



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA – UFDPAR
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

JAIANE CRUZ DOS SANTOS

Investigação por técnicas moleculares de *Dengue virus* (DENV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV

Parnaíba - PI
Setembro de 2020

JAIANE CRUZ DOS SANTOS

Investigação por técnicas moleculares de *Dengue virus* (DENV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal do Delta do Parnaíba como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Parnaíba - PI

2020

JAIANE CRUZ DOS SANTOS

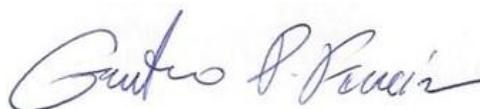
Investigação por técnicas moleculares de *Dengue virus* (DENV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na Universidade Federal do Delta do Parnaíba como requisito obrigatório para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

APROVADO EM 30/09/2020

BANCA EXAMINADORA



Profº. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Universidade Federal do Piauí



Ma. Dacylla Sampaio Costa

Universidade Federal do Piauí



Ma. Vanessa Poleana Silva

Universidade Federal do Piauí

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Prof. Cândido Athayde
Serviço de Processamento Técnico

S237i Santos, Jaiane Cruz dos

Investigação por técnicas moleculares de *Dengue virus* (DENV) e *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV [recurso eletrônico] / Jaiane Cruz dos Santos. – 2020.

1 Arquivo em PDF

Monografia (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

1. Arbovirose. 2. Febre de Chikungunya. 3. Vírus da Dengue. 4. Técnicas de Diagnóstico Molecular. I. Título.

CDD: 616.9

Dedico...

A minha mãe Patricia e ao meu irmão Jorge, pelo apoio, parceria e solicitude durante todo esse percurso, e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida, e pelas diversas oportunidades e graças que me concedeu até aqui.

A minha mãe, Patricia, por me apoiar em todas as decisões, e me orientar durante as incertezas. Ao meu irmão Jorge, por se fazer presente sempre que possível, e ajudar sempre que necessário. Essenciais para a segurança em trilhar meus caminhos, por sempre acreditarem em mim

A Prof. ^a Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, por ter confiado e indicado para a participação nos trabalhos desenvolvidos no Laboratório BIOMIC.

Ao meu orientador Prof. Gustavo Portela Ferreira, por me receber e conceder a oportunidade de ingresso na pesquisa, pelo acompanhamento, disponibilidade, pelos conselhos e sugestões de melhoria.

A todos os amigos adquiridos durante a convivência no Laboratório. Em especial, a minha querida amiga, Dacylla Sampaio, por me acolher e auxiliar em todos os momentos possíveis, pelo companheirismo e solicitude. Ao meu amigo/ irmão, Phillipe Pires, por todo o carinho, apoio e amizade. A minha amiga, Vanessa Poleana, por compartilhar comigo todo o aprendizado, e por me auxiliar em diversos momentos, principalmente na fase de adaptação a pesquisa. E ao prof. Thiago Gomes, pela contribuição em diversos momentos.

Aos amigos adquiridos durante a graduação, em especial Lucicleia Monteiro e Letícia Oliveira, pelo companheirismo e pelo compartilhamento da vida universitária. E ao Dackson Douglas, por dividir os momentos de alegria e de estresse principalmente nos passos finais da graduação.

A todos meus amigos de vida, em especial Raires Alves e Clara Lima, por se fazerem presentes em todos os momentos.

As amizades e relacionamentos são essenciais para a conclusão de todas as etapas da vida, por serem pontos de luz em momentos de crise, serem segurança no meio das tribulações e por darem força nos momentos de

fraqueza. Tenho muito a agradecer a todos que fazem parte da minha vida, sem vocês nada seria possível! OBRIGADA!

“O nitrogênio em nosso DNA, o cálcio em nossos dentes, o ferro em nosso sangue e o carbono em nossas tortas de maçã, foram feitos nos interiores de estrelas em colapso. Somos todos feitos de poeira estelar.”

Carl Sagan

“O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível.”

Max Weber

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	3
	2. 1. Arbovírus	3
	2.2. Flavivírus	5
	2.2.1. Dengue vírus	6
	2.2.1.1 Epidemiologia	6
	2.2.1.2 Diversidade Genética	8
	2.2.1.3. Ciclo de Transmissão	9
	2.2.1.4. Patogênese e Aspectos Clínicos	9
	2.3. Alfavírus	10
	2.3.1 Chikungunya vírus	11
	2.3.1.1. Epidemiologia	11
	2.3.1.2. Diversidade Genética	12
	2.3.1.3. Ciclo de Transmissão	13
	2.3.1.4. Patogênese e Aspectos Clínicos	13
	2.4. Diagnóstico molecular	15
3.	OBJETIVOS.....	19
	3.1. Objetivo Geral	19
	3.2. Objetivo Específico.....	19
4.	METODOLOGIA	20
	4.1 Aspectos éticos e legais	20
	4.2 Coleta e Obtenção dos dados clínicos laboratoriais dos pacientes positivos para CHIKV.....	20
	4.3 Testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e/ou IgG para DENV 20	20
	4.4 Diagnóstico Molecular	20
	4.4.1 Seleção de amostras.....	20
	4.4.2. Extração de RNA e Transcrição Reversa (RT).....	21
	4.4.3. RT-PCR convencional	21
	4.4.3.1 Construção de iniciadores e padronização de reação para amplificação das regiões NSP2 e E2-6K do genoma de CHIKV.....	21
	4.4.3.2. Dengue vírus (DENV)	22
	4.4.3.3 Visualização dos produtos amplificados.....	23
	4.4.4. RT-PCR em tempo real.....	23
	4.4.4.1. Chikungunya virus	23
	4.6 Acompanhamento clínico	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXO I	53
	ANEXO II	55
	ANEXO III	58

