT GRC CCA GCA GRA GTC C -3'	212 – 230
ZIKV-AS-P	5'- Cy5- TCC GGA TTG TCA ATA TGC TAA AAC GCG GAG TAG CCC GTG T-BHQ-3'	138 – 177

Posição referente a: DENV-Ref.Seq.:NC 001474;10.826bp; CHIKV-Ref.Seq: NC 004162.2;10.794bp; ZIKV-Ref.Seq. NC 012532;10.794bp.

Abreviações: FAM: 6-Carboxyfluorescein; HEX: Hexagon; CY5: Cyanine5; MGB: Minor-Groove Binder; NFQ: Non Fluorescent Quencher; BHQ: Black Hole Quencher

A maioria das RT-PCR para estes vírus, possuem oligonucleotídeos degenerados, o que significa, que eles têm um ou mais lugares onde se encontram bases diferentes. A IUB (International Union of Biochemistry) desenvolve um código de letras para identificar estes locais e existem letras para qualquer combinação de duas, três ou quatro bases. Por exemplo, um dos primers forward da RT-PCR de Dengue, o DenV-AS-F1, possui três lugares onde existem outras bases em diferentes fitas. A fita: 5'-CRG ATY TCT GAT GAA YAA CCA ACG-3' pode ter no local do "R" um "A" ou um "G" e nos dois locais, onde tem o "Y" pode ser um "C" ou um "T".

No primeiro passo de desenho dos oligonucleotídeos, foi usado o software ACNUC da Pôle Rhône-Alpes de Bioinformática da França, que permite a busca de sequencias em diferentes bancos de dados. Neste estudo foi utilizado o “Genbank”. Foram buscados principalmente genomas completos ou quase completos dos três vírus, conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6: Quantitativo de fitas encontradas relacionadas ao genoma viral.

Nome do Vírus	Tamanho do genoma (pares de base)	Tamanho das fitas na busca	Número de fitas encontradas
CHIKV	~11.800pb	>10.000pb	355
DENV	~11.700pb	>10.000pb	1.732
ZIKV	~10.500pb	>8.000pb	75

Fonte: Genbank, 2018.

Essas fitas foram revisadas (excluídas as fitas, que possuíam séries de “NNN”, tamanho maior do que o genoma do vírus) usando o editor de sequências BioEdit, versão 7.2.5-2013, do A.T.Hall 1999, salvas como arquivo fasta (.fst) e alinhadas pelo plugin “CLASTAL-Omega” no software Seaview 64bit. Em segundo deste alinhamento está realizada a primeira revisão profunda para buscar fitas do complemento reverso (transformar para o códon) ou fitas erradas com muitos erros de sequenciamento, restos de plasmídeos ou vetores, etc (retirar/excluir a fita). Depois, todos os GAPS criados pelo software de alinhamento, estão excluídos e o arquivo novamente alinhado. Dependendo do tamanho da fita e da quantidade das sequencias, pode ser necessário de repetir estes passos algumas vezes até sair um alinhamento limpo suficiente para os próximos passos.

Como o objetivo deste estudo é identificar o vírus com alta sensibilidade e especificidade, não foi necessário especificar uma área do genoma relacionada com alguma função. O interesse é encontrar uma área bem conservada e de tamanho correto no alvo, que não exista em outros vírus e também não em ser humano ou outros animais, devidamente testados com essa análise. Essa busca está realizada também no BioEdit usando as funções “Create consensus sequence”, que usa um Threshold de 10% ou a função “Create IUPAC consensus in selected columns”, o que não usa um Threshold. A comparação dos dois diferentes consensus permite a escolha da melhor área para essa PCR. Dependendo do grau de variedade

pode ser buscada uma sequência de 70 até 250 pares de bases, que seja a fita completa da PCR ou para cada primer e cada sonda uma área separada nos casos, que o vírus é muito variável.

A sequência do “consensus” do oligonucleotídeo ou da PCR completa, achada nessa forma, foi usada em todas as combinações de bases possíveis para uma busca no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Library of Medicine/EAU). Esta busca criou para cada sequência dessas um resultado de até 20.000 fitas similares e no final saíram várias centenas de milhares de sequências. O banco desenvolveu uma técnica para avaliar essa grande quantidade de fitas e classificá-las pela própria frequência, dessa forma foi possível de desenhar todos os primers e as sondas dessas análises.

Como último passo, foi avaliada a temperatura de melting das sequencias encontradas pelo “Oligo Analyser Tool”. Nesse trabalho, como usamos as três análises como multiplex PCR (mais que uma PCR no mesmo tubo), todos os primers funcionaram com a mesma temperatura de alinhamento, aproximadamente, 2°C a 3°C, abaixo da temperatura de melting.

4.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados clínicos e laboratoriais foram registrados em um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel versão 2013. A avaliação da frequência dos sinais e sintomas foi realizada por meio do teste exato de Fisher, para as comparações da médias foi utilizado teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para estas análises estatísticas foi utilizado o software SPSS 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA), conforme apropriado.

5 RESULTADOS

As amostras de 61 pacientes com suspeita clínica de infecção por DENV, CHIKV ou ZIKV, foram incluídos neste estudo. Suas características clínicas estão descritas na **Tabela 7**, 52% eram do sexo masculino e 47% feminino, com uma mediana de idade de 30 anos, com intervalo de 0 a 78 anos. Prevaleceu a zona urbana (86,9%) e o município de Rio Branco (93,4%) com maior número de casos registrados. O nível de escolaridade fundamental incompleto obteve maior índice (31,1%).

