

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ZIKA VÍRUS ATENDIDOS EM DUQUE DE CAXIAS, RJ.: UMA ANÁLISE PÓS-EPIDEMIA

Raphael Rangel das Chagas

Duque de Caxias

2019

Raphael Rangel das Chagas

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ZIKA VÍRUS ATENDIDOS EM
DUQUE DE CAXIAS, RJ.: UMA ANÁLISE PÓS-EPIDEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: **Dr. Sergian Vianna Cardozo**

Duque de Caxias

2019

C433a

Chagas, Raphael Rangel das.

Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes com diagnóstico sugestivo de zika vírus atendidos em Duque de Caxias, RJ: uma análise pós-epidemia / Raphael Rangel das Chagas. – 2019. 71 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo”.

Referências: f. 54-65.

1. Biomedicina. 2. Arbovirose. 3. Diagnóstico laboratorial. 4. Zika vírus. 5. Síndrome de Guillain-Barré. I. Cardozo, Sergian Vianna. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD – 610.28

RAPHAEL RANGEL DAS CHAGAS

**ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E LABORATORIAIS DE
PACIENTES COM DIAGNÓSTICO SUGESTIVO DE ZIKA VÍRUS ATENDIDOS EM
DUQUE DE CAXIAS, RJ.: UMA ANÁLISE PÓS-EPIDEMIA**

Aprovado em _____ de _____ de 2019.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes
Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO)

Prof. Dra. Livia Melo Villar
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Paulo André da Silva
Universidade do Grande Rio (Unigranrio)

**Duque de Caxias
2019**

Dedico essa dissertação a minha avó Benita Siqueira Rangel

In memoriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me sustentado em toda a minha jornada acadêmica e nos momentos difíceis renovou minha fé.

À minha família em especial aos meus pais Sidney Pereira das Chagas e Marilene Siqueira Rangel, quando no início ainda sem bolsa me proveram todos os recursos para que pudesse iniciar a trajetória no Mestrado acadêmico. Ao meu irmão Vinicius Rangel das Chagas, por toda parceria de sempre.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Sergian Vianna Cardozo, um profissional íntegro, sério e com um coração enorme. Hoje o tenho como exemplo de profissional e pessoa, em todos os momentos compreensível e mostrando que tudo se resolve com sabedoria. Obrigado por todos os ensinamentos professor, você é incrível!

À equipe do Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas, em especial aos alunos de Iniciação Científica que participaram ativamente do projeto. Nicole Lima, Júlia Lourenço, Raissa Fares, Paulo Sergio Rangel. Aos alunos da Pós graduação Hury Helen Souza de Paula e André Frederico Martins, e a recém doutora Viviane Camara Maniero, pela parceria e apoio de sempre. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu amigo Prof. Daniel Pereira Reynaldo, por todas as palavras de incentivo e por me apresentar o programa de pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), e por me mostrar como ser um Biomédico feliz.

Ao meu amigo Luiz Guilherme Hendriscky, que em todo momento de desânimo vinha como uma palavra amiga me dando forças pra continuar e me fazer acreditar cada vez mais na ciência brasileira. Obrigado amigo.

A Secretaria de Saúde da Prefeitura de Duque de Caxias e aos agentes de saúde, por nos possibilitar realizar esse projeto.

Ao Dr. Renato Aguiar por abrir as portas do Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro pra realizarmos nossos testes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ter financiado minha bolsa durante um período.

**“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”**
(Geroge Bernard Shaw)

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV), endêmico em alguns países do mundo, tem se mostrado como um problema de saúde mundial com manifestações neurológicas graves, como a síndrome congênita do ZIKV e a síndrome de Guillain-Barre no Brasil. Por ser um arbovírus, o controle eficiente da disseminação do vetor *Aedes* esta intrinsecamente relacionado a políticas públicas de saneamento, investimentos para o desenvolvimento de insumos biotecnológicos e as consequências de processos de crescimento urbano desordenado. Com isso esse estudo busca analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes atendidos no Hospital Municipal Moacir Rodrigues do Carmo, com diagnóstico sugestivo de ZIKV, através de análise dos prontuários e coleta das amostras sanguíneas que foram realizadas entre janeiro à junho de 2018, para a realização do imunodiagnóstico e também submetidas a análise molecular. Do total de 94 pacientes com doença febril aguda, 37 (39,4%) apresentaram suspeita clínica de DENV, 28 (29,8%) ZIKV, 29 (30,8%) CHIKV. Na análise individual das arboviroses observou-se que não houve diferença significativa dos casos suspeitos de DEN ($p = 0.9278$) e de CHIK ($p = 0,5319$), entre ambos os gêneros. Contudo, os casos suspeitos de ZIK foram mais observados em mulheres (22; 78,6%) com $p = 0,0072$. Das 94 amostras analisadas através do teste imunoenzimático vimos que um total de 06/94 (6,38%) amostras sororreagentes para IgM e 12/94 (12,76%) para IgG, anti-DENV, enquanto que 06/94 (6,38%) foram sororreagentes para IgM e 38/94 (40,42%) para IgG, anti-ZIKV. Foram observadas ainda 02/94 (2,12%) amostras indeterminadas para IgM anti-DENV. Quanto a análise molecular, após realização de RT-qPCR de 94 amostras, 04 (3,76%) foram consideradas positivas para ZIKV o que determina que esses pacientes estavam no curto estagio de viremia. Observamos, que os casos suspeitos de ZIKV, em sua ampla maioria, não foram confirmados pelo diagnóstico laboratorial, que ratifica o fato dos sintomas comumente observados entre as arboviroses serem inespecíficos, e que o diagnóstico clínico epidemiológico não é uma boa ferramenta diagnóstica para caracterizar a infecção por ZIKV. Ressalta-se que a diminuição dos casos de ZIKV após a epidemia de 2016 vem sendo explicada pela imunidade cruzada observada em pacientes com infecção prévia por DENV e também em pacientes que receberam a vacina da febre amarela.

Palavras-chave: arboviroses, diagnóstico laboratorial, zika vírus, dengue, febre amarela.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV), endemic in some countries of the world, shows as a worldwide health problem with severe neurological manifestations, such as a congenital ZIKV syndrome and a Guillain-Barre syndrome in Brazil. Because it is an arbovirus, the efficient control of Aedes vector dissemination is intrinsically related to public sanitation policies, investments for the development of biotechnological inputs and as a consequence of disorderly urban growth processes. With this research study, we analyze the clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients treated at the Moacir Rodrigues do Carmo Municipal Hospital, with a suggestive diagnosis of ZIKV, through the analysis of medical records and collection of blood tests that were performed between January and June. 2018 for immunodiagnosis and also subjected to molecular analysis. Of the 94 patients with acute febrile illness, 37 (39.4%) had suspected DENV, 28 (29.8%) ZIKV, 29 (30.8%) CHIKV. In the individual analysis of arboviruses, it was found that there was no significant difference in suspected cases of DEN ($p = 0.9278$) and CHIK ($p = 0.5319$), between the two genders. However, suspected cases of ZIK were more frequently observed in women (22; 78.6%) with $p = 0.0072$. Of the 94 analyzes analyzed by the total immunoassay test of 06/94 (6.38%), recorded seroreactive for IgM and 12/94 (12.76%) for IgG, anti-DENV, while 06/94 (6, 38%) were seroreactive for IgM and 38/94 (40.42%) for IgG, anti-ZIKV. We also observed 02/94 (2.12%), undetermined for anti-DENV IgM. Regarding molecular analysis, after performing RT-qPCR on 94 samples, 04 (3.76%) were positive for ZIKV or to determine which patients were in the short stage of viremia. We note that most suspected cases of ZIKV have not been confirmed by laboratory diagnosis, which have ratified or observed facts of common symptoms observed among arboviruses that are nonspecific, and that clinical epidemiological diagnosis is not a good diagnostic way to characterize a ZIKV infection. It is noteworthy that the decrease in ZIKV cases after the 2016 epidemic has been explained by the cross immunity observed in patients with previous DENV infection and also in patients who received the yellow fever vaccine.

Key words: arboviruses, laboratory diagnosis, zika virus, dengue, yellow fever.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Imagem de Microscopia crio eletrônica do ZIKV imaturo Vista em superfície (a,c), coradas radialmente. Setas pretas grossas indicam a densidade entre o núcleo do RNA interno e a membrana viral. A seta de dupla extremidade indica as camadas interna e externa da membrana. Setas negras numeradas e finas em b e d dão o eixo de simetria icosaédricos. A unidade assimétrica é mostrada como um triângulo preto em a e c. Barra de escala, 100 Å (PRASAD et al. 2017).21
- Figura 2.** Organograma para diagnóstico laboratorial, de fase aguda e convalescença, para as arboviroses DEN, CHIK e ZIK. Adpatado de Rodriguez-Morales (2015)......25
- Figura 3.** Mapa de Duque de Caxias dividido em distritos30

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Tabela 1. Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK	31
Quadro 1. Interpretação dos resultados imunodiagnósticos para DENV e ZIKV	33
Tabela 2. Primetime usado para detecção de ZIKV: Sequências e posição de anelamento dos oligonucleotídeos que compõem o Primetime desenhado para identificação do ZIKV em amostras clínicas.....	34
Tabela 3. Dados demográficos e características clínicas dos casos suspeitos de arboviroses, Duque de Caxias (UPA Beira Mar), no período de janeiro a junho de 2018.....	37
Tabela 4. Dados demográficos dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (UPA Beira Mar) no período de janeiro a Junho de 2018.....	38
Tabela 5. Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para ZIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.....	39
Tabela 6. Imunodiagnóstico (IgM e IgG) anti-ZIKV e anti-DENV de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.....	40
Tabela 7. Dados epidemiológicos retrospectivos de ZIK de 2015 a 2018, no Brasil, Rio de Janeiro e Duque de Caxias.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIK	Doença Chikungunya
CHIKV	Vírus chikungunya
DEN	Doença Dengue
DENV	Dengue vírus
DENV-1	Dengue vírus tipo 1
DENV-2	Dengue vírus tipo 2
DENV-3	Dengue vírus tipo 3
DENV-4	Dengue vírus tipo 4
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa e da Polimerase em Cadeia em Tempo Real
SE	Semana Epidemiológica
SMS-PMDC	Secretaria Municipal de Saúde de Duque de Caxias
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UF	Unidade Federativa
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
YF	Doença Febre Amarela
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIK	Doença Zika
ZIKV	Zika vírus
NPDI	Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas da Unigranrio
LVM-UFRJ	Laboratório de Virologia Molecular da Universidade Federal do Rio de Janeiro
TIS	Tempo de início dos Sintomas
CT	<i>Cycle thresholds</i>
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS.....	17
2.2. ZIKA VÍRUS	18
2.2.1. <i>Perfil epidemiológico no Brasil</i>	18
2.2.2. <i>Agente etiológico</i>	20
2.2.3. <i>Manifestações clínicas</i>	21
2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	23
2.4. IMUNIDADE CRUZADA: DENGUE, ZIKA E FEBRE AMARELA.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	29
4.2. ÁREA DE ESTUDO.....	29
4.3. ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS.....	30
4.4. COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	31
4.5. IMUNODIAGNÓSTICO.....	32
4.6. IDENTIFICAÇÃO VIRAL EM SORO.....	33
4.6.1. <i>Extração do RNA viral</i>	33
4.6.2. <i>Reação da transcriptase reversa e da polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)</i>	33
4.7. ÉTICA DA PESQUISA	34
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS	36
5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO	36
5.2. BIOLOGIA MOLECULAR (RT-qPCR)	38
5.3. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA).....	39
5.4. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ZIK	42
6. DISCUSSÃO	45
6.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO	45
6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	46

6.3. ANÁLISE PÓS EPIDEMIA DE 2016	48
7. CONCLUSÃO	52
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	66
ANEXO 1	67
ANEXO 2	68
ANEXO 3	69
ANEXO 4	71

1. INTRODUÇÃO

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

Dentre os vírus que apresentam maior circulação atualmente no Brasil estão o DENV, CHIKV e ZIKV (BRASIL, 2015). DENV e ZIKV pertencem a família Flaviviridae e CHIKV à família Togaviridae. Os sinais e sintomas relacionados com as arboviroses causadas por estes agentes são bastante semelhantes, o que acaba interferindo no diagnóstico clínico preciso dessas doenças (RODRIGUEZ-MORALES, 2015). Além disso, ainda não se conhece profundamente os desdobramentos da associação desses arbovírus em um mesmo paciente, fato possível de ocorrer por estes circularem, muitas vezes, na mesma região geográfica e serem transmitidos pelos mesmos vetores, *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus* (ROTH, 2014).

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

No Rio de Janeiro em 2016, segundo dados do Boletim Epidemiológico, foram notificados 83.962 casos prováveis de DEN, correspondente a uma taxa de incidência de 507,3

casos/100 mil habitantes. No entanto em 2017, segundo o levantamento da secretaria estadual de saúde foram notificados 10.697 casos suspeitos de DEN, que corresponde a uma taxa de incidência de 64,3 casos/100 mil habitantes (SES, 2017). Já em 2018 foram notificados 15.143 casos prováveis de DEN no Estado, correspondendo a uma baixa taxa de incidência de 91,0 casos por 100 mil habitantes (SES, 2019).

Com relação aos casos de ZIK, em 2016 foram notificados 68.943 casos prováveis no Estado do Rio de Janeiro, correspondendo a uma taxa de incidência de 416,6 casos/100 mil habitantes (SES, 2016). Porém, em 2017 houve uma sensível redução, onde foram notificados 2.508 casos suspeitos de ZIK, que correspondeu a uma taxa de incidência de 15,1 casos/100 mil habitantes (SES, 2017). Em 2018 foram notificados 2.418 casos prováveis de ZIK no Estado, correspondendo a uma taxa de incidência de 14,5 casos por 100 mil habitantes (SES, 2019).