RESUMO

Os arbovírus constituem um grupo de vírus transmitidos por insetos artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo da fêmea, tais espécimes têm em comum, além da forma de transmissão, uma parte de seus sintomas que podem ser confundidos na clínica. O *Dengue vírus* (DENV) é o mais conhecido e prevalente, causa doença febril aguda que pode evoluir desde sintomatologia até casos fatais, apresenta distribuição mundial, com co-circulação dos 4 sorotipos no Estado do Piauí. Em 2014 um novo vírus foi introduzido no Brasil, sendo conhecido pela forte artralgia que causa aos pacientes, o *Chikungunya vírus* (CHIKV), além das dores na fase aguda cerca de 80% dos pacientes evoluem para uma fase crônica que levando a grande morbimortalidade. Visto que os arbovírus apresentam clínica semelhante o diagnóstico diferencial é mais seguro quando feito laboratorialmente, o sorológico é pouco específico pois leva consigo as reações cruzadas em diferentes vírus, o mais seguro é a realização de testes moleculares, sendo mais sensíveis e específicos. O presente trabalho teve como objetivo realizar a detecção molecular, RT-PCR e RT-qPCR, de DENV e CHIKV em amostras de soro de pacientes com sintomatologia sugestiva que procuraram o Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA), Pronto Socorro Municipal de Parnaíba/PI, Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMIC) ou o Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI) bem como a avaliação clínica de pacientes que seguiram para a fase crônica da doença viral. O RNA viral foi extraído seguindo protocolo proposto pelo fabricante e encaminhado para conversão em cDNA pela técnica de Transcriptase reversa e posterior amplificação do material presente pela PCR convencional, com a pretensão de incluir nova metodologia no laboratório, uma reação de RT-qPCR foi testada e validada para detecção de CHIKV em amostras de soro, além da padronização de RT-PCR convencional com novos iniciadores, que possibilitou a detecção de CHIKV. Os pacientes que tiveram detecção positiva foram acompanhados por meio de questionário semiestruturado e seu perfil epidemiológico e clínico foram avaliados. Os resultados identificaram 184 pacientes positivos para CHIKV os quais 68 evoluíram para a fase crônica, desses houve predominância do sexo feminino e idade superior a 49 anos, principais sintomas foram rigidez e edemas nas articulações periféricas, estudos que corroborem técnicas de detecção com análise do perfil de casos crônicos são de grande relevância visto que possibilitam um acompanhamento de casos com maior tendência a cronicidade. Durante o período do projeto não houve detecção de DENV. Através do estudo pode-se inferir acerca do padrão de circulação dos arbovírus na cidade de Parnaíba-PI, bem como delinear o perfil epidemiológico dos pacientes que evoluíram para a fase crônica de CHIKV.