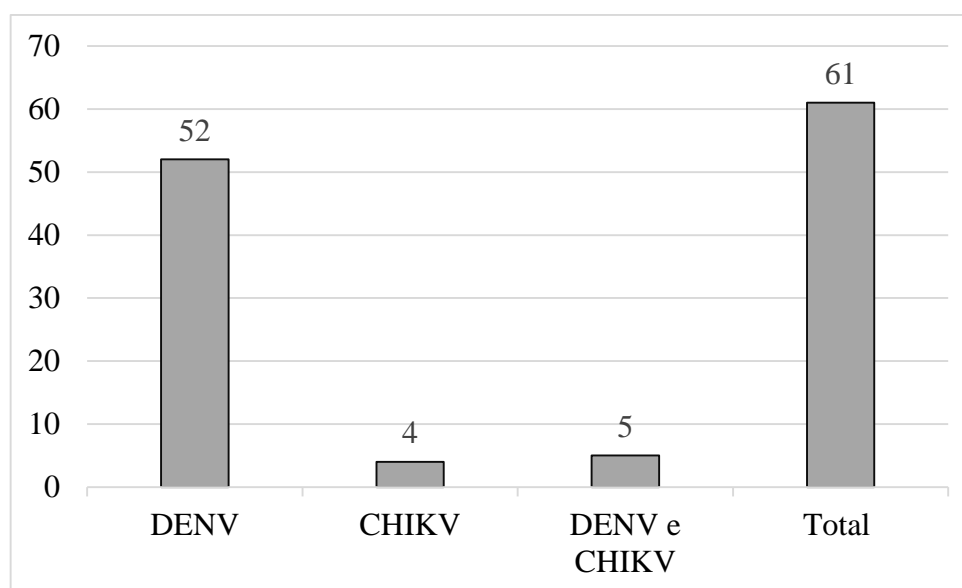
Tabela 7: Comparação das características epidemiológicas de pacientes com suspeita clínica de infecção por DENV, CHIKV e ZIKV.

Características	Número (Porcentagem)
Sexo	
Masculino	32(52,5)
Feminino	29(47,5)
Idade (Anos)	
0-10	10(16,3)
11-20	12(19,6)
21-30	7(11,4)
31-40	17(27,8)
41-50	8(13,1)
51-60	4(6,5)
61-70	1(1,6)
71-78	2(3,2)
Zona de Residência	
Urbana	53(86,9)
Rural	8(13,1)
Município de Residência	
Rio Branco	57(93,4)
Senador Guiomard	3(4,9)
Capixaba	1(1,6)
Escolaridade	

Ensino fundamental incompleto	19(31,1)
Ensino fundamental completo	7(11,4)
Ensino médio incompleto	3(4,9)
Ensino médio completo	16(26,2)
Ensino superior completo	6(9,8)
Sem escolaridade ou não soube responder	10(16,3)

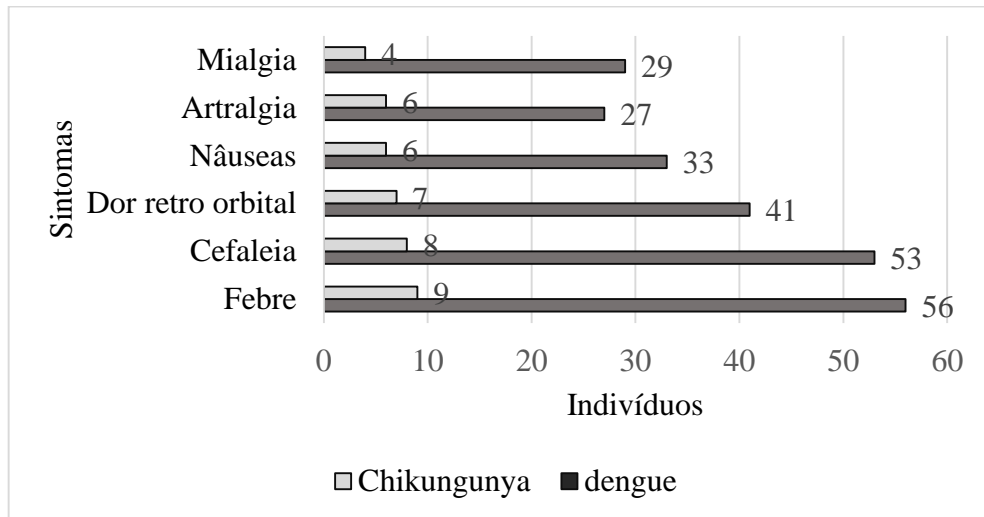
As manifestações clínicas mostraram que dos 61 pacientes 52 foram diagnosticados com suspeita clínica de dengue, 4 com suspeita de chikungunya, 5 com suspeita de infecção por ambos os vírus e não houve caso suspeito de febre do zika (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: Número de casos suspeitos de infecção de DENV e CHIKV