Os desdobramentos clínicos mais importantes relacionados com o ZIK foram os casos associados à Síndrome de Guillain-Barré em adultos (BROUTET et al. 2016; MALONE et al. 2016) e a Síndrome Congênita do ZIK (MIRANDA-FILHO et al. 2016; BRASIL et al. 2016; CALVET et al. 2016; BESNARD et al. 2016). Com isso, em 1º de fevereiro de 2016, a OMS decretou a infecção por ZIK uma emergência em saúde pública de preocupação mundial, em virtude das alterações neurológicas e de um surto de microcefalia, reportados no Brasil em 2015 (WHO, 2016).

Como vimos acima, tem havido uma grande redução nos casos de ZIK com o passar dos anos (2017 a 2019). Estudos vem apontando para uma possível reação de imunidade cruzada com DENV e a vacina do YFV. No caso do DENV, por ser da mesma família e gênero viral (NGONO, 2019), e no caso da vacina, por ter uma homologia de 65% da proteína NS5, que também é vista na infecção pelo ZIKV (BLOM, 2018; DUBANKOVA, 2019).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

A saúde sendo analisada como um objeto, abrange todas as necessidades associadas ao fenômeno saúde-enfermidade e nessa ótica adquire força tecnológica para solucionar os problemas individuais e coletivos (TEIXEIRA, 1989).

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

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

O termo “doenças negligenciadas” foi proposto em 1970 pela Fundação Rockefeller configurando todas as doenças endêmicas causadas por agentes infecciosos e parasitários em populações de baixa renda. A OMS e a organização Médicos Sem Fronteiras estabeleceram a classificação por doenças “globais” (Tipo I) “negligenciadas” (Tipo II) as transmissíveis que apresentam maior ocorrência nos países em desenvolvimento, e “mais negligenciadas” (Tipo III), exclusivas dos países em desenvolvimento (DE SOUZA, 2010). Nesse contexto a Doença de Chagas, Leishmanioses, Lepra, Malária, Filarioses, Hanseníase, Tuberculose, DEN, YF e outras arboviroses resultam, principalmente em crianças, no desenvolvimento cognitivo prejudicado, morte e aumento da pobreza no país (OMS, 2013). Nos últimos anos todas estas doenças representaram somente 1,3% dos registros de novos medicamentos (IPEA, 2011), o que certamente minimiza a expectativa de uma melhora progressiva deste quadro nevrálgico atualmente estabelecido para os doenças negligenciados.

2.2. ZIKA VÍRUS

2.2.1. Perfil epidemiológico no Brasil

Especulações demonstraram que o ZIKV foi introduzido no Brasil, possivelmente durante a Copa do Mundo de Futebol de 2014, dado o início da epidemia nas capitais nordestinas onde ocorreram jogos, ou por meio de atletas da canoagem, de vários países do Pacífico afetados pela ZIK, que vieram disputar o campeonato mundial no Rio de Janeiro em 2014 (HEUKELBACH, 2016). Outra hipótese aponta que o ZIKV teria ido da Polinésia Francesa até a Oceania, e de lá viajou até a Ilha de Páscoa (Chile), em humanos infectados, em seguida partiu rumo à América Central e ao Caribe (METSKY et al. 2017). Em agosto de 2018 uma pesquisa publicada na *International Journal of Genomic*, mostrou que por meio de um estudo filogenômico, o ZIKV chegou no Brasil em 2013 trazido por imigrantes haitianos e/ou soldados brasileiros que cumpriam missão de paz no Haiti (CAMPOS, 2018).

ZIKV, por ser da mesma família, é relacionado ao YFV e DENV, também transmitidas pelo *Ae. aegypti*, este último com potencial de desencadear a febre hemorrágica (VASCONCELOS, 2015). Os primeiros casos de infecção por ZIKV foram identificados no 1º semestre de 2015 no Rio Grande do Norte e da Bahia, antecedendo os demais relatos que ocorreram em outros estados do Nordeste (ZANLUCA et al. 2015; CAMPOS et al. 2015; CALVET et al. 2016; BRASIL et al. 2016).

Reconhecida, quase que simultaneamente em 2015, na Bahia e em São Paulo, a circulação da ZIK foi rapidamente confirmada pelo uso de métodos moleculares e, posteriormente, no Rio Grande do Norte, Alagoas, Maranhão, Pará e Rio de Janeiro, mostrando uma capacidade de dispersão impressionante (HEUKELBACH, 2016). Os sinais e sintomas clínicos, semelhantes aos de outras arboviroses, geraram dificuldade no diagnóstico clínico, contudo os achados laboratoriais indicaram que não se tratava de DENV e CHIKV (VASCONCELOS, 2015). A autoctonia pelo ZIKV foi confirmada no Brasil em abril de 2015 (BRASIL, 2015).

Dados de 2015 mostraram 103 casos suspeitos de microcefalia relacionada ao ZIKV no estado do Rio de Janeiro, correspondendo a 3,45% do total de casos brasileiros (SVS, 2016), estabelecendo-se dessa forma o “Protocolo de Vigilância e Resposta a ocorrência de Microcefalia Relacionada à Infecção pelo Vírus Zika”.

Em 1º de fevereiro de 2016, a OMS decretou a infecção por ZIK uma emergência em saúde pública de preocupação mundial e reforçou esse decreto no ano de 2018, em virtude das

alterações neurológicas reportadas (síndrome de Guillain-Barré) e de um surto de microcefalia, reportados no Brasil em 2015, após eventos semelhantes na Polinésia Francesa em 2014 (WHO, 2016; MOREIRA et al, 2018). Em março de 2016, a OPAS desenvolveu definições de casos e orientação de vigilância para ZIK e complicações associadas, para auxiliar no diagnóstico e tratamento dessa arbovirose e no mesmo ano a OMS declarou que ZIK e suas complicações continuam a ser um desafio, exigindo uma ação coordenada a longo prazo, mas não mais representavam uma emergência de Saúde Pública (PAHO, 2016).

Devido a transmissão em curso e a ocorrência de complicações associadas e risco de recorrência de grandes surtos, países e territórios da Região das Américas e outras regiões onde existem vetores competentes, precisam continuar a realizar a vigilância do ZIKV e suas complicações, implementando com isso medidas de prevenção e controle (JUNIORCAIUS et al. 2017).

No Brasil, de acordo com dados de 2016 foram registrados 215.319 casos prováveis de ZIK, onde foram confirmados laboratorialmente 8 óbitos (BRASIL, 2016).

Em 2017 foram registrados 17.338 casos prováveis de ZIK no país, com taxa de incidência de 8,4 casos/100 mil habitantes; destes, 8.703 (50,2%) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de ZIK, segundo regiões geográficas, demonstra que as regiões Centro-Oeste e Norte apresentam as maiores taxas de incidência: 38,8 casos/100 mil hab. e 12,5 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Entre as UFs, destacam-se Mato Grosso (65,0 casos/100 mil habitantes), Goiás (56,6 casos/100 mil habitantes), Tocantins (46,2 casos/100 mil habitantes) e Roraima (40,1 casos/100 mil habitantes) (BRASIL, 2017).

Um outro Boletim epidemiológico do Ministério da Saúde que controla e avalia as alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados a ZIK e outras etiologias infecciosas, relata que, entre 2015 e 2017, houveram notificações de 15.150 casos suspeitos relacionadas à infecção pelo ZIK e outras etiologias infecciosas, dos quais 1.987 (13,1%) foram excluídos, após criteriosa investigação, por não atenderem às definições de casos vigentes. Do total de casos notificados, 2.903 (19,2%) permaneciam em investigação até o final de 2017. Quanto aos casos com investigação concluída, 6.718 (44,3%) foram descartados, 3.037 (20,1%) foram confirmados, 310 (2,0%) foram classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação e 195 (1,3%) como inconclusivos. Entre os casos confirmados, 1.639 (61,9%) estavam recebendo cuidados em puericultura, 975 (36,8%) em estimulação precoce e 1.679 (63,5%) no serviço de atenção especializada. A maioria dos casos notificados concentra-se na região Nordeste do país (60,7%), seguindo-se as regiões Sudeste (23,8%) e Centro-oeste (7,3%). Os cinco estados com maior número de casos notificados são

Pernambuco (16,9%), Bahia (16,2%), São Paulo (9,0%), Paraíba (7,4%) e Rio de Janeiro (7,4%) (BRASIL, 2017).

Boletins epidemiológicos de 2018 mostraram uma queda em todo o território nacional da infecção por ZIKV, onde foram registrados 8.680 casos prováveis da doença, com uma incidência de 4,2 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2019). A mesma queda pode ser vista no Estado do Rio de Janeiro onde foram notificados 2.418 casos prováveis, correspondendo a uma taxa de incidência de 14,5/100 mil habitantes (SES, 2019).

2.2.2. Agente etiológico

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, assim como DENV, e dessa forma evolutivamente existe uma proximidade entre esse vírus com outros arbovirus transmitidos por mosquitos como o YFV e o vírus da Febre do Nilo Ocidental (JUNIOR et al. 2015). Seu genoma viral é composto de RNA fita simples de polaridade positiva. Seu invólucro viral (**Figura 1**) contém duas proteínas de superfície (M e E), semelhante a outros *Flavivirus*, além de outras proteínas não estruturais (NS3 envolvida na helicase de RNA e protease e NS5 relacionada a polimerase de RNA, dependente de RNA) podem também ter relação a outras funções regulatórias, como o controle da replicação, transcrição, tradução e resposta imune, durante a replicação intracelular, ou seja são proteínas que participam de etapas fundamentais no processo de replicação viral (KUNO et al. 2007).

O primeiro isolamento deste vírus ocorreu em 1947 na floresta de Zika, em Uganda, a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* que servia de sentinela para estudo vigilância da YF (DICK et al. 1952). De acordo com a análise filogenética do genoma viral, observou-se que provavelmente o ZIKV surgiu nesta localidade em torno de 1920, e após duas fases de migração para o Oeste Africano deu início as duas linhagens africanas. Possivelmente a de Uganda, deve ter migrado na década de 1940 para a Ásia, dando origem a linhagem asiática, com surtos registrados na Indonésia e a epidemia na Micronésia (FAYE et al. 2014). Essa linhagem asiática também foi a responsável pelos casos de transmissão autóctone deste vírus, recentemente ocorridos no Brasil (ZANLUCA et al. 2015). Atualmente o ZIKV apresenta dois genótipos que estão circulantes nas Américas (ENFISSI et al. 2016, G.KUNO e CHANG et al. 2007). Segundo o trabalho de Faye et al. (2014), num estudo realizado com 37 isolados do ZIKV, oriundos de mosquitos, pacientes e animais, obtidos na África, parece ter ocorrido recombinação gênica e alterações no padrão de glicosilação da proteína E, provavelmente derivado de adaptações ao vetor *Ae. dalzieli*. Outros estudos realizados por Freire et al. (2105)

em 17 sequências genômicas do vírus, indicam que ocorreram mudanças no uso de códons para a proteína NS1 na linhagem asiática do ZIKV podendo ter relação com a reprodução e o título viral em humanos.

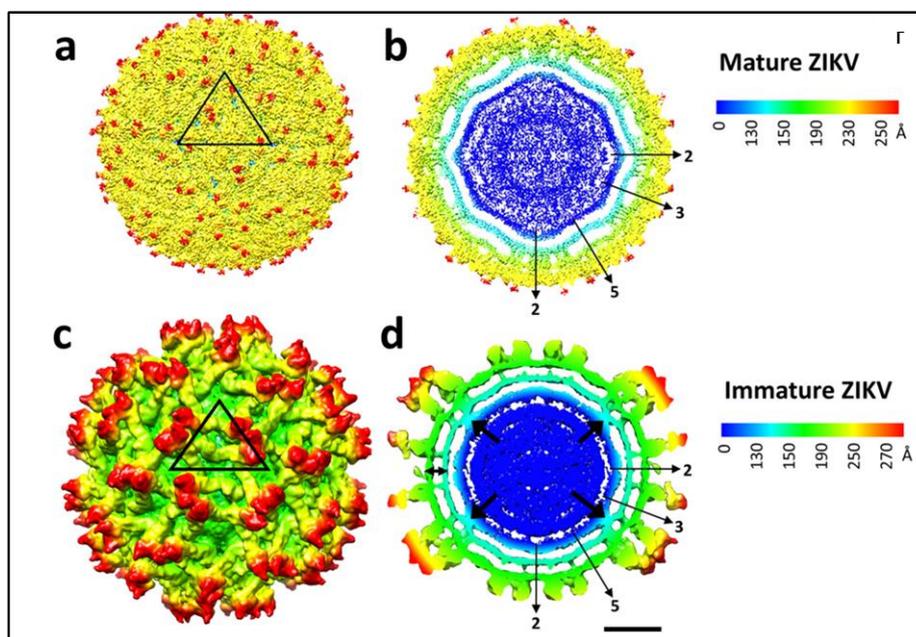


Figura 1. Imagem de Microscopia crio eletrônica do ZIKV imaturo. Vista em superfície (a,c), coradas radialmente. Setas pretas grossas indicam a densidade entre o núcleo do RNA interno e a membrana viral. A seta de dupla extremidade indica as camadas interna e externa da membrana. Setas negras numeradas e finas em b e d dão o eixo de simetria icosaédricos. A unidade assimétrica é mostrada como um triângulo preto em a e c. Barra de escala, 100 Å (PRASAD et al. 2017).

2.2.3. Manifestações clínicas

A infecção por ZIKV tem causado doença exantemática febril, acompanhada por discreta ocorrência de outros sintomas gerais, tais como cefaleia, exantema, mal-estar, edema e dores articulares, essas últimas por vezes intensas. No entanto, apesar da aparente benignidade da doença, mais recentemente na Polinésia Francesa e no Brasil, quadros mais graves, incluindo comprometimento do sistema nervoso central (síndrome de Guillain-Barré, mielite transversa e meningite) associados a ZIK têm sido comumente registrados (VASCONCELOS, 2015).

Os sintomas incluíam artralgia, edema de extremidades, febre baixa, *rash*

maculopapular (frequentemente pruriginoso), dores de cabeça, dor retro-orbitária, sem conjuntivite não purulenta, vertigem, mialgia e distúrbio digestivo (ZANLUCA et al. 2015). Alguns autores chamam a atenção para a ausência de febre nos casos, ou presença de febre baixa e de curta duração, e do prurido e exantema serem as manifestações mais frequentes (BRASIL et al. 2016). Há relato de parestesia em mãos, pés e na face na fase aguda da doença acompanhado dos sintomas exantema, dor retro orbitária e edema em mãos e pés (CAO-LORMEAU et al. 2016; BRASIL et al. 2016).

Uma grave complicação da ZIK que ocorre através da transmissão perinatal é a síndrome congênita da ZIK, na qual crianças e fetos podem ter diversos sinais e sintomas relacionados, entre eles: microcefalia, artrogripose (MARTINES et al. 2016), hipertonia, mal formação dos rins e fígado, epilepsia, morte da massa encefálica, hidropisia fetal, alterações de retina e nervo óptico e esofagite (EICKMANN et al. 2016). Em alguns casos, pode resultar em abortamento espontâneo. Ainda que existam todos esses sintomas relacionados à síndrome congênita da ZIK, nem todos os bebês nascidos com a infecção por ZIK irão ter todos os sintomas relacionados à síndrome, em alguns casos, aqueles que não sofrem de microcefalia no início de sua vida pós uterina, podem vir a apresentar posteriormente um retardo no crescimento cefálico e com isso, ter a microcefalia pós natal (CDC, 2017). Apesar dessas informações derivadas de diversos estudos realizados, ainda se faz necessário outros estudos para melhor entender os mecanismos de transmissão vertical do ZIKV (EICKMANN et al. 2016).

Outro importante comprometimento neurológico provocado pela ZIK é a síndrome de Guillain-Barré, que é uma doença autoimune aguda provocada por algum agente infeccioso. A maior parte dos casos de síndrome de Guillain-Barré ocorre entre 1 a 3 semanas após um processo infeccioso, respiratório ou gastrointestinal, na maior parte das vezes. Os primeiros relatos de caso com associação a ZIK ocorreram durante uma epidemia na Micronésia em 2007 e na Polinésia Francesa em 2013 (OEHLER et al. 2014; LEITE, 2015; BRASIL, 2015). A síndrome de Guillain-Barré é uma polirradiculoneuropatia autoimune, aguda e potencialmente grave. Manifesta-se como paralisia arreflexa ascendente com ou sem alterações sensitivas, iniciando-se em membros inferiores com fraqueza, que progride em horas a alguns dias. Há disestesia frequentemente associada (VAN DEN BERG et al. 2014). Cerca de 50% dos pacientes tem paresia facial na síndrome de Guillain-Barré. O VII nervo craniano é o mais afetado, mas, ocasionalmente, os pares XII, X, II, IV e VI, assim como o XI, são acometidos. O envolvimento dos nervos cranianos pode levar a alterações na deglutição e na manutenção de ventilação adequada. A maioria dos pacientes necessita hospitalização e em até 30% dos

casos precisam de ventilação mecânica (WIM ANG et al. 2004; CDC, 2017).

Atualmente, há muito o que ser estudado sobre essa síndrome e suas correlações, como a associação da ZIK com a DEN em um mesmo indivíduo, que pode levar a complicações neurológicas e autoimunes, conforme os dados epidemiológicos evidenciaram na Polinésia Francesa na epidemia de 2013 (ROTH et al. 2014). Há relatos também de casos envolvendo indivíduos com DEN que além da síndrome de Guillain-Barré tiveram outras manifestações neurológicas, como paralisia periférica múltipla, paralisia facial periférica, encefalite e mielite (FERREIRA et al. 2005). Na infecção pelo CHIKV também foram relatados indivíduos com apresentações típicas de envolvimento do sistema nervoso central e periférico, com mieloneuropatias, encefalites, além da síndrome de Guillain-Barré (AZEVEDO et al. 2015).

Há ainda séries de casos no Brasil mostrando maior prevalência de cardiopatia em crianças com a síndrome congênita da ZIK, como em um estudo transversal no Recife, no qual de 103 crianças estudadas, 13,5% apresentavam alterações cardíacas congênitas (CAVALCANTI et al, 2017). Em um estudo transversal no Rio de Janeiro, com 120 crianças com história de exposição intrauterina confirmada ao ZIKV, mostrou que 10,8% apresentaram cardiopatia (CAVALCANTI et al. 2017; OROFINO et al. 2018).

2.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As manifestações clínicas da DEN, ZIK e CHIK, na maioria dos casos, se apresentam de forma muito parecida, dificultando o diagnóstico clínico diferencial entre estas três arboviroses. Desta forma, os exames complementares laboratoriais são imprescindíveis para determinação de um diagnóstico conclusivo (**Figura 2**).

O diagnóstico laboratorial das infecções pelo ZIKV baseia-se principalmente em testes de biologia molecular e imunológico. A amplificação do RNA viral através da *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) pode ser feita em diversos materiais biológicos, como soro, líquor, líquido amniótico, saliva e urina (KHURSHID, 2019). Nos pacientes com suspeita de infecção por transmissão horizontal, sua positividade está associada com a fase aguda da infecção entre três e sete dias após o início dos sintomas, quando ocorre viremia geralmente em baixos níveis (CALVET et al. 2016). Quando disponíveis, são os testes de escolha para diagnóstico após a fase aguda. A interpretação dos testes sorológicos para ZIKV, como ELISA para IgM e IgG deve ser feita com cuidado, visto que esses apresentam reatividade cruzada para outras arboviroses, especialmente em pacientes previamente infectados com outros flavivírus, como o DENV. Para confirmação deve ser feita sorologia

para DENV e após duas semanas repetir o exame, onde é feita a comparação de títulos, só é considerada confirmatória a positividade de ZIKV em títulos em que os anticorpos neutralizantes forem quatro vezes superiores à DENV (NUNES, 2016).

No caso de DENV, a secreção da proteína viral não estrutural NS1 de células infectadas pelo vírus possibilita o diagnóstico precoce, pois NS1 pode ser detectada em amostras de sangue e de tecidos em até nove dias após o início da febre (SIMMONS et al. 2012). O diagnóstico definitivo das infecções por DENV, CHIKV e ZIKV é realizado com a detecção viral por meio da RT-PCR durante a fase aguda da infecção, que ocorre desde o primeiro até o quinto dia do início dos sintomas (L'HUILLIER, 2017). Essa análise molecular possibilita a diferenciação destas arboviroses, resultando em diagnóstico conclusivo. Faye et al. (2014) relataram que o PCR em tempo real, em contraste com os ensaios sorológicos convencionais, tem muitas vantagens, incluindo a rapidez, especificidade, avaliação quantitativa, baixa taxa de contaminação e facilidade de padronização, permitindo a otimização do diagnóstico diferencial das infecções arbovirais em locais onde estes arbovírus cocirculam. Contudo, os testes de biologia molecular ainda são caros, não estão amplamente disponíveis e limitam-se ao diagnóstico na curta fase de viremia dessas arboviroses.

A confirmação laboratorial da etiologia viral para essas três doenças febris agudas tem sido realizada por meio de teste sorológico específico (ELISA) para cada vírus. Esse teste é preconizado a partir do 6º dia de infecção, ou seja, após o estabelecimento do quadro clínico. A soroconversão para IgM caracteriza a fase aguda da infecção, assim como o aumento em 4 vezes do título de IgG em amostras pareadas do soro do paciente, indica que houve uma infecção prévia. Devido à reação cruzada do DENV com outros flavivírus, como o ZIKV, os resultados sorológicos não apresentam uma sensibilidade confiável, enfatizando a necessidade de se priorizar o diagnóstico diferencial na fase aguda da doença (BRASIL, 2015). Por isso, os testes moleculares são mais confiáveis e são utilizados comumente para confirmar casos suspeitos (CAMPOS et al. 2015, MALAKAR et al. 2016), em paralelo alguns pesquisadores também utilizam a cultura celular com o vírus inoculado para o diagnóstico, porém é um procedimento que demanda tempo e deve ser realizado em laboratório com nível de biossegurança 3.

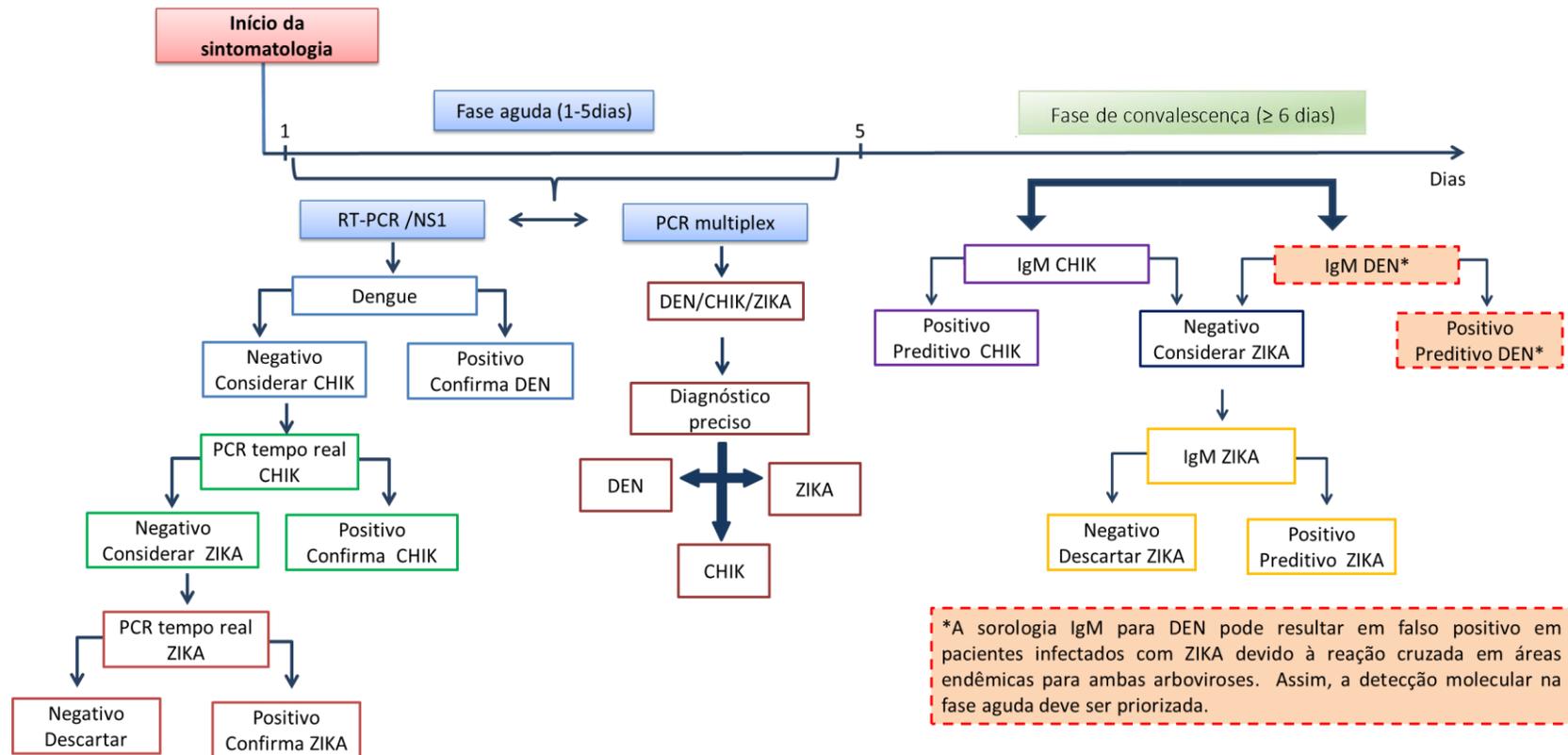


Figura 2 - Organograma para diagnóstico laboratorial, de fase aguda e convalescência, para as arboviroses DEN, CHIK e ZIK. Adaptado de Rodriguez-Morales (2015).

2.4. IMUNIDADE CRUZADA: DENGUE, ZIKA E FEBRE AMARELA

Os vírus manipulam a biologia celular para utilizar a linhagem monocítica/macrofágica como vias de disseminação, persistência a longo prazo nos tecidos e replicação viral. Vírus entram nas células através de endocitose, fagocitose, macropinocitose ou fusão de membrana. Esses processos desempenham papéis importantes nos mecanismos que contribuem para a patogênese desses agentes e no estabelecimento de persistência e latência do genoma viral. Na infecção viral, os monócitos respondem com uma expressão elevada de moléculas de sinalização pró-inflamatórias e respostas antivirais, como é mostrado no caso do ZIKV (NIKITINA, 2018).

ZIKV é um flavivírus antígenicamente relacionado que compartilha reatividade cruzada nas respostas de anticorpos e células T, e co-circula no Brasil, em específico no Rio de Janeiro, com outros arbovírus (NGONO, 2019).

A organização das proteínas do ZIKV revela que ele tem uma estrutura quase idêntica ao DENV, incluindo o arranjo da proteína E. Além de semelhanças estruturais entre as partículas virais, os principais alvos para as respostas de anticorpos em infecções, são a proteína estrutural E e a proteína não estrutural NS1, ambas partilham, de forma substancial, identidade de sequência de aminoácidos. Pesquisando e observando o relacionamento estrutural e genético entre ZIKV e DENV, frente a uma resposta imunológica foi comprovado que uma infecção pré existente de DENV pode imunizar, mesmo que parcialmente, para ZIKV (PRIYAMVADA, 2017).

Sabemos que a resposta imunológica frente aos vírus podem acontecer de diversas maneiras, umas das mais comuns é o reconhecimento de algum epítipo do patógeno. Quando analisamos essa resposta imunológica de forma cruzada, que existe entre ZIKV e DENV, podemos constatar que tal resposta acontece pelo reconhecimento da proteína NS1 em ambas as infecções, sendo assim, uma resposta igualitária para DENV e ZIKV (ABBAS, 2015).