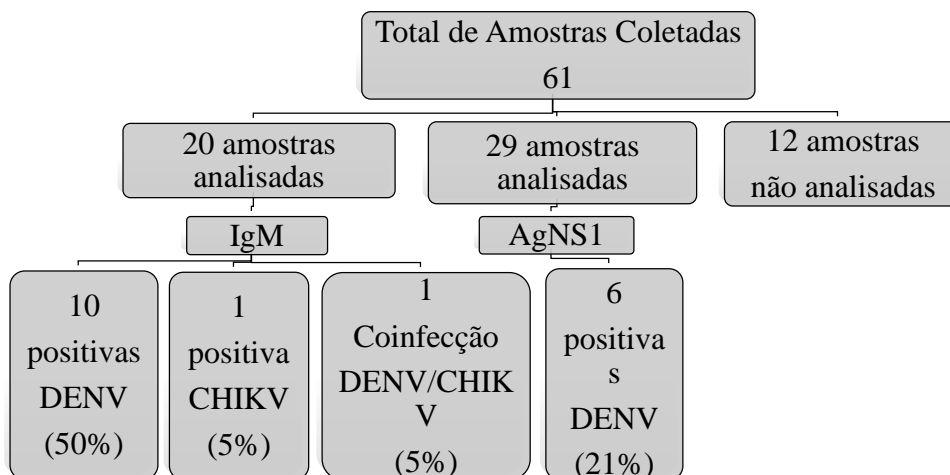
Os sintomas mais frequentes nos casos suspeitos de dengue foram febre (98,2%), cefaleia (92,9%) e dor retro-orbital (71,9%), seguidos de náuseas (57,8%), mialgia (50,8%), artralgia (47,3%), vômitos (26,3%), dor abdominal (22,8%), dor de garganta (17,5%) e exantema, conjuntivites, edema e hipotensão postural (5,2%). Enquanto que nos casos suspeitos de chikungunya todos os pacientes tiveram febre (100%), cefaleia e conjuntivites (89%), dor retro-orbital (78%), artralgia e náuseas (67%), mialgia (45%), dor de garganta (34%), dor abdominal (22%), exantema, edema e hipotensão postural (11%), não houve relato de vômito.

Gráfico 2 – Representação gráfica dos sintomas mais frequentes nos casos suspeitos de infecção por DENV e CHIKV



Do total de 61 amostras analisadas pelo LACEN, observou-se que 20 amostras foram submetidas para detecção de IgM, 10 foram positivas para DENV, 1 positiva para CHIKV e 1 positiva para ambos os vírus (alcance de 2 a 16 dias do início dos sintomas), 29 amostras foram para pesquisa de AgNS1, 6 foram positivas para DENV (alcance de 0 a 6 dias do início dos sintomas), não foi possível realizar testes em 12 amostras devido à instabilidade que estas amostras apresentaram. Não houve análises laboratoriais para ZIKV (**Figura 12**).

Figura 12: Esquema representativo de amostras analisadas por testes sorológicos para pesquisa de AgNS1 e IgM e valores absoluto e relativo de amostras positivas



Fonte: GAL/LACEN-AC, dezembro/2017 a abril de 2018.

Para a realização dos testes moleculares, foram extraídos os ácidos nucleicos de 61 amostras de plasma e testadas pelo RT-rPCR. Do total de amostras testadas 10 (16,3%) positivaram para DENV (alcance de 1 a 6 dias do início dos primeiros sintomas). Não houve detecção de CHIKV e ZIKV, a partir dos diferentes iniciadores utilizados. A descrição dos resultados estão na **Tabela 8**.

Tabela 8: Resultado dos testes de RT-rPCR com positividade quantificada.

Amostra	Dias até a coleta	PCR-DENV	PCR-CHIK	PCR-ZIKV
Z-011	3	29,76	Negativo	Negativo
Z-015	1	29, 24	Negativo	Negativo
Z-018	2	25,66	Negativo	Negativo
Z-020	1	24,22	Negativo	Negativo
Z-025	2	43,59	Negativo	Negativo
Z-027	3	24,58	Negativo	Negativo
Z-033	3	23,43	Negativo	Negativo
Z-045	6	32,60	Negativo	Negativo
Z-052	1	22,13	Negativo	Negativo
Z-054	4	29,14	Negativo	Negativo

Vale ressaltar que as amostras Z-015, Z-018, Z-020, Z-033, Z-045 e Z-052 positivas para PCR-DENV são as mesmas seis amostras positivas por pesquisa de AgNS1, ambos os testes em tempo de coleta oportuna de 1 a 6 dias do início dos primeiros sintomas. Já as amostras Z-011, Z-025, Z-027 e Z-054 obtiveram resultados positivos para PCR-DENV e negativos para a sorologia.