Com relação a imunidade cruzada de ZIKV com o YFV, estudos mostram que a imunização via vacina da YFV pode também imunizar para a infecção pelo ZIKV. A vacina do YFV foi desenvolvida e distribuída globalmente e até hoje, mais de 300 milhões de doses da vacina foram administradas aos seres humanos. A semelhança morfoestrutural descrita acima, entre ZIKV e DENV, também é observada entre ZIKV e YFV, e possivelmente a vacina pode vir a produzir um efeito benéfico nas respostas imunológicas cruzadas. A NS5 é uma proteína multifuncional, altamente preservada, que constitui a polimerase viral. Análise das sequências de proteína NS5 da vacina viva atenuada do YFV que é utilizada atualmente, quando

comparada com a do ZIKV revela uma homologia de 64% com a NS5 do ZIKV. Esta similaridade vem sendo alvo de diversas pesquisas e estudos nos quais vem confirmando a reatividade cruzada entre as células T-CD8, responsáveis pela resposta imunológica de receptores de vacinação do YFV com o ZIKV (BLOM, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes atendidos no Hospital Municipal Moacir Rodrigues do Carmo (UPA Beira Mar), com diagnóstico sugestivo de ZIK.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar, através dos sinais e sintomas visto nos prontuários, os pacientes suspeitos de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK) atendidos na unidade de saúde estudada, através de um formulário de coleta de dados estruturado;
- Correlacionar os sinais e sintomas identificados nos prontuários com a faixa etária e gênero, de acordo com a arbovirose (DEN, ZIK e CHIK);
- Correlacionar os dados do diagnóstico clínico para ZIKV, com aqueles obtidos pela análise laboratorial (biologia molecular e imunodiagnóstico);
- Analisar a ocorrência dos casos da ZIK no estado do Rio de Janeiro nos anos de 2015 a 2018, frente aqueles identificados em Duque de Caxias (presente estudo).

4. METODOLOGIA

4.1. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

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

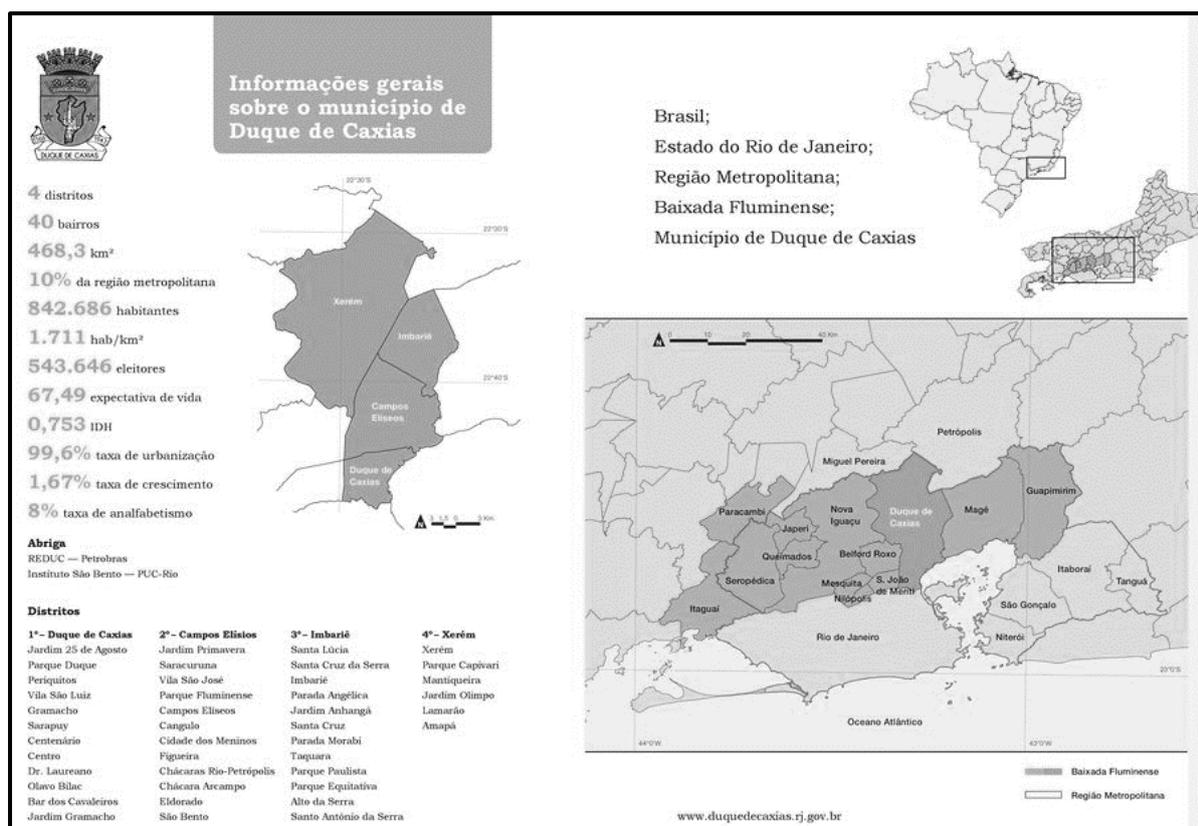
4.2. ÁREA DE ESTUDO

Inicialmente em 1950, o município de Duque de Caxias foi dividido de dois distritos: Duque de Caxias e Imbariê. Quatro anos depois, foram criados os distritos de Campos Elyseos e Xerém, ambos desmembrados do distrito de Imbariê e anexados ao município de Duque de Caxias. Atualmente são considerados quatro distritos: Duque de Caxias, Campos Elyseos, Imbariê e Xerém (**Figura 3**).

Duque de Caxias é um município brasileiro do interior estado do Rio de Janeiro, integrante da Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, situado na região da Baixada Fluminense, figurando como o terceiro município mais populoso do estado, depois da capital e de São Gonçalo. Com uma população de 914.383 habitantes, dividida em 469.938 (51%) mulheres e 444.445 (49%) homens (IBGE, 2010; 2016) e possui um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de 0,711.

A UPA Beira Mar, *locus* da pesquisa, localizada na mesma área do Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo, 1º distrito de Duque de Caxias, é o principal estabelecimento de saúde pública deste município. Esta Unidade funciona 24 horas e é responsável pelo atendimento diurno de cerca de 600 pacientes por dia.

Figura 3. Mapa do Município de Duque de Caxias dividido em distritos.



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

4.3. ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS

A análise dos prontuários foi realizada de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), tendo um perfil de estudo quantitativo e descritivo realizado em parceria com a SMS-PMDC, na UPA Beira Mar, localizada no Hospital Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo em Duque de Caxias. Os prontuários foram fotografados e armazenados em formato JPG e em seguida salvos em pastas com identificação das iniciais dos pacientes e por numeração para serem analisados *a posteriori* por meio de um formulário estruturado (**Anexo 1**).

Aqueles prontuários que apresentaram sintomatologia que não direcionavam para uma das arboviroses estudadas foram alocados nas categorias DEN/ZIK e DEN/CHIK (**Tabela 1**).

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

CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AVALIAÇÃO				
DEN	CHIK	ZIK	DEN/ZIK	DEN/CHIK
Discrasia	Artralgia moderada a intensa	Hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido	Dor nos olhos	Mal estar
Eventos sistêmicos	Artrite	Exantema pruriginoso	Edema	Artralgia moderada/intensa
			Artralgia	
			Mialgia	Exantema
			Cefaleia	Mialgia
			Evento sistêmico	

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

- *Critérios de inclusão:* pacientes, sem distinção de gênero e idade, que tenham diagnóstico clínico-epidemiológico de DEN, CHIK ou ZIK; pacientes que apresentem endereço de Duque de Caxias, RJ.; pacientes atendidos de janeiro a junho de 2018.
- *Critérios de exclusão:* pacientes com sintomatologia que não caracterize as arboviroses (DEN, CHIK e ZIK); morador de área que não abranja aquela do presente estudo; pacientes cujos prontuários não tenham os dados avaliados no estudo preenchidos corretamente ou ilegíveis.

A coleta de dados foi realizada com base nas variáveis de caracterização amostral, tais como: idade, gênero e sintomas.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS SANGUÍNEAS

Foram coletadas amostras sanguíneas de pacientes que deram entrada na UPA Beira Mar de Janeiro de 2018 a Junho de 2018 com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). A equipe responsável pela coleta foi composta por estudantes de pós-graduação

(PPGBIOTRANS) e de graduação da UNIGRANRIO, bolsistas de iniciação científica vinculados ao NPDI. Tais estudantes foram divididos em duplas, de forma a cumprirem as atividades de coleta, de segunda a sexta-feira, nos turnos manhã (8h às 12h) e tarde (13h às 17h).

A coleta de sangue total (10-15 mL) foi feita através de venopuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, de acordo com as diretrizes de coleta de sangue da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). As amostras foram colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugadas para retirada do soro. Os soros foram identificados, aliquotados e transportados em recipientes com gelo seco para o LVM-UFRJ onde foram armazenados em tubos plásticos tipo *Eppendorf* e congelados em *freezer* a -80°C , permanecendo até a realização das análises laboratoriais diagnósticas (sorologia e biologia molecular).

4.5 IMUNODIAGNÓSTICO

Para a realização do diagnóstico sorológico, as amostras foram submetidas à testes sorológicos que permitam identificar a presença de anticorpos IgM e IgG, para ZIKV e DENV, separadamente. Os quatro kits utilizados para detecção de anticorpos IgM e IgG para estes arbovirus (ZIKV e DENV) foram da XGEN (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brasil). As reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante, e se baseiam em testes de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para verificar as reações antígeno-anticorpo, que acabam por se tornar detectáveis através de reações enzimáticas. As microplacas utilizadas nos kits ZIKV e DENV são revestidas com antígeno sintético da proteína NS1 do ZIKV e DENV, respectivamente. Na primeira incubação, a fase sólida é tratada com amostras diluídas diretamente nos poços e se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a ligação antígeno-anticorpo. Após a lavagem, todos os componentes presentes nos poços são descartados, mantendo apenas a ligação antígeno-anticorpo. Na segunda incubação, a ligação antígeno-anticorpo é detectada através da adição de anticorpos dirigidos contra imunoglobulinas da espécie anti hIgM e anti hIgG, marcados com peroxidase (HRP). A enzima capturada na fase sólida reage ao substrato/cromogênio e gera um sinal óptico que é proporcional à quantidade de anticorpos anti-ZIKV ou anti-DENV (IgM ou IgG), presentes na amostra.

As amostras foram consideradas positivas para ZIK ou DEN quando os valores se mostraram maiores do que o *cut-off*, de forma que após a leitura da densidade óptica no final do

teste, foi feito um cálculo do ponto de corte, a partir de onde os resultados foram interpretados como reagentes. Já os negativos, foram baseados nos resultados abaixo do *cut-off*, como não reagentes ou indeterminados (**Quadro 1**). Também foram consideradas positivas as amostras cujo o valor do *cut-off* foi 4 vezes maior para IgM quando comparado com IgG, seja para ZIKV ou DENV.

No caso dos testes utilizados para a investigação de anticorpos contra ZIKV, as amostras foram consideradas positivas (IgM ou IgG), apenas quando negativas para IgM ou IgG de DENV e vice-versa. Essa restrição foi feita devido à possíveis resultados falso-positivos ocasionados por reações cruzadas entre ZIKV e DENV numa área endêmica para arboviroses.

Quadro 1. Interpretação dos resultados imunodiagnósticos para DENV e ZIKV.

DENV		ZIKV	
S/Co	Interpretação	S/Co	Interpretação
<0,9	Negativo	<0,9	Negativo
0,9 – 1,1	Indeterminado	0,9 – 1,1	Indeterminado
>1,1	Positivo	>1,1	Positivo

S/Co – Valor de corte

4.6 IDENTIFICAÇÃO VIRAL EM SORO

4.6.1. Extração do RNA viral

Para a extração de RNA viral das amostras de soro, foi utilizado o kit *ReliaPrep*[®], da empresa Promega (EUA), seguindo as especificações do fabricante.

A quantificação do RNA foi realizada com o espectrofotômetro NanoDrop[®]. Os RNAs eluídos foram mantidos em freezer -80°C (COSTA et al. 2009) até a amplificação através da RT-qPCR.

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

Para detecção da presença de ácido nucléico de ZIKV, cada amostra de RNA obtida pela extração foi submetida à uma RT-qPCR. Para isso, utilizamos um kit de RT-qPCR *One Step*, contendo reagentes capazes de realizar a reação da transcrição reversa utilizando

oligonucleotídeos específicos para a região alvo gerando um cDNA complementar específico para a região de amplificação. Para investigar a presença do ZIKV foram utilizados iniciadores e sondas específicas para a região alvo do genoma viral. Os iniciadores e sondas utilizados foram sintetizados numa estratégia de *Primetime* qPCR® (*IDT, Integrated DNA Technologies*). Nessa metodologia, uma mistura da sonda e oligonucleotídeos específicos produzida numa mistura contendo todos os reagentes necessários para amplificação da região de interesse (**Tabela 2**) (LANCIOTTI et al. 2007). O kit One-step RT-PCR utilizado foi o kit *TaqMan*® *Fast Virus 1-Step Master Mix* (Thermofisher Scientific).

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

Tabela 2- *Primetime* usado para detecção de ZIKV: Sequências e posição de anelamento dos oligonucleotídeos que compõem o *Primetime* desenhado para identificação do ZIKV em amostras clínicas.

Oligo	Sequência (5' -> 3')	Posição de Anelamento	Fluoróforo
Senso	CCGCTGCCCAACACAAG	1086-1102	
Anti-Senso	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162-1139	FAM
Sonda	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	1107-1137	

4.7. ÉTICA DA PESQUISA

Conforme resolução 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde, esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) e aprovada sob protocolo CAAE 70324417.1.0000.5283 (**Anexo 2**). Todos os participantes tomaram ciência da pesquisa, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 3**) que foi disponibilizado antes do procedimento de coleta de sangue dos mesmos.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Para a coleta de dados e análise do perfil epidemiológico da DEN, CHIK e ZIK em Duque de Caxias foram considerados os casos notificados na base de dados (municipal) do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Dessa forma, foi possível separar os casos notificados e casos confirmados, considerando o total de registros de residentes no município entre os anos 2015 e 2018. Foram excluídos do estudo análise os casos notificados de residentes em outros municípios.

Os dados repassados pela Coordenadoria de Imunização do Município de Duque de Caxias, considerando a população vacinada contra a YF (doses aplicadas) foram extraídos do Sistema de Informações do Programa Nacional de Imunizações (SIPNI).

As tabulações e análises dos dados obtidos do SINAN e SIPNI foram efetuadas através do programa *Tabwin 32* e do aplicativo *Microsoft Office Excel 2010*. Para critério de seleção, utilizaram-se as variáveis: ano primeiros sintomas e município de residência; bairro de residência; sexo; diagnóstico final e evolução.

5. RESULTADOS

5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Entre os meses de janeiro a junho de 2018 foram coletadas 94 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). Destas amostras, 37 (39.4%) foram classificadas como DEN, 28 (29.8%) como ZIKV e 29 (30.8%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK.

Na última estimativa demográfica para a região estudada (IBGE, 2016), foi observado um quantitativo total da população de Duque de Caxias de 914.383 habitantes, sendo 444.445 (49%) do gênero masculino e 469.938 (51%) do gênero feminino. O cálculo da idade mediana dos pacientes do presente estudo foi de 41 anos (entre 11 e 73). A maioria dos casos foi do gênero masculino (48/94; 51%).

Na análise individual das arboviroses observou-se que não houve diferença significativa dos casos suspeitos de DEN ($p = 0.9278$) e de CHIK ($p = 0,5319$), entre ambos os gêneros (**Tabela 3**). Contudo, os casos suspeitos de ZIK foram mais observados em mulheres (22; 78,6%) com $p = 0,0072$.

Levando em consideração as faixas etárias estratificadas em <20 e ≥ 60 anos (392201 habitantes) e 20 a 59 anos (522182 habitantes) foi observado diferença significativa para os casos prováveis de ZIK e CHIK, com $p = 0,0041$ e $p = 0,0181$, respectivamente (**Tabela 3**). Entretanto, com relação a ZIK esta diferença significativa ocorreu basicamente impulsionada pelo número de mulheres suspeitas, enquanto que em CHIK houve o contrário, os homens suspeitos foram responsáveis pela diferença significativa.

Quanto aos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, entre os 37 casos suspeitos de DEN, a mialgia (27/37; 73%), artralgia leve (24/37; 64,9%) e cefaleia (28/37; 75.7%) foram os mais observados. O exantema (27/28; 96,4%) e o prurido (25/28; 89,3%) foram mais observados nos pacientes suspeitos de ZIK, que apresentaram ainda 22 (78,6%) pacientes suspeitos com cefaléia. Assim como, a artralgia moderada a intensa (29/29; 100%) e a artrite (27; 93,1%) foram identificadas principalmente nos casos suspeitos de CHIK (**Tabela 3**).

Tabela 3. Dados demográficos e características clínicas dos casos suspeitos de arboviroses, Duque de Caxias (UPA Beira Mar), no período de janeiro a junho de 2018.

JANEIRO A JUNHO DE 2018			
	DENV	ZIKV	CHIKV
Gênero	n = 37 (%)	n = 28 (%)	n = 29 (%)
Masculino	19 (51,4)	6 (21,4)	13 (44,8)
Feminino	18 (48,6)	22 (78,6)	16 (55,2)
<i>p</i> ($\alpha=0.05$)*	0,8727	0,0072	0,5319
Faixa etária			
<20 e >=60	9	4	5
20-59 anos	28	24	24
<i>p</i> ($\alpha=0.05$)*	0,1016	0,0041	0,0181
Sintomas			
Febre <38.5 C	17 (45,9)	12 (42,9)	10 (34,5)
Febre >38.5C	20 (54,1)	16 (57,1)	19 (65,5)
Exantema	5 (13,5)	27 (96,4)	8 (27,6)
Prurido	0 (0)	25 (89,3)	1 (3,4)
Mialgia	27 (73)	19 (67,9)	22 (75,9)
Artralgia leve	24 (64,9)	14 (50)	0 (0)
Artralgia mod/int	0 (0)	13 (46,4)	29 (100)
Artrite	0 (0)	12 (42,9)	27 (93,1)
Conjuntivite	2 (5,4)	11 (39,3)	10 (34,5)
Cefaléia	28 (75,7)	22 (78,6)	19 (65,5)
Discrasia	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)
Neurológico	0 (0)	0 (0)	1 (3,4)

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

Com relação aos dados demográficos, entre o total de casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK, excluindo-se aqueles classificados como duvidosos (DEN/CHIK e DEN/ZIK), a incidência de DEN foi de 8/100.000 habitantes, seguida daquelas observadas para ZIK (6/100.000 habitantes) e CHIK (6/100.000 habitantes). Na determinação da incidência das arboviroses por gênero, observou-se semelhança entre homens e mulheres, que apresentaram um quantitativo de 8/100.000 habitantes e 12/100.000 habitantes, respectivamente. Porém, as

chances de ocorrer (*odds ration*) DEN e CHIK foram basicamente as mesmas para homens e mulheres, já ZIK apresentou uma maior possibilidade de ocorrer nas mulheres. Dentro das faixas etárias, a incidência foi maior na de 20 a 59 anos, para as três arboviroses. Contudo, as chances de ocorrer (*odds ration*) ZIK e CHIK nesta faixa etária foi sensivelmente maior quando comparada com a DEN (**Tabela 4**).

Tabela 4. Dados demográficos dos casos prováveis de arboviroses de Duque de Caxias (UPA Beira Mar) no período de janeiro a Junho de 2018.

Gênero	Incidência por 100.000 hab.			Chances de Ocorrer (<i>Odds Ratio</i>)		
	DENV	ZIKV	CHIKV	DENV	ZIKV	CHIKV
Masculino	04	01	03	1,0	5,0	1,0
Feminino	04	05	03			
Total	08	06	06	-	-	-
Faixa Etária						
<20 e >=60	03	01	01	1,66	5,0	5,0
20-59 anos	05	05	05			
Total	08	06	06	-	-	-

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

5.2. BIOLOGIA MOLECULAR (RT-qPCR)

Todas as 94 amostras sanguíneas coletadas de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK) foram avaliadas pelo teste de biologia molecular, por meio do RT-qPCR, para identificação viral (ZIKV) em fase aguda de infecção. Destas, 04 (3,76%) foram consideradas positivas para ZIKV o que determina que esses pacientes estavam no curto estagio de viremia (**Tabela 5**).

Das 04/94 (3,76%) amostras positivas, 01 (0,94%) apresentaram clínica sugestiva para ZIK e 03 (2,82%) tinham clínica sugerida para outra arbovirose (DEN ou CHIK), ou ainda clínica inespecífica (DEN/ZIK ou DEN/CHIK). Quando avaliado o TIS dos pacientes com ou sem clínica sugestiva, observou-se uma média de 3,66 dias (**Tabela 5**). Este TIS esta condizente com o período de viremia para esta arbovirose, que varia de 0 a 6 dias após a infecção.

Tabela 5. Teste de biologia molecular (RT-qPCR) de amostras positivas para ZIKV, frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho de 2018			
	ZIKV			
	TIS (dias)	Clínica	CT	RT-qPCR
004	-	NP	33,46	POS
090	05	P	27,34	POS
104	03	NP	29,90	POS
184	03	NP	31,73	POS

ID – Identificação; ZIKV – Zika vírus; POS – positivo; NP – não provável; P – provável; TIS – tempo de início dos sintomas; CT – Cycle Threshold

5.3. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)

As 94 amostras com suspeita clínica de DEN, ZIK e CHIK foram submetidas separadamente ao imunodiagnóstico, para detecção de IgM e IgG, anti-ZIKV e anti-DENV. Tais ensaios foram importantes para determinação de amostras de fase aguda de infecção (sororreagentes para IgM), porém com o TIS que varia, de acordo com a literatura, de 4 a 12 dias. Após este período começa-se a observar, predominantemente a presença de IgG, caracterizando o início da fase crônica de infecção.

De acordo com os critérios sorológicos de detecção de anticorpos foi observado um total de 06/94 (6,38%) amostras sororreagentes para IgM e 12/94 (12,76%) para IgG, anti-DENV, enquanto que 06/94 (6,38%) foram sororreagentes para IgM e 38/94 (40,42%) para IgG, anti-ZIKV. Foram observadas ainda 02/94 (2,12%) amostras indeterminadas para IgM anti-DENV (**Tabela 6**).

Das amostras sororreagentes para IgM anti-ZIKV, 03/06 (50,0%) também foram sororreagentes para IgG. E destas nenhuma apresentou o cálculo de *cut-off* quatro vezes maior para IgM, quando comparado com o IgG e foram negativas para IgM e IgG anti-DENV. Isto indica que as 06/06 (100,0%) amostras sororreagentes somente para IgM, caracterizam a fase aguda da doença (**Tabela 6**). Isto aumenta o quantitativo de amostras relacionadas a fase aguda da infecção por ZIK de 04/94 (3,76%) para 09/94 (9,57%), já que uma das amostras foi positiva no RT-qPCR e sororreagente apenas para IgM anti-ZIKV. Ressalta-se que das 28 amostras com clínica sugestiva para ZIK, apenas 4 (14,2%) foram positivas para IgM também no imunodiagnóstico.

Possíveis reações cruzadas foram observadas entre as amostras sororreagentes para IgG anti-DENV e anti-ZIKV, uma vez que, 19/94 (20,21%) foram positivas para ambos os arbovirus.

Quando avaliado os pacientes sororreagentes apenas para IgM (anti-ZIKV e anti-DENV), com ou sem clínica sugestiva, foi observado um TIS médio de 4 dias. Já os pacientes sororreagentes para IgG (anti-ZIKV e anti-DENV) apresentaram um TIS médio de 5,43 dias (**Tabela 6**).

Tabela 6. Imunodiagnóstico (IgM e IgG) anti-ZIKV e anti-DENV de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho de 2018					
	TIS (dias)	Clínica	ZIKV			
			anti-ZIKV		anti-DENV	
			IgM	IgG	IgM	IgG
003		NP	NEG	POS	NEG	NEG
004		NP	NEG	POS	NEG	NEG
005		NP	NEG	POS	POS	POS
006		NP	NEG	POS	POS	POS
007		NP	NEG	NEG	NEG	NEG
008		NP	NEG	POS	NEG	POS
009		NP	NEG	NEG	NEG	POS
010		NP	NEG	NEG	NEG	NEG
011		NP	NEG	POS	INDET	POS
012		NP	NEG	POS	POS	POS
013		NP	NEG	NEG	NEG	POS
014		NP	NEG	NEG	NEG	NEG
015		NP	NEG	NEG	NEG	NEG
016	1	P	NEG	POS	POS	POS
017		NP	NEG	POS	NEG	POS
018		NP	NEG	POS	POS	POS
019		NP	NEG	POS	NEG	POS
020	2	NP	NEG	NEG	NEG	POS
021	6	NP	NEG	NEG	NEG	POS
023	5	NP	NEG	NEG	NEG	POS
025		NP	NEG	POS	POS	POS
035	4	NP	NEG	NEG	NEG	NEG
036	3	NP	NEG	NEG	NEG	NEG
038	3	NP	NEG	POS	NEG	NEG
040	5	NP	NEG	POS	NEG	NEG
041	12	NP	NEG	POS	NEG	NEG

ID – identificação; NP – não provável; P – provável; POS – positivo; NEG – negativo; TIS – tempo de início de sintomas;

Tabela 6 (continuação). Imunodiagnóstico (IgM e IgG) anti-ZIKV e anti-DENV de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho de 2018					
	TIS (dias)	Clínica	ZIKV			
			anti-ZIKV		anti-DENV	
			IgM	IgG	IgM	IgG
042	7	NP	NEG	POS	NEG	NEG
045		NP	NEG	POS	NEG	POS
047	3	NP	POS	POS	NEG	POS
051	14	NP	NEG	POS	NEG	NEG
055		NP	NEG	POS	NEG	POS
056		NP	NEG	POS	NEG	NEG
059	5	NP	NEG	NEG	NEG	NEG
062	2	NP	NEG	POS	NEG	NEG
063	2	NP	NEG	POS	POS	NEG
064	6	NP	NEG	NEG	POS	NEG
065	8	P	NEG	POS	NEG	NEG
067	5	NP	NEG	POS	POS	POS
068	7	NP	NEG	NEG	POS	NEG
069	3	NP	NEG	NEG	POS	NEG
070	4	NP	NEG	POS	NEG	POS
073	7	P	NEG	POS	POS	POS
074	4	P	POS	POS	NEG	NEG
077	9	P	NEG	POS	NEG	NEG
080	1	NP	NEG	POS	POS	NEG
086	15	NP	NEG	POS	NEG	NEG
087		NP	NEG	POS	NEG	POS
088	5	P	NEG	NEG	NEG	NEG
090	5	P	POS	NEG	NEG	NEG
095	3	NP	NEG	NEG	INDET	POS
098	4	NP	NEG	POS	NEG	NEG
100	1	NP	NEG	POS	NEG	NEG
102	1	NP	NEG	NEG	NEG	POS
103	6	P	NEG	POS	NEG	NEG
104	3	NP	NEG	POS	NEG	POS
108	5	NP	NEG	POS	NEG	NEG
109		P	NEG	POS	NEG	NEG
111	2	NP	NEG	NEG	NEG	POS
113	2	NP	NEG	POS	NEG	NEG
122	9	P	NEG	POS	NEG	NEG
123	13	NP	NEG	POS	NEG	NEG
124	8	P	NEG	POS	NEG	NEG
125	3	NP	NEG	NEG	NEG	POS
127	2	NP	NEG	NEG	POS	NEG
131	4	P	NEG	NEG	NEG	POS
136	7	P	NEG	POS	NEG	NEG
137	3	NP	NEG	POS	NEG	POS

ID – identificação; NP – não provável; P – provável; POS – positivo; NEG – negativo; TIS – tempo de início de sintomas;

Tabela 6 (continuação). Imunodiagnóstico (IgM e IgG) anti-ZIKV e anti-DENV de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK), frente a clínica do paciente e o tempo de início dos sintomas (TIS) em dias.