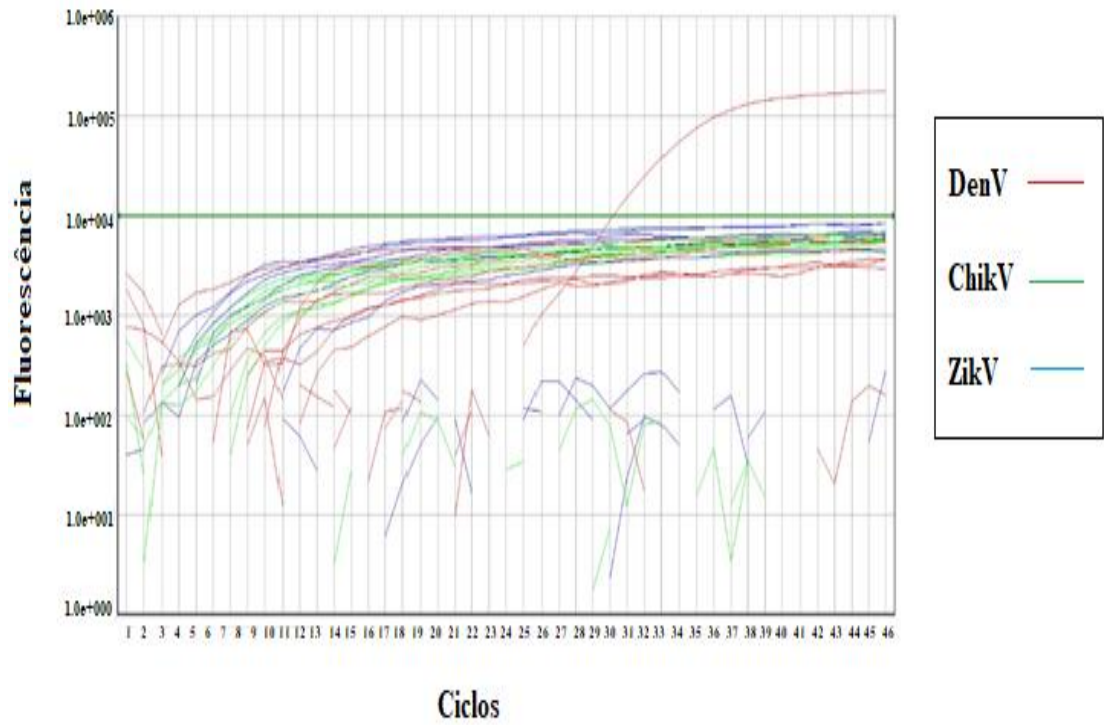
Isso significa que das 10 amostras positivas para IgM anti-DENV nenhuma foi positiva para PCR-DENV, e até mesmo a amostra de coinfeção para CHIKV e DENV foi negativa para o PCR.

O teste foi realizado por meio de RT-rPCR One Step utilizando sonda e primers específicos para detectar, o RNA destas arboviroses. Os primers eram homólogos para a região da proteína E de envelope do DENV, CHIKV e ZIKV.

A **figura 13** mostra a positividade para DENV da amostra Z054 (**Tabela 5**) ao cruzar o threshold no ciclo 29, enquanto que o controle negativo não cruza, indicando a não-

contaminação do teste.

Figura 13: Perfil do controle positivo para DENV



6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o diagnóstico clínico e molecular de pacientes que deram entrada em uma unidade de pronto atendimento de Rio Branco, Acre, com suspeita de dengue, chikungunya ou zika. Do total de 61 amostras de plasma testadas pela técnica de diagnóstico molecular (RT-rPCR), 10 amostras foram positivas para infecção pelo DENV, sem positividade para a CHIKV e ZIKV. Nos resultados dos testes sorológicos houve maior positividade para a presença de anticorpos IgM anti-DENV, seguido de AgNS1 e um caso de co-infecção por DENV e CHIKV.

A faixa etária mais acometida pertencia de 31 a 40 anos em todas as infecções, grupo com maiores chances de exposição ao mosquito, por estarem mais envolvidos em atividades e serem ocupacionalmente ativo. Esta tendência foi observada em estudos semelhantes^{1,59,63}.

Estas síndromes febris foram ligeiramente mais prevalente nos homens ou que procuraram em um número maior a UPA. Embora, estatisticamente não houve diferença significativa, padrão similar observado por outros pesquisadores^{58,59,65,104}.

A soroprevalência maior em um grupo etário ou gênero pode indicar um provável fator de risco para infecção, podendo estar relacionado a atividade cotidiana e o local onde o indivíduo frequenta habitualmente, por exemplo, escolar, trabalhador, aposentado, dona de casa¹⁰⁶.

O município de Rio Branco apresentou o maior número de casos suspeitos confirmados laboratorialmente, Esta cidade é capital do estado do Acre, localizada na região Norte do Brasil, estando próximo aos estados de Rondônia e Amazonas e limitado por países vizinhos, a Bolívia e o Peru. O fluxo de pessoas é intenso e, essa proximidade com países endêmicos, pode ser um agravante para o aumento do número de casos.

Nos casos suspeitos de dengue sintomas como febre, cefaleia e dor retro-orbital foram mais comuns quando comparados ao CHIKV, no qual febre, cefaleia e artralgia foram os sintomas mais frequentes, não havendo casos suspeitos de zika. Esses achados clínicos corroboram com outros autores^{1,3,58,59,63}.

A comparação de sinais e sintomas mostrou que os pacientes apresentaram febre em mais de 90% dos casos, embora, não observou-se manifestações clínicas mais severas. Em algumas regiões do país, onde há circulação de sorotipos diferentes de DENV, observa-se manifestações de maior gravidade, como a FHD e mesmo SCD e, mal formações congênitas relacionadas ao ZIKV, principalmente na região nordeste^{41,58,104}.

Nem sempre a clínica do paciente reflete o real agente infeccioso, daí a importância do

diagnóstico laboratorial específico. Entre 2015 e 2016, na cidade de Recife, foi realizado uma pesquisa apontando que 60% dos pacientes com sintomas característicos da dengue estavam, de fato, com chikungunya ou zika. Desta forma tem-se a necessidade de um diagnóstico mais sensível e específico em tempo hábil¹⁰⁴.