ID das amostras	Janeiro a Junho de 2018					
	TIS (dias)	Clínica	ZIKV			
			anti-ZIKV		anti-DENV	
			IgM	IgG	IgM	IgG
138	7	P	NEG	POS	NEG	NEG
139	7	P	NEG	POS	NEG	NEG
140	8	NP	POS	POS	NEG	NEG
141	6	P	NEG	POS	NEG	NEG
142	2	P	NEG	NEG	NEG	POS
143	5	P	POS	NEG	NEG	NEG
144		NP	NEG	NEG	POS	NEG
145		NP	NEG	POS	NEG	NEG
146	7	P	NEG	POS	NEG	NEG
148		P	NEG	POS	NEG	NEG
149		NP	NEG	POS	NEG	NEG
150		P	NEG	POS	NEG	NEG
151	3	NP	NEG	NEG	POS	NEG
155	9	P	POS	NEG	NEG	NEG
158	5	P	NEG	POS	NEG	NEG
169		NP	NEG	NEG	POS	NEG
171	7	P	NEG	POS	NEG	NEG
172	13	P	NEG	POS	NEG	NEG
173	1	NP	NEG	POS	NEG	NEG
175	6	P	NEG	POS	NEG	NEG
176		P	NEG	POS	NEG	NEG
177	5	NP	NEG	POS	NEG	NEG
178	9	NP	NEG	POS	NEG	NEG
182	6	P	NEG	POS	NEG	POS
183	1	NP	NEG	POS	NEG	NEG
184	3	NP	NEG	POS	NEG	NEG
186	3	NP	NEG	NEG	NEG	POS

ID – identificação; NP – não provável; P – provável; POS – positivo; NEG – negativo; TIS – tempo de início de sintomas;

5.4. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE ZIK

Com base em dados epidemiológicos retrospectivos de ZIK, obtidos de 2015 a 2018, pode-se observar que após a entrada do ZIKV, com os primeiros casos autóctones no 1º semestre de 2015 (dados não registrados nos boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde) (PAHO, 2016), houve um “pico” no quantitativo de casos no ano de 2016, com um número de casos prováveis, no Brasil e Rio de Janeiro, de 215.319 (105,3 casos/100 mil habitantes) e 68.943 (416,6 casos/100 mil habitantes), respectivamente. Estas incidências demonstraram

uma situação epidêmica, que foi acompanhada pelo número de casos prováveis e confirmados de ZIK no município de Duque de Caxias neste mesmo ano (**Tabela 7**).

Após a epidemia observada em 2016, os dados epidemiológicos dos anos seguintes (2017 e 2018) demonstraram uma sensível queda no quantitativo de casos prováveis e confirmados de ZIK, que se refletiu em uma baixa incidência desta arbovirose no Brasil, Rio de Janeiro e, mais especificamente, em Duque de Caxias (**Tabela 7**).

Tabela 7. Dados epidemiológicos retrospectivos de ZIK de 2015 a 2018, no Brasil, Rio de Janeiro e Duque de Caxias.

Período	Localidade*	Dados epidemiológicos de ZIK		
		Casos prováveis	Casos confirmados	Incidência (/100 mil hab.)
2015	Brasil	NR	NR	NR
	Rio de Janeiro	NR	NR	NR
	Duque de Caxias**	126	14	13,7
2016 (Epidemia)	Brasil	215.319	130.701	105,3
	Rio de Janeiro	71.616	2.077	432,7
	Duque de Caxias**	3.637	458	397,7
2017	Brasil	17.452	8.839	8,5
	Rio de Janeiro	2.544	130	15,3
	Duque de Caxias**	163	26	17,8
2018	Brasil	8.680	3.984	4,2
	Rio de Janeiro	2.418	1.334	14,5
	Duque de Caxias**	344	36	37,6
Presente estudo (jan. a jun./18)	Duque de Caxias	28	09	3,06

NR - não registrado; ZIK - Zika vírus; jan. - janeiro; jun - junho; * Dados obtidos do Ministério da Saúde - SINAN; ** Dados obtidos da Divisão de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Duque de Caxias (DVS-SMSDC).

Um outro dado disponibilizado pela DVS-SMSDC, que por sua vez alimentou o Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI), foi a estimativa de doses aplicadas de vacina para YFV, à população de Duque de Caxias, no período de 2015 a 2018. Em 2015 e 2016, quando Duque de Caxias ainda não era caracterizada como área de surto de YF, a vacina era oferecida pelo Centro Municipal de Saúde (CMS), apenas para os viajantes. Com o surto de YF no Rio de Janeiro e em Duque de Caxias no ano de 2017, a

recomendação do Ministério da Saúde foi que todas as Unidades de Saúde passassem a vacinar. Com isso, Duque de Caxias atingiu um quantitativo de 106.636 doses aplicadas à população neste ano. Já em 2018 foi estimado uma cobertura vacinal de 18.802 doses aplicadas à população de Duque de Caxias.

6. DISCUSSÃO

6.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO

No presente estudo foram avaliadas 94 amostras clínicas (soro) de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, de janeiro a junho de 2018, com diagnóstico sugestivo de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK).

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

No Rio de Janeiro, durante a epidemia de ZIK em 2016, os sintomas mais frequentes foram: exantema, prurido e conjuntivite (BRASIL et al. 2016), esses dados foram os pilares clínicos para determinação dos casos de ZIK no presente estudo. O estudo feito por Braga et al. (2017) avaliou os critérios clínicos para arboviroses, onde foram incluídos apenas os pacientes que tiveram resultados de RT-PCR para DENV, ZIKV e CHIKV durante o período do estudo (2014 a 2016) e concluíram que os sintomas citados acima são os mais fortemente encontrados em pacientes com ZIK. A presença de erupção cutânea com prurido ou hiperemia conjuntival, sem outras manifestações clínicas gerais como febre, petéquias ou anorexia, também foi achada a melhor definição de caso do ZIK para Lanciotti et al. (2008) e Zanluca et al. (2015), com maior sensibilidade e especificidade, de 86% e 78%, respectivamente. A definição clínica dos casos de CHIK utilizada no presente estudo, foi condizente com aquelas descritas por outros autores, que se basearam na síndrome clínica de febre alta, dor em múltiplas articulações e artrite (STAPLES et al. 2009; THIBERVILLE et al. 2013; KHATUN et al. 2015; BURT et al. 2017). A infecção pelo DENV é sistêmica e apresenta características clínicas inespecíficas (PAHO 2017). Tais características foram consideradas na definição dos casos de DEN no presente estudo.

A distribuição etária dos casos suspeitos de arboviroses mostrou uma tendência para um maior número de pacientes adultos com suspeita de ZIK e CHIK. Estes resultados corroboram com os observados em outros estudos, relacionados com essas mesmas arboviroses (CARDOSO et al. 2015; BRASIL et al. 2016). Na diferenciação por patologia, foi observado

uma distribuição dos casos de forma homogênea, sem discrepância quantitativa dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK no período estudado, demonstrando uma tendência à endemicidade. No que tange ao gênero, por mais que tenha sido observado um maior número de casos suspeitos de arboviroses em homens, estes dados foram impulsionados pelos casos de DEN e CHIK. Quanto nota-se apenas os casos suspeitos de ZIK percebe-se que as mulheres foram mais afetadas, principalmente na faixa etária adulta (20-59 anos). Vale ressaltar que estudos relataram que as mulheres são mais propensas a infecções por DEN, ZIK e CHIK (DOKE et al. 2011; BRAGA et al. 2014; BRASIL et al. 2016), provavelmente por se dedicarem mais as atividades domiciliares, se expondo aos focos residenciais dos vetores. Outros fatores estariam relacionados às diferenças no uso de roupas, entre homens e mulheres, em relação à exposição da pele, em particular tornozelos e pernas, permitindo um maior contato com os vetores (RENAULT et al. 2007; KANNAN et al. 2009). Não se pode descartar o comportamento de buscar o médico que é mais frequente em mulheres, além da percepção de risco de grave acometimento fetal por ZIK, que também pode ter exacerbado ainda mais a busca delas pela assistência à saúde. Coelho et al. (2016), utilizando dados sobre a incidência entre os anos de 2015 à 2016 para DEN e ZIK, na cidade do Rio de Janeiro, concluíram que mulheres em idade reprodutiva tinham 90% mais chances de adquirir ZIK do que os homens neste mesmo perfil. Este foi um estudo epidemiológico importante em uma área de transmissão ativa de ZIKV, que descartou que o comportamento de maior procura ao atendimento à saúde pelo gênero feminino ou testes sistemáticos em mulheres grávidas como a causa de mais relatos de ZIK em mulheres em idade fértil.

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

6.2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Assim como constatado no presente estudo, o diagnóstico laboratorial da infecção pelo ZIKV e DENV no Brasil, ainda está limitado a laboratórios de pesquisa ou de saúde pública. Além desta capacidade limitada de diagnóstico, tratando-se separadamente do ZIKV, devido aos casos de microcefalia criou-se a necessidade de priorização de testes às mulheres grávidas (CAO-LORMEAU, 2016).

Além da disponibilidade limitada de testes, estes arbovírus (ZIKV e DENV) reagem de

forma sorológica entre si e com outros flavivírus (vírus do Nilo Ocidental e YFV) (VANNICE, 2016). Tais reações cruzadas foram observadas no presente estudo em 19 amostras de soro reagentes para IgG anti-DENV e anti-ZIKV. Entretanto, não foi identificada reação cruzada para IgM em nenhuma das 6 amostras reagentes para ZIKV. Muitos artigos demonstram a reatividade cruzada entre ZIKV e DENV, principalmente em áreas endêmicas para DENV, onde houve o estabelecimento do ZIKV (ESTOFOLETE et al. 2016; DEJNIRATTISAI et al. 2016; PRIYAMVADA et al. 2017; ZIMMERMAN et al. 2018; LANGERAK et al. 2019). Assim, infecções atuais ou passadas, ou mesmo a vacinação para outro flavivírus, podem levar à resultados de anticorpos falso-positivos ou inconclusivos (COLOMBO et al. 2018). O surto de 2007 na Micronésia foi inicialmente identificado como DENV por um teste rápido de IgM, no entanto, o Departamento de Saúde do Estado de Yap suspeitou de um patógeno diferente e solicitou a assistência do CDC, que posteriormente identificou o ZIKV (DUFFY et al. 2009).

A detecção de RNA viral durante a infecção aguda por RT-PCR ou outros testes de amplificação de ácido nucléico (NAATs) fornece resultados mais específicos, mas o ZIKV e DENV são detectáveis apenas durante a curta fase de viremia (VAUGHN et al. 2000; LANCIOTTI et al. 2008). Isto foi observado nos resultados deste estudo para 4 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de arboviroses, que por meio do diagnóstico molecular foram confirmados para ZIKV. No entanto, no caso do ZIKV, a utilidade do teste molecular para o diagnóstico de infecção aguda é limitado, porque cerca de 80% dos pacientes não apresentam sintomas para alertar quanto à infecção e, portanto, nenhum quadro clínico de referência para que seja buscado o diagnóstico é observado (SINGH, 2018).

Conforme mencionado acima, o valor diagnóstico da RT-PCR para a detecção de RNA do ZIKV no sangue (soro) é limitado, uma vez que a viremia é geralmente baixa e restrita aos primeiros 2 a 5 dias após o início dos sintomas (COLOMBO et al. 2018). Maiores cargas de RNA do ZIKV são detectáveis na urina após um longo período (10 a 20 dias após o início dos sintomas), permitindo que a detecção do RNA do ZIKV na urina seja uma técnica alternativa de diagnóstico (GOURINAT et al. 2015; BINGHAM et al. 2016; SHINOHARA et al. 2016). Recentemente, um grupo dos EUA (SABALZA et al. 2018) realizou experimentos sobre a detecção de RNA do ZIKV em amostras de saliva, otimizando um ensaio sorológico usando um dispositivo micro fluídico. Um teste de amplificação isotérmica mediada por transcrição reversa otimizada (RT-LAMP) e um dispositivo de amplificação isotérmica foram usados para detectar RNA de ZIKV. Este estudo evidenciou um protocolo para modificar o atual ensaio de amplificação isotérmica para detecção do RNA do ZIKV. O uso de secreções glandulares do corpo humano, particularmente a saliva, como ferramentas de diagnóstico fornece uma

oportunidade para uma análise por diagnóstico molecular e proteômica mais simples e mais eficiente do ZIKV (KHURSHID et al. 2019). No presente estudo, as amostras de soro detectadas para ZIKV pelo RT-qPCR foram de pacientes que apresentaram um tempo médio de início dos sintomas de 3,66 dias. Estes resultados foram semelhantes aos observados por Estofolete et al. (2016), onde as amostras de soro positivas processadas pela mesma técnica diagnóstica foram de pacientes que tinham um tempo médio de início de sintomas de 2,76 dias, o que foi considerado em consonância com a literatura disponível.