No estado Acre, em 2015, em uma amostragem, realizada pelo Instituto Evandro Chagas, foram identificados 4 casos de DENV-1 e, em 2016, 20 casos de DENV-2, sem confirmação para outro sorotipo respectivamente⁷¹. Em relação a zika, os primeiros casos foram notificados em novembro de 2015, todos no município de Rio Branco e, posteriormente, difundido pelos demais municípios^{27,70,71}.

A avaliação do quadro clínico é de grande importância, visto que as manifestações graves e atípicas devem ser conhecidas para realizar uma conduta clínica e epidemiológica mais adequada, caso contrário, pode gerar elevação dos índices de morbidade, com impacto nos custos tanto na assistência e tratamento de pacientes¹⁰⁷.

Na tentativa de obter resultados mais conclusivos, observou-se os resultados da análise sorológica realizada pelo LACEN-AC. O teste sorológico implica no ensaio imunoenzimático ELISA, é um dos métodos de escolha da maioria dos serviços públicos, por serem de baixo custo e de fácil realização. A desvantagem é a elevada ocorrência de reações cruzadas, principalmente, pelo DENV após uma infecção secundária e, mesmo, com outras arboviroses do mesmo gênero, inclusive de pessoas que não tiveram contato com o vírus mas foram vacinados com a febre amarela, gerando resultados falso-positivos^{29,30,32,97}.

Com relação a positividade detectada nas amostras, os resultados indicaram presença de DENV na maioria e, apenas uma amostra positiva para CHIKV, não foi realizada pesquisa para ZIKV. Vale ressaltar que uma destas amostras foi positiva tanto pela detecção de IgM anti-DENV, quanto para a presença de IgM anti-CHIKV, caracterizando uma infecção mista. Casos de infecção por mais de uma espécie de arbovírus em hospedeiro humano ou mosquito foram descritos por diversos estudos em áreas endêmicas onde a co-infecção são mais comuns e, podem ser facilitada pela competência vetorial em transmitir dois ou mais vírus em uma região^{108,109}.

A co-infecção pode resultar em sintomas sobrepostos, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento da doença, estudos tem apontado como uma das causas do aumento da infecciosidade ou a patogenicidade desses vírus, podendo agravar o quadro clínico do paciente^{110,111,112}. Entretanto, outros fatores devem ser considerados, como aqueles relacionados ao próprio hospedeiro: idade, raça e enfermidades crônicas^{1,15,65}.

Neste ponto, ressalta-se que para a amostra com co-infecção, durante as reações de

Nested PCR com os iniciadores em única reação para os três vírus não houve positividade, provavelmente os títulos virais já estivessem indetectáveis, embora, estudos apontam que o RNAv pode ser encontrado no período de viremia da doença em média de 0 a 5 dias do início dos primeiros sintomas, em soro ou plasma, na urina permanece por mais de 10 dias e no sêmen por mais de dois meses^{33,96}.

Desta forma seria possível detectar o material genético tanto no período virêmico quanto no período pós-viremia, no entanto, neste estudo foi possível realizar apenas com amostras de plasma. A desvantagem da RT-PCR em amostras de soro e plasma e baixa estabilidade do ácido nucleico viral¹¹³.

Alguns autores alertam para os fatores que podem inviabilizar a detecção genômica viral, principalmente, compostos por RNA de fita simples, o que torna a molécula mais suscetível as variações de temperatura e ação enzimática, podendo dificultar a detecção destas molecular por PCR^{65,66}.

Além disso, um grande número pacientes procuram a unidade de saúde após pelo menos alguns dias de doença, resultando em amostras com baixa carga viral ou mesmo sem vírus detectáveis por soro ou plasma para RT-PCR. Daí a necessidade dos métodos sorológicos para a continuidade como testes complementares, tendo em vista que tendem a ter muitos resultados falso-positivos¹¹⁴.

O diagnóstico clínico imediato aliado ao uso de técnicas de diagnóstico molecular preciso e específico podem confirmar definitivamente os vírus e sorotipos circulantes e as regiões endêmicas, auxiliando a vigilância epidemiológica na antecipação de medidas preventivas e de controle de potenciais agravos na comunidade.

7 CONCLUSÃO

As arboviroses constituem um grave problema de saúde pública nas regiões subtropicais e tropicais por oferecem condições ecológicas favoráveis e apresentarem expressividade em morbidade e/ou mortalidade. No Brasil a tríade DENV, CHIKV e ZIKV representam um sério problema de saúde pública devido em condições favoráveis para a reprodução do vetor.

O uso de técnicas de diagnóstico molecular embora tenham alto custo, são consideradas mais precisas e específicas para confirmar definitivamente o agente etiológico dessas síndromes febris, dessa forma, pode ser identificado os vírus e sorotipos circulantes e as regiões endêmicas, auxiliando a vigilância epidemiológica na antecipação de medidas preventivas e de controle de potenciais agravos na população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):7-16.
2. World Health Organization (WHO). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition [Internet]. Geneva: WHO; 2009 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: <https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>.
3. Pialoux L, Gaüzère BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect. Dis.* 2007;7(5):319-27.
4. Ministério da Saúde (MS). Chikungunya: manejo clínico [Internet]. Brasília: MS; 2017 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico.pdf.
5. Pan America Health Organization, World Health Organization (PAHO/WHO). Guidelines for surveillance of Zika virus disease and its complications [internet]. Washington: PAHO/WHO; 2016 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28405/978927_5118948_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
6. Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Introduction to virology human. 2th ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2008. 290–330 p.
7. Holmes EC, Worobey M, Rambaut A. Phylogenetic evidence for recombination in dengue virus. *Mol Biol Evol.* 1999;16(3):405-9.
8. Lindenbach BD, Rice CM. The Flavivirus: structure, replication and evolution. *Academic.* 2003;59(1):23-61.
9. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology.* 2007;5(1):1101-52
10. Blitvich BJ, Firth AE. Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses.* 2015;7(4):1927-59.
11. Sampath A, Padmanabhan R. Molecular target for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* 2009;81(1):6-15.
12. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol.* 2006; 80(23):11418-31.
13. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 2008;3(2):155-65.
14. Alvarez DE, Lella EAL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the

- 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005;339(2):200-12.
15. Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *Yale J Biol Med*. 1970;42(5):350-62.
16. Forrester NL, Palacios G, Tesh RB, Savji N, Guzman H, Sherman M, et al. Genome-scale phylogeny of the alphavirus genus suggests a marine origin. *J Virol*. 2012;86(1):2729–38.
17. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol*. 2015;96(9):2483-500.
18. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Ver*. 1994;58(3)491-562.
19. Weaver SC, Winegar R, Manger ID, Forrester NL. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*. 2012; 94(3):242-57.
20. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med*. 2015;372(13):1231-9.
21. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):359-61
22. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(13):20751.
23. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*. 2014;19(19):20761.
24. Ansar V, Valadi N. Guillain-Barré syndrome. *Prim Care*. 2015;42(2):189-93.
25. Shankar A, Patil A, Skariyachan S. Recent perspectives on genome, transmission, clinical manifestation, diagnosis, therapeutic strategies, vaccine developments, and challenges of zika virus research. *Front Microbiol*. 2017;8:1–14.
26. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects [internet]. Geórgia: CDC; 2016 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html>.
27. Secretaria Estadual de Saúde (SESACRE). Boletim da Dengue, Chikungunya e Zika vírus [internet]. Acre: SESACRE; 2016. [atualizado em 12 de junho de 2016; citado 2019, 04 de abril]. Disponível em: http://saude.ac.gov.br/wps/wcm/connect/1b01f5804d7818ec981efb1a15eb5101/Boletim+N+13.pdf?MOD=AJPERES&CONVERT_TO=url&CACHEID=1b01f5804d7818ec981efb1a15eb5101.
28. Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of

diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Suppl):30-7.

29. Lanciotti RS, et. al. Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30(3):545-51.

30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Testing for Dengue Virus [internet]. Geórgia: CDC; 2016 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: https://www.cdc.gov/dengue/healthcareproviders/testing/index.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdengue%2Fclinicallab%2Flaboratory.html.

31. Singh RK, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, et al. Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of zika virus: An update. *Front Microbiol.* 2018;8:1-17.

32. Moreli ML, Costa VG. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. *Viol Disc.* 2013;1(1):1-8.

33. Calvet GA, Santos FB, Sequeira PC. Zika virus infection: Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2016;29(5):459-66.

34. Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):487-524.

35. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *Biomed Res Int.* 2015;3(1):1-8.

36. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of Dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 2014;22(3): 138-46.

37. Vasilakis N, Weaver SC. The History and Evolution of Human Dengue Emergence. *Adv Virus Res.* 2008;72(1):1-76.

38. Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of Dengue. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62(1):71-92.

39. Huang YJ, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses.* 2014;6(11):4703-30.

40. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44(1):649-88

41. Santos CLS, Bastos MMA, Sallum MAM, Rocco IM. Molecular characterization of dengue viruses type 1 and 2 isolated from a concurrent human infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2003;45(1):11-6

42. Henchal EA, Putnak JR. The Dengue Viruses. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):376-96.

43. Bartenschlager R, Miller S. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.*

2008;3(2):155-65.

44. Huang YJ, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses*. 2014;6(11):4703-30.

45. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25.

46. Alvarez DE, Lella EAL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology*. 2005;339(2):200-12.

47. Zhou Y, Mammen MP, Klungthong C, Chinnawirotpisan P, Vaughn DW, Nimmannitya S, et al. Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3'untranslated region of dengue viruses and disease syndrome. *J. Gen. Virol.* 2006;87(9):2595-603.

48. Markoff, L. 5'- and 3'- Noncoding Regions in Flavivirus RNA. *Adv. Virus Res.* 2003;59(1):177-228.

49. Clemons A, Haugen M, Flannery E, Tomchaney M, Kast K, Jacowski C, et al. *Aedes aegypti*: an emerging model for vector mosquito development. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010;10(1):1-17.

50. Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.* 2010;12(4):272-9

51. Joshi V, Sharma RC, Sharma Y, Adha S, Sharma K, Sing H, et al. Importance of socioeconomic status and tree holes in distribution of *Aedes* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Jodhpur, Rajasthan, India. *J Med Entomol.* 2006;43(2):330-6.

52. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes infect.* 2000;2(9):1041-5

53. Wang, Ni H, Xu R, Barrett AD, Watowich SJ, Gubler DJ, et al. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol.* 2000;74(7):3227-34.

54. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(7):518-28.

55. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004;113(7):946-51.