O RNA genômico do ZIKV codifica uma poliproteína que é processada em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, incluindo a proteína não estrutural 1 (NS1) (KUNO et al. 1998). Semelhante a do ZIKV, a NS1 do DENV também está associado às membranas intracelulares e à superfície celular (I,GUTSCHE et al. 2011). Todos os genes da proteína NS1 dos flavivírus compartilham um alto grau de homologia e codificam um polipeptídeo de 46 a 55 kDa, dependendo do seu status de glicosilação (MULLER et al. 2013). O ensaio imunodiagnóstico para determinação da proteína NS1 é amplamente utilizado em muitas regiões desenvolvidas e em desenvolvimento, com risco de DEN (CHUNG et al. 2015). A sensibilidade relatada dos testes da proteína NS1 varia de 48,5% a 58,6%, e a especificidade varia de 92,5% a 99,4%. A sensibilidade combinada dos testes de anticorpos antígeno NS1 e IgM da DENV aumenta para 89,9 a 92,9%, com uma especificidade de 75,0 a 88,8% (BLACKSELL et al. 2011). Os resultados da proteína NS1 do DENV, falso positivo, foram previamente descritos em pacientes com outra doença febril e neoplasias hematológicas (HUNSPERGER et al. 2014; CHUNG et al. 2015).

6.3. ANÁLISE PÓS EPIDEMIA DE 2016

O presente estudo avaliou, de janeiro a junho de 2018, um total de 94 pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK e CHIK), atendidos no principal Hospital Municipal de Duque de Caxias, que foi uma região bastante acometida pela epidemia de ZIK de 2016. Utilizando os critérios clínicos-epidemiológicos para caracterizar as arboviroses co-circulantes foram identificados 28 casos prováveis de ZIK no período estudado e um total de 9 casos confirmados (fase aguda).

Os primeiros relatos de ZIK no Brasil foram de 57 notificações de casos suspeitos (BRASIL, 2015e; CARDOSO et al. 2015; BRASIL et al. 2016) com a presença de casos autóctones (CALVET et al. 2016); no ano de 2016 a taxa de incidência foi de 105,3 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017). Além disso, no Brasil surge neste mesmo ano a associação de

ZIK com microcefalia entre os recém nascidos (MLAKAR et al. 2016; DE OLIVEIRA et al. 2016). Também foi observado um aumento progressivo do número de casos de CHIK em 2015 e 2016, na região do estudo, que por sua vez encontrava-se em circulação, desde 2014 (NUNES et al. 2015; CONTEVILLE et al. 2016).

Atualmente se sabe que o ZIKV compartilha um grau considerável de identidade genética e homologia estrutural com outros flavivírus, incluindo o DENV. Em particular, o envelope de glicoproteína de superfície (E), que está envolvido na fusão e entrada viral e é, portanto, um alvo principal para respostas de anticorpos neutralizantes, onde temos regiões que são altamente conservadas entre os dois vírus. Isto resulta em reatividade imunológica cruzada, que no contexto de exposição prévia ao DENV, pode ter implicações significativas para a geração de respostas imunes ao ZIKV e afetam os desfechos das doenças (PRIYAMVADA et al. 2017).

A partir do ano de 2017 pode-se observar, em todo o Brasil, um sensível decréscimo dos casos de ZIK, que associado a endemicidade observada para DEN (DENV1-4) e pelo fato de possuírem resposta imunológica mediada pela glicoproteína (E), pode-se estabelecer possíveis relações de reatividade imunológica cruzada (RIBEIRO et al. 2018). Casos de infecção por ZIKV em indivíduos que já tiveram contato com o DENV são comuns e até mesmo infecção concomitante com ambos os vírus são inevitáveis, por ambos se sobreporem nas mesmas regiões geográficas e serem transmitidos pelos mesmos vetores. DENV e ZIKV compartilham 52-57% de homologia total de aminoácidos (BARBA et al. 2016) e sua reatividade imunológica cruzada já foi descrita anteriormente (ZAMMARCHI, 2015). De acordo com Ribeiro et al. (2018), após examinarem 21 amostras clínicas de pacientes não-imunes à DENV, mas com infecção pelo ZIKV confirmada por RT-PCR ou ensaios de neutralização, foi observado que apenas uma amostra (5%) demonstrou fraca reatividade cruzada contra o DENV-2. Estes resultados indicaram que as infecções pelo ZIKV não geram uma proteção cruzada para DENV. No entanto, a maioria da população de Salvador (local do estudo) e da América Latina possui imunidade para o DENV e foi infectada por esse vírus antes do surto de ZIKV em 2016. Após as infecções pelo ZIKV, os anticorpos contra a proteína não estrutural 1 (NS1) do ZIKV, produzidos em pessoas imunes ao DENV, reagiram de forma cruzada contra a NS1 do DENV, enquanto que em indivíduos não imunes pelo DENV ocorreu menos reatividade cruzada.

Segundo Wen et al. (2017), ainda não se sabe se a imunidade pré-existente com o DENV pode proteger ou aumentar a infecção pelo ZIKV durante a infecção sequencial do mesmo hospedeiro. No trabalho realizado pelo mesmo autor, mostrou-se que camundongos C57BL/6

imunes a DENV infectados com ZIKV têm imunidade de reação cruzada à infecção e a patogênese pelo ZIKV. Estudos de transferência adotiva e depleção celular demonstram que as células T CD8 + imunes ao DENV mediam predominantemente as respostas de proteção cruzada ao ZIKV. Em contraste, estudos de transferência passiva sugerem que o soro imune ao DENV não protege contra a infecção pelo ZIKV. Assim, a imunidade de células T CD8 + gerada durante a infecção primária por DENV pode conferir proteção contra infecção secundária por ZIKV em camundongos. A otimização adicional das vacinas atuais de DENV para respostas de células T pode conferir proteção cruzada e prevenir o aumento mediado por anticorpos da infecção por ZIKV (WEN et al. 2017; GORDON et al. 2019; WANG et al. 2019).

Uma potencial proteção cruzada provocada pelo ZIKV também é corroborada por estudos que mostram que os anticorpos específicos para envoltórios produzidos durante a infecção pelo ZIKV reagem de forma cruzada com a proteína do envelope de todos os quatro sorotipos do DENV, independentemente da infecção anterior pelo DENV (STETTLER et al. 2016; ELONG NGONO e SHRESTA, 2019). Segundo Robbiani et al. (2017), as infecções pelo ZIKV em indivíduos imunes ao DENV aumentam a reatividade cruzada com as células B de memória, resultando em maior capacidade de neutralização dos flavivírus e induzindo imunidade neutralizante contra o ZIKV e DENV. Essa proteção cruzada poderia ser suficiente para uma imunização em massa da população. No entanto, a imunidade protetora cruzada pode não ser de longa duração (e pode diferir dos sorotipos do DENV), porque os anticorpos neutralizantes cruzados geralmente não persistem por mais de 12 a 18 meses.

A NS5 dos flavivirus é uma proteína conservada multifuncional que constitui a polimerase viral. A análise das sequências da proteína NS5 da vacina YFV atenuada viva, atualmente usada, quando comparada com a do ZIKV, revela uma homologia de 64% (BARONTI et al. 2014). Devido a esta estreita similaridade, Blom et al. (2017) iniciaram estudos sobre possíveis respostas de reação cruzada entre células T CD8 de receptores de vacinação YFV e antígenos específicos do ZIKV. A vacina contra YFV (Stamaril[®], 0.5 ml, Sanofi Pasteur) foi administrada a voluntários saudáveis e o sangue periférico foi coletado antes (dia 0) e 15 dias após a vacinação (dia 15). As células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas com peptídeos de NS5 de ZIKV e posteriormente identificados como linfócitos (CD19, CD14 e marcador de célula morta), células CD3 + CD8 + produtoras de IFN γ + TNF +. Apenas no dia 15 foram identificadas as células T CD8 produtoras de TNF em resposta à proteína NS5 do ZIKV. Estes resultados demonstram que a homologia entre a vacina YFV e a proteína NS5 do ZIKV está próxima o suficiente para induzir linfócitos CD8 específicos para ZIKV. Estes resultados foram corroborados por Grifoni et al. (2019) que

estudaram a reatividade cruzada para vários flavivirus em amostras de soro de pacientes vacinados para DENV e YFV. Tal resposta imune cruzada foi possivelmente observada na população contemplada no presente estudo, pois após o surto de YFV de 2017, boa parte da população foi vacinada contra o vírus o que pode ter favorecido o declínio dos casos de ZIK posteriormente.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

(a) o diagnóstico clínico-epidemiológico não se mostrou uma boa ferramenta para caracterização dos casos de ZIK na população estudada, uma vez que, dos 28 prontuários com suspeita de ZIK, apenas 4 tiveram a confirmação desse diagnóstico pelos métodos laboratoriais utilizados;

(b) os métodos diagnósticos utilizados no presente estudo foram eficazes para confirmação dos casos agudos de ZIK, inclusive com o tempo de início de sintomas (TIS) compatível com o método adotado;

(c) reações cruzadas foram observadas no imunodiagnóstico de DENV e ZIKV, em amostras sororreagentes para IgG, sendo cerca de 1/5 (20%) das amostras positivas para ambas arboviroses;

(d) a sensível redução dos casos de ZIK nos anos subsequentes a epidemia de 2016 na área de estudo, possivelmente esta relacionada a imunidade cruzada positiva presente em pacientes imunes ao DENV e/ou que foram vacinados para YFV durante a ampla campanha vacinal de 2017.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho são relevantes, tendo em vista que observamos uma fragilidade no critério clínico epidemiológico utilizado no diagnóstico das arboviroses, por conta da semelhança dos quadros clínicos que se apresentam entre DEN, CHIK e ZIK. Mesmo com o auxílio de técnicas laboratoriais de imunodiagnóstico, pode-se sofrer com a questão da imunidade cruzada.

Uma das opções que temos para atenuar os erros no diagnóstico das arboviroses, seria o uso de ferramentas laboratoriais mais conclusivas e fidedignas, como por exemplo a biologia molecular, mesmo que contemple uma curta fase da viremia e seja de alto custo para o serviço público de saúde, ainda sim é o diferencial.

Pudemos observar que a imunidade cruzada positiva de ZIKV com DENV e YFV, se faz presente em nosso cotidiano. Vimos, posteriormente a epidemia de 2016, casos de ZIK decaindo após o grande número de pessoas vacinadas contra YFV (2017) e também pacientes com infecção prévia de DEN respondendo imunologicamente a infecção por ZIK.

Há uma necessidade de se compreender melhor a interação que as arboviroses possuem entre si e como isso impacta na sociedade de uma forma geral, seja nos programas de prevenção/imunização, diagnóstico e tratamento.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv.. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

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

ANTHONY J MCMICHAEL, **Epidemiology and the People's Health. Theory and Context**. Nancy Krieger., *International Journal of Epidemiology*, Volume 40, Issue 4, August 2011, Pages 1130–1132, <https://doi.org/10.1093/ije/dyr075>

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

AZEVEDO RSS, OLIVEIRA CS, VASCONCELOS PFC. **Chikungunya risk for Brazil**. *Rev Saúde Pública*. v. 49, p 58, 2015.

BARONTI C, PIORKOWSKI G, CHARREL RN, BOUBIS L, LEPARC-GOFFART I, de LAMBALLERIE X. **Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia outbreak in 2013**. *Genome Announc* 2014; 2: 1-2, e00500-14.

BINGHAM AM, Cone M, Mock V, et al. **Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel- associated Zika virus disease—Florida, 2016**. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(18):475–478.

BLACKSELL, R.G. Jarman, M.S. Bailey, A. Tanganuchitcharnchai, K. Jenjaroen, R.V. Gibbons, et al., **Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy**, *Clin. Vaccine Immunol*. CVI 18 (12) (2011) 2095–2101.

BLOM K, SANDBERG JT, LORE K, LJUNGGREN HG. **Prospects for induction of CD8 T cell-mediated immunity to Zika virus infection by yellow fever virus vaccination**. *J Intern*

Med. (2017) 282:206–8. 10.1111/joim.12638

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC).** Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/images/sala-de-situacao/Microcefalia-Protocolo-de-vigilancia-e-resposta-10mar2016-18h.pdf>.

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

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

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

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 12/2017**. Boletim Epidemiológico, v. 48, n. 12, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 52 de 2018** Boletim Epidemiológico, n. 3, 2019.

BURT FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. **Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen**. Lancet Infect Dis. 2017; 17 (4): e107–e117. pmid:28159534.

CALVET GA, et al. **First detection of autochthonous Zika virus transmission in a HIV-infected patient in Rio de Janeiro, Brazil.** *Journal of Clinical Virology.* v. 74, p. 1–3, 2016.

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

CAO-LORMEAU, V.M. et al. **Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study.** *Lancet.* 2016 Apr 9; 387 (10027): 1531-9. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6. Epub 2016 Mar 2.

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

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

CAVALCANTI DD, Alves LV, Furtado GJ, Santos CC, Feitosa FG, et al. (2017) **Echocardiographic findings in infants with presumed congenital Zika syndrome: Retrospective case series study.** *PLOS ONE* 12(4): e0175065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175065>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Zika e a síndrome de Guillain-Barré.** <https://portugues.cdc.gov/zika/healtheffects/gbs-qa.html>

CHUNG, P.U. Krishnan, Y.S. Leo, **Two cases of false-positive dengue non-structural protein 1 (NS1) antigen in patients with hematological malignancies and a review of the literature on the use of NS1 for the detection of Dengue infection,** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 92 (2) (2015) 367–369.

COLOMBO, Tatiana Elias; Terzian, Ana Carolina Bernardes; Júnior, João Pessoa Araújo; Parreira, Ricardo; Cabrera, Eliana Márcia Sotello; Santos, Izalco Nuremberg Penha dos; Reis, Andréia Francesli Negri; Costa, Fabiana Rodrigues; Cruz, Lilian Elisa Arão Antônio; Rombola,

Patrícia Lopes; Nogueira, Maurício Lacerda. **Zika detection: comparison of methodologies.** *Brazilian Journal of Microbiology.* 49 (2018) 144–147.

COSTA, AC. et al. **Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas.** *Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 42, n. 6, p. 677-681, 2009.

D.A. MULLER, P.R. Young, **The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker,** *Antiviral Res.* 98 (2) (2013) 192–208.

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

DICK G.W, KITCHEN S.F, HADDOW A.J. **Zika virus. I. Isolations and serological specificity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509–520.

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

DUBANKOVA, A., & Boura, E. (2019). **Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses.** *Antiviral Research,* 169, 104536. doi:10.1016/j.antiviral.2019.104536

DUFFY MR, Chen TH, Hancock WT, et al. **Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.** *N Engl J Med* 2009; 360 (24): 2536–2543.

EICKMANN S.H. et al. **Zika virus congenital syndrome.** *Cad Saúde Pública* 2016; 32.

ELONG NGONO A and SHRESTA S (2019) **Cross-Reactive T Cell Immunity to Dengue and Zika Viruses: New Insights Into Vaccine Development.** *Front. Immunol.* 10:1316. doi: 10.3389/fimmu.2019.01316

ENFISSI, A. et al. **Zika virus genome from the Americas.** *Lancet,* 387 (2016), pp. 227–228

ESTOFOLETE CF, Terzian ACB, Parreira R, et al. **Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: a case series.** *J Clin Virol.* 2016;81:25–30.

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

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

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

FERREIRA MLB, et al. **Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos.** *Arq Neuro-Psiquiatr.* v. 63, p. 488-93, 2005.

GORDON A, GRESH L, OJEDA S, KATZELNICK LC, SANCHEZ N, MERCADO JC, et al. (2019) **Prior dengue virus infection and risk of Zika: A pediatric cohort in Nicaragua.** *PLoS Med* 16(1): e1002726. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002726>

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

GRIFONI A, VOIC H, SIDNEY J, de SILVA A D, DURBIN A, DIEHL SA, HARRIS E, SETTE A, WEISKOPF D. **Crosseactivity of flaviviruses specific CD8+T cell responses across different viral species.** *The Journal of Immunology*, 2019, 202 (1 Supplement) 76.12.

GUTSCHE I, COULIBALY F., VOSS J.E., SALMON J., D'ALAYER J., ERMONVAL M., et al., **Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (19) (2011) 8003–8008.

HUNSPERGER, S. Yoksan, P. Buchy, V.C. Nguyen, S.D. Sekaran, D.A. Enria, et al., **Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody,** *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (10) (2014) e3171.

IOOS, S. et al. **Epidemiologia atual do vírus Zika e epidemias recentes.** *Med. Mal. Infectar.* **44** , 302-307 (2014).

JUNIORCAIUS I.M.P.H. et al. **Zika Virus Transmission — Region of the Americas, May 15, 2015–December 15, 2016** Morbidity and Mortality Weekly Report. MMWR / March 31, 2017 / Vol. 66 / No. 12.

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

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

KHURSHID, Zohaib; Zafar, Muhammad; Khan, Erum; Mali, Maria; Latif, Muhammad. **Human saliva can be a diagnostic tool for Zika virus detection.** *Journal of infection and public health.* In press. Doi. [10.1016/j.jiph.2019.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.05.004) 2019.

KUNO G, CHANG G.J. **Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses.** *Arch Virol.* 2007;152:687–696.

KUNO G., CHANG G.J., TSUCHIYA K.R., KARABATSOS N., CROPP C.B., **Phylogeny of the genus Flavivirus,** *J. Virol.* 72 (1) (1998) 73–83.

L'HUILLIER, Ernesto Lombos, Elaine Tang, Stephen Perusini, Alireza Eshaghi, Sandeep Nagra, Christine Frantz, Romy Olsha, Erik Kristjanson, Kristina Dimitrova, David Safronetz, Mike Drebot, Jonathan B. Gubbay. **Evaluation of Altona Diagnostics RealStar Zika Virus Reverse Transcription-PCR Test Kit for Zika Virus PCR Testing** *Journal of Clinical Microbiology* Apr 2017, 55 (5) 1576-1584; DOI: 10.1128/JCM.02153-16

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

LEITE P.L. **Síndrome de Guillan-Barré e manifestações neurológicas relacionadas a doença exantemática anterior** [Apresentação realizada para o Comitê Técnico Assessor do Programa Nacional de Controle da Dengue do Ministério da Saúde (CTA-PNCD/MS); 2015 set 30; Brasília, Brasil].

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

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

MARTINES R.B, et al. **Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series**. Lancet. 2016 Aug 27; 388 (10047):898-904. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30883-2.Epub2016Jun29.

METSKY, HC. et al. **Zika virus evolution and spread in the Americas**. Nature, v. 546, n. 7658, p. 411, 2017.

MOREIRA, Martha Cristina Nunes et al . Emergency and permanence of the Zika virus epidemic: an agenda connecting research and policy. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro , v. 34, n. 8, e00075718, 2018 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X2018000800301&lng=en&nrm=iso>. access on 04 July 2019. Epub Aug 20, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00075718>.

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

NGONO A and Shresta S (2019) **Cross-Reactive T Cell Immunity to Dengue and Zika Viruses: New Insights Into Vaccine Development**. *Front. Immunol.* 10:1316. doi: 10.3389/fimmu.2019.01316

NIKITINA, E.; Larionova, I.; Choinzonov, E.; Kzhyshkowska, J. **Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs**. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2821.

NUNES, Magda Lahorgue et al . **Microcefalia e vírus Zika: um olhar clínico e epidemiológico do surto em vigênciano Brasil**, J. Pediatr. (Rio J.), Porto Alegre , v. 92, n. 3, p. 230-240, June 2016 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002175572016000300230&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Apr. 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.009>.

OEHLER E, et al. **Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013**. Euro Surveill. 2014;19(9).

OROFINO DHG, et al. **Cardiac findings in infants with in utero exposure to Zika virus- a cross sectional study**. PLoS Negl Trop Dis. v. 12, n. 3, p.e0006362, 2018.

PAHO/WHO - Pan American Health Organization/World Health Organization. **Zika virus detection in *Aedes albopictus* in Mexico**. Zika Epidemiological Update, 21 April 2016. Disponível: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=34243&lang=en. Acessado em 28 de julho de 2018.

PRIYAMVADA L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. **Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus**. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(28):7852–7. Epub 2016/06/30. pmid:27354515.

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

RIBEIRO GS, KIKUTI M, TAURO LB, et al. **Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue?** *Lancet Glob Health* 2018; 6: e140–41.

ROBBIANI DF, BOZZACCO L, KEEFFE JR, et al. **Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico**. *Cell* 2017; 169: 597–609.

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

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

SABALZA M, Yasmin R, Barber CA, Castro T, Malamud D, Kim BJ, et al. **Detection of Zika virus using reverse-transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva.** PLoS One 2018;13:e0192398, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0192398>.

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

SHINOHARA K, KUTSUNA S, TAKASAKI T, et al. **Zika fever imported from Thailand to Japan, and diagnosed by PCR in the urines.** J Travel Med. 2016;23(1): pii: tav011.

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

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

STAPLES JE, BREIMAN RF, POWERS AM. **Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.** Clin Infect Dis. 2009; 49 (6): 942–8. Epub 2009/08/12. pmid:19663604.

STETTLER K, BELTRAMELLO M, ESPINOSA DA, et al. **Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection.** *Science* 2016; 353: 823–86.

TEIXEIRA, SF. **Reforma sanitária em busca de uma teoria.** São Paulo/Rio de Janeiro: Cortez/Abrasco, 1989.

THIBERVILLE SD, Moyon N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. **Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy.**

Antiviral Res. 2013; 99 (3): 345–70. pmid:23811281.

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

VANNICE KS , GIERSING BK , KASLOW DC et al . **Relatório da reunião: consulta da OMS sobre as considerações para as expectativas regulatórias das vacinas contra o vírus Zika para uso durante uma emergência .** Vacina 2016 ;
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.034>

VASCONCELOS, P.F. **Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?** *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, v. 6, n. 2, 2015.

VAUGHN OW, Green S, Kalayanarooj S, *et al.* **Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.** *J Infect Dis* 2000; 181: 2-9.

LANDRY ML e GEORGE K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141: 60-67.

WANG R, GAO N, LI Y, FAN D, ZHEN Z, FENG K, CHEN H and AN J (2019) **Cross-Protection Against Four Serotypes of Dengue Virus in Mice Conferred by a Zika DNA Vaccine.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:147. doi: 10.3389/fcimb.2019.00147

WEN J, ELONG NGONO A, REGLA-NAVA JA, KIM K, GORMAN MJ, DIAMOND MS, et al. **Dengue virus-reactive CD8(+) T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge.** *Nat Commun.* 2017;8(1):1459. pmid:29129917

WHO. World Health Organization. **Global Health Atlas.** Disponível em: <http://apps.who.int/globalatlas/>. Acessado em: 1 de fevereiro de 2019.

WIM ANG C, JACOBS B.C., LAMAN J.D. **The Guillain-Barré syndrome; a true case of molecular mimicry.** *Trends Immunol.* v. 25, p. 261–66, 2004.

ZAMMARCHI, L. et al. **Infecções por vírus Zika importadas para a Itália: achados**

clínicos, imunológicos e virológicos e implicações na saúde pública. *J. Clin. Virol* 63 , 32-35 (2015).

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

ZIMMERMAN MG, Quicke KM, O’Neal JT, Arora N, Machiah D, Priyamvada L, et al. **Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe*. 2018;24(5):731–42 e6. Epub 2018/11/16. pmid:30439342.**

ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de investigação para Flavivírus (SMS-PMDC)


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

Ficha de Investigação para Flavivírus - Duque de Caxias

Nº SINAN Data início dos sintomas Data da notificação

Nome do Paciente

Sexo Data de Nascimento Idade Gestante

Endereço

Número Complemento Telefone de contato

Ponto de referência

Bairro Município

Data de início dos sintomas

Sinais e Sintomas

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

Dados de atendimento

Data de atendimento

Local de atendimento

Município de atendimento

UF

Contato com casos semelhantes

Ação Endereço Telefone

Deslocamento (30 dias antes) do início dos sintomas

Data	Município	UF	País	Meio de transporte

ANEXO 2
Declaração de aprovação do Projeto junto ao CEP-Unigranrio



Duque de Caxias, 16 de fevereiro de 2018.

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para pesquisador Principal: Raphael Rangel das Chagas

Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

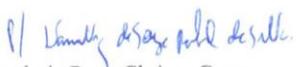
O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa **“PEPTÍDEOS E LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA ZIKA VÍRUS”**, protocolado sob o número de CAAE 70324417.1.0000.5283, encontrando-se a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

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

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



Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO



Andreia Peter Christo Gomes
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Título do Estudo: Peptídeos e lipossomas funcionalizados para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico sorológico para Zika vírus

Pesquisador Responsável: Raphael Rangel das Chagas e Sergian Vianna Cardozo

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

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

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 12 meses (08/2017 – 07/2018).

Descrição do Estudo

Este estudo será realizado na **Unidade Pré-Hospitalar Álvaro dos Santos Simões Figueira/PMDC**

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque foi diagnosticado, pelos seus sinais e sintomas, com suspeita de dengue, Chikungunya, febre amarela ou Zika vírus.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, será realizada a coleta de sangue total (10 - 15 mL) através de venopuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugado para retirada do soro, de acordo com as diretrizes de coleta sanguínea determinadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010).

Os resultados dos exames serão disponibilizados à Unidade Pré-Hospitalar Álvaro dos Santos Simões Figueira assim que foram processados no laboratório.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local de coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer. Serão tomados os cuidados cabíveis para minimizar estes riscos.

Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo experimental em laboratório que busca um método diagnóstico eficiente para a rápida detecção de Zika vírus em pacientes que apresentam sintomatologia compatível com esta virose.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a na detecção de um teste diagnóstico eficiente para o Zika Vírus.

Compensação

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

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.



Novas Informações

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

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

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

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

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

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Você terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são os Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo e Raphael Rangel das Chagas (mestrando) que poderão ser encontrado no Núcleo de Pesquisa em Parasitologia da Universidade do Grande Rio (Unigranrio) ou nos respectivos telefones: 21 2672-7812 ou 21 98737-3532.

Declaração de Consentimento

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a coleta de sangue e a utilização dos meus registros médicos (prontuários) pelo pesquisador, em prol desta pesquisa.

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

ANEXO 4

Laudo disponibilizado ao Hospital Moacir Rodrigues do Carmo à ser encaminhado aos pacientes que participaram da pesquisa.

		UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS INFECCIOSAS Av. Perimetral Prof. José de Souza <u>Hardy</u> , 1160 - Jardim Vinte e Cinco de Agosto, Duque de Caxias - RJ, 25071-202 Pesquisador responsável: <u>Pro^{fa}. Dr. Sergian Vianna Cardozo</u>													
Nome:		Data de nascimento:													
Nº do prontuário:		Nº do BAM:													
Data de atendimento:															
<p>REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (PCR-<u>qRT</u>)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>RESULTADO</th> <th>VALOR DE REFERENCIA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CHIKUNGUNYA VIRUS</td> <td></td> <td>NEGATIVO</td> </tr> <tr> <td>ZIKA VIRUS</td> <td></td> <td>NEGATIVO</td> </tr> <tr> <td>DENGUE VIRUS</td> <td></td> <td><u>NEGATIVO</u></td> </tr> </tbody> </table> <p>Data da liberação: Material: Sangue / Método: RT-<u>qPCR</u>.</p> <hr/> <p>Analizado por:</p> <p style="text-align: right;">Mestrandos Responsáveis <u>Hury</u> Hellen André Frederico Raphael Rangel</p> <hr/> <p>O resultado de laboratório sofre influência de estados fisiológicos e patológicos. Este laudo não é oficial e tem caráter exclusivamente informativo dos dados obtidos na pesquisa pela qual o paciente se prontificou a participar.</p>					RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA	CHIKUNGUNYA VIRUS		NEGATIVO	ZIKA VIRUS		NEGATIVO	DENGUE VIRUS		<u>NEGATIVO</u>
	RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA													
CHIKUNGUNYA VIRUS		NEGATIVO													
ZIKA VIRUS		NEGATIVO													
DENGUE VIRUS		<u>NEGATIVO</u>													