56. Ministério da Saúde (MS). Dengue: Diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança [Internet]. Brasília: MS; 2016 [atualizado em 14 de setembro de 2018; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>.

57. Rosen L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of

dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26(3):337-43.

58. Araújo FM, Nogueira RM, Araújo JM, Ramalho IL, Roriz ML, Melo ME, et al. Concurrent infection with dengue virus type-2 and DENV-3 in a patient from Ceará, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(8):925-8.

59. Guzman MG, Kouri G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):522-3.

60. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin microbiol rev.* 2009;22(4):564.

61. Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina, Ribeirão Preto.* 1999;32(1):15-20.

62. Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost.* 2009;102(6):1042-9

63. Guzman MG, Vázquez S, Kouri G. Dengue: where are we today? *Malays J Med Sci.* 2009;16(3):4-11.

64. George FHM. Abordagem Clínica para casos de dengue. In: saúde D-Gd, editor. Lisboa: Ministério da saúde; 2008.

65. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(12 Supl):7-16.

66. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009;9(4):523-40.

67. Howe, GM. A world geography of human diseases. *Med Hist.* 1979;23(2):242-3.

68. Câmara FP, Theophilo RLG, Santos GT, Pereira SRFG, Câmara DCP, Matos RRC. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(2):192-6.

69. Osanai CH, Travassos RAP, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Dengue Outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1983;25(1):53-4.

70. Ministério da Saúde (MS). Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica até a semana 52 de 2018 [Internet]. Brasília: MS; 2019. [atualizado em 14 janeiro 2019; citado 2019, 04 de abril]. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>.

71. Ministério da Saúde (MS). Dengue: notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação: Acre: Casos Prováveis por Ano notificação segundo Sorotipo [Internet]. Acre: MS; 2019. [atualizado em 04 de abril de 2019; citado 2019, 26 de abril]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/denguebac.def>.

72. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol*. 2012;55(3):191-203.
73. Delang L, Li C, Tas A, Quérat G, Albulescu IC, Burghgraeve DT, et al. The viral capping enzyme nsP1: a novel target for the inhibition of Chikungunya virus infection. *Sci Rep*. 2016;22(6):31819.
74. Kumar S, Mamidi P, Kumar A, Basantray I, Bramha U, Dixit A, et al. Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of Chikungunya virus: potential use in basic research. *Arch Virol*. 2015;160(11):2749-61.
75. Presti AL, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M, et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(12):925-32.
76. Sudeep AB, Parashar D. Chikungunya: an overview. *J Biosci*. 2008;33(4):443-9.
77. Coffey LL, Forrester N, Tsetsarkin K, Vasilakis N, Weaver SC. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*. 2013;8(2):155-76.
78. Chompoosri J, Thavara U, Tawatsin A, Boonserm R, Phumee A, Sangkitporn S, et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2016;23(9):227.
79. Campos GS, Bandeira ACA, Rocha VFD, Dias JP, Carvalho RH, Sardi SI. First detection of Chikungunya virus in breast milk. *The Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(10):1015-17.
80. Kam YW, Ong EK, Rénia L, Tong JC, Ng LF. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect*. 2009;11(14-15):1186-96.
81. Lum FM, Ng LF. Cellular and molecular mechanisms of Chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res*. 2015;120:165-74.
82. Miranda IA, Oliveira CC, Poian AT. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. *BioMed Research International*. 2013;2013(1):1-11.
83. Suhrbier A, Jaffar-bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic Alphaviruses an overview. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(7):420-9.
84. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLOS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2137.
85. Walling AD, Dickson G. Guillain-Barré syndrome. *Am Fam Physician*. 2013;87(3):191-7.
86. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53: Clinical features. 1955;49(1):28-32.
87. Cunha RV, Trinta KS. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem*

Inst Oswaldo Cruz. 2017;112(8):523-31.

88. Figueiredo ML, Figueiredo LT. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(6):677-83.

89. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol.* 2007;152(4):687-96.

90. Cook S, Holmes EC. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch Virol.* 2006;151(2):309-25.

91. Buckley A, Gould EA. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. *J Gen Virol.* 1988;69(Pt 8):1913-20.

92. Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Viral Immunol.* 2003;16(3):259-78.

93. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(3):411-5.

94. Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Tided M, Machieng P, Pretrick M, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3188.

95. Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo SM, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa) - 2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(2):e2681.

96. Pinto VLJ, Luz K, Parreira R, Ferrinho P. Zika Virus: A Review to Clinicians. *Acta Med Port.* 2015;28(6):760-5.

97. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-9.

98. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;6(19):20720.

99. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon JP, et al. Co infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(2):381-2.

100. Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.

101. Macnamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48(2):139-45.

102. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956;50(3):238–42.
103. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. *Ann Trop Med Parasitol* 1975;69(1):49-64.
104. Magalhaes T, Braga C, Cordeiro MT, Oliveira ALS, Castanha PMS, Maciel APR, et al. Zika vírus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(11):1-13.
105. Ministério da Saúde (MS). Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Ficha de Investigação Dengue e Chikungunya [Internet]. Brasília: MS; 2016 [atualizado em 12 de setembro de 2017; citado 2019, 24 de abril]. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/FICHA_DENGCHIK.pdf.
106. Teixeira MG, Costa MC, Barreto ML, Mota E. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences? *Cad Saude Publica.* 2005;21(5):1307-15.
107. Marques CDL, Duarte ALBP, Ranzolin A, Dantas AT, Cavalcanti NG, Gonçalves RSG, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 - Diagnosis and special situations. *Rev Bras Reumatol.* 2017;57(2):421-37.
108. Costa CA, Thézé J, Komninakis SCV, Sanz-Duro RL, Felinto MRL, et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(10):1472-4.
109. Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, Young MC, Byas AD, Murrieta RA, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun.* 2017;8(1):15412.
110. Le Coupanec A, Tchankouo-Nguetcheu S, Roux P, Khun H, Huerre M, Morales-Vargas R, et al. Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):e1708.
111. Furuya-kanamori L, Liang S, Milinovich G, Magalhaes RJS, Clements ACA, Hu W, Brasil P, et al. Co-distribution and co-infection of chikungunya and dengue viruses. *BMC Infect Dis.* 2016;16(84):1-11.
112. 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):2273-9.
113. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, preparation and storage of specimens for molecular methods; approved guideline. CLSI document MM13-A. Pennsylvania, USA: CLSI, 2005.

114. Pabbaraju K, Wong S, Gill K, Fonseca K, Tipples GA, Tellier R. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 2016;83(1):66-71.

ANEXO

QUESTIONÁRIO DA PESQUISA

Participante (a):	COD	
Data de entrevista: __/__/____	IDAD	
Data de Nascimento: __/__/____	Idade: ____	Sexo: (1) M (2) F
SEXO		
1. Município:	MUN	
2. Zona: (1) Urbana (passe p/Q4) (2) Rural (responda Q3)	SITI	
3. Área: (1) Quilombola (2) Indígena (3) Assentamento (0) Outro	ÁRE	
4. O(A) Sr.(a) já frequentou/frequenta escola? (1) Sim (2) Não	FREQ	
5. Qual sua escolaridade? Grau: _____ (1) Sem escolaridade (0) Outro: _____	ESC	
6. Em sua opinião, qual a sua cor ou raça? (1) Branca (2) Parda/mulata/morena (3) Negra (4) Amarela/oriental (japonesa, chinesa, coreana) (5) Indígena (7) NS/NR	COR	
7. O(A) Sr.(a) é o chefe da família? (1) Sim (passe p/Q10) (2) Não (responda Q7.1)	CHEF	
7.1. Se não, qual o grau de parentesco? (1) Pai / Mãe (2) Cônjuge (3) Filho(a) (4) Irmão (a) (7) NS/ NR (8) NSA (é o chefe) (0) Outro: _____	PAREN	
8. Qual o sexo do(a) Chefe de Família? (1) M (2) F (7) NS/NR	SEXCH	
9. Qual a escolaridade do Chefe de Família? Grau: _____ (0) Outro: _____ (1) Sem escolaridade	ESCCH	
10. O (A) Sr.(a) / (Chefe da Família) trabalha? (1) Sim (2) Não (3) Apos/Pensionista (7) NS/NR	TRCH	
11. Vínculo Trabalhista? (1) Formal (2) Informal (7) NS/NR (8) Não trabalha (9) Apo/pensionista	FORM	
12. Na casa tem luz elétrica? (1) Sim (2) Não (7) NS/NR	LUZ	
13. Qual o tipo de esgotamento sanitário da casa? (1) Rede pública (2) Fossa séptica (3) Fossa rudimentar (4) Vala/ Céu aberto (7) NS/NR	ESGOT	

14. De onde vem a água que a família utiliza? (1) Rede pública (2) Poço/Cacimba/Barreiro (3) Cisterna (água da chuva) (4) Outro: _____ (7) NS/NR	ORIGAG	
15. Qual o tratamento da água de beber? (1) Filtrada (2) Fervida (3) Clorada (4) Coada ou sem tratamento 5) Mineral (6) outro: _____ (7) NS/NR (8) NSA	AGBEB	
16. Quantas pessoas que moram na casa?	TOTPES	
17. Data da notificação?	DATNOT	
18. Data dos primeiros sinais e sintomas?	PRISINT	
19. Agravo suspeito? (1) DENV (2) CHIKV (3) ZIKV	AGSUSP	
20. SINAIS E SINTOMAS		
<input type="checkbox"/> febre <input type="checkbox"/> vômitos <input type="checkbox"/> edema <input type="checkbox"/> diarreia <input type="checkbox"/> náuseas <input type="checkbox"/> dor abdominal <input type="checkbox"/> hiperemia conjuntival <input type="checkbox"/> dor retrorbital <input type="checkbox"/> dor de garganta <input type="checkbox"/> tosse <input type="checkbox"/> cefaleia <input type="checkbox"/> extremidades frias <input type="checkbox"/> hipotensão postural <input type="checkbox"/> pulso débil ou indetectável <input type="checkbox"/> Artralgia <input type="checkbox"/> irritabilidade <input type="checkbox"/> sonolência <input type="checkbox"/> parestesia <input type="checkbox"/> astenia <input type="checkbox"/> tremores <input type="checkbox"/> diplopia <input type="checkbox"/> visão turva <input type="checkbox"/> coma <input type="checkbox"/> disfagia <input type="checkbox"/> disфонia <input type="checkbox"/> disartria <input type="checkbox"/> Síndrome Guillan Barré <input type="checkbox"/> exantemas <input type="checkbox"/> petéquias <input type="checkbox"/> prurido <input type="checkbox"/> bolhas vesiculares.		