Palavras-chaves: Arbovirose, Febre de Chikungunya, Vírus da Dengue, Técnicas de Diagnóstico Molecular.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivírus.** Adaptado Van Regenmortel e cols, 2000 6
- Figura 2. Representação do genoma dos Alphavirus** demonstrando organização de proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4, e estruturais C, E3, E2, 6K e E1 (Fonte: GALÁN – HUERTA et al, 2018 – Adaptado)..... 11
- Figura 3.** Marcadores de infecção por DENV. Viremia, antígeno não estrutural 1 (NS1) e anticorpos mudam com o tempo e diferentes testes diagnósticos serão apropriados de acordo com o estágio da infecção (Fonte: Guzman et al., 2016 - Adaptado)..... 16
- Figura 4. Comparação entre os sistemas TaqMan e SYBRGreen extraído e adaptado de <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/realtime-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html> 18
- Figura 5.** Delineamento dos testes moleculares realizados durante o projeto. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de CHIKV (1:50 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados para região dos genes E2 e 6K em diferentes condições de Ta (55°C, 56°C e 57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos..... 28
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de CHIKV (1:50 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados para o gene NSP2 em diferentes condições de Ta (52°C, 53°C, 54°C e 55°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos 29
- Figura 8(a,b,c,d).** a. Curva de amplificação do Teste 1 com concentração de iniciadores a 500 nM; b. Curva de amplificação do Teste 2 com concentração de iniciadores a 450 nM; c. Curva de amplificação do Teste 3 com concentração de iniciadores a 400 nM; d. Curva de amplificação do Teste 4 com concentração de iniciadores a 350 nM 35
- Figura 9.a.** Representação gráfica da curva padrão do teste 1 com concentração de iniciadores a 500 nM; b. Representação gráfica da curva padrão do teste 2 com concentração de iniciadores a 450 nM; c. Representação gráfica da curva padrão do teste 3 com concentração de iniciadores a 400 nM; d. Representação gráfica da curva padrão do teste 4 com concentração de iniciadores a 350 nM 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ciclo de temperatura adaptado de Kumar e colaboradores (2008).	22
Tabela 2. Sequência de iniciadores e de sonda selecionados para amplificação da região nsP1 do genoma de CHIKV em qPCR	24
Tabela 3. Descrição dos testes realizados para otimização de reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	24
Tabela 4. Descrição de ciclagem e temperatura utilizadas na qPCR.....	25
Tabela 5. Sequências dos iniciadores desenhados para amplificação das regiões E2 – 6K e NSP2 do genoma do arbovírus Chikungunya, e tamanho dos fragmentos.	27
Tabela 6. Amostras testadas para os genes E2-6K e NSP2, especificadas por número de protocolo, dias de sintomas e manifestações clínicas. +: positivo; -: negativo.....	31
Tabela 7. Valores dos parâmetros avaliados nos testes de padronização da reação de q PCR.....	37
Tabela 8. Características epidemiológicas dos pacientes com infecções crônicas por Chikungunya N=68	39
Tabela 9. Padrão de Acometimento Articular (n=68).	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BIOMIC** – Laboratório de Biologia de Microrganismos
- C** – proteína de capsídeo
- cDNA** – DNA complementar
- CHIKV** – *Chikungunya virus*
- Ct** – Cycle Threshold
- DCSA** - Dengue Com Sinais de Alarme
- DENV** – *Dengue virus*
- DHS** - Diidrotestosterona
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- DS** - Dengue Grave ou Severa
- DSSA** - Dengue Sem Sinais de Alarme
- E**- Proteína de envelope
- ECSA** - Leste/Centro/Sul Africano
- FD** - Febre do Dengue
- FHD**- Febre Hemorrágica do Dengue
- GelRed** – Gel corante de ácido nucleico
- HEDA** – Hospital Estadual Dirceu Arcoverde
- IgG** - Imunoglobulina G
- IgM** - Imunoglobulina M
- IOL** - genótipo do Oceano Indico
- JEV** – Vírus da Encefalite Japonesa (do inglês “*Japanese Encefalitis virus*”)
- Kb** – Kilobases
- LACEN** – Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga
- MAYV** – *Mayaro virus*
- MMLV- RT** – Enzima com atividade de Transcriptase Reversa (do inglês “*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*”)
- mRNA** – RNA mensageiro
- nM** - Nanômetro
- NS** – Proteínas não estruturais (do inglês “nonstructural protein”)
- ORF**- Matriz de Leitura Aberta (do inglês “*Open Reading Frame*”)
- Pb** – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)

pM - Picomoles

prM - Pré Membrana

RRV – Ross Rover virus

RT-PCR – Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*”)

RT-qPCR – Reverse Transcriptase – quantitative Polimerase Chain Reactive

SARS-CoV2 – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2

SCD - Síndrome do Choque da Dengue

SLEV – *Encefalite Saint Louis virus*

SNC – Sistema Nervoso Central

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTR - Região não traduzida (do inglês “*Untranslated region*”)

VEEV – Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (do inglês “*Venezuelan equine encephalitis virus*”)

WNV – *West Nile virus*

YFV – Vírus da Febre amarela (do inglês “*Yellow Fever virus*”)

ZIKV- *Zika vírus*

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são consideradas um dos principais problemas de saúde pública mundial (BRONZONI *et al.*, 2005; DONALISIO *et al.*, 2017; BROEDERS *et al.*, 2019). Caracterizadas por sua transmissão através de insetos artrópodes hematófagos, apresentam maior distribuição em áreas de clima tropical e subtropical, com aumento dos relatos fora dessas áreas durante as últimas décadas (SANTOS *et al.*, 2016; DONASILIO *et al.*, 2017; BROEDERS *et al.*, 2019). Os arbovírus constituem um grupo com mais de 100 vírus divididos em cinco famílias, sendo a família *Flaviviridae*, cujos os principais vírus são *Dengue virus* sorotipos de 1 a 4 (DENV 1-4), *Saint Louis Encephalitis virus* (SLEV), *Zika virus* (ZIKV) e *West Nile virus* (WNV), e a família *Togaviridae*, em que se destacam *Mayaro virus* (MAYV) e *Chikungunya virus* (CHIKV), estas são as famílias de maior importância no Brasil (BRONZONI *et al.*, 2005; PATTERSON *et al.*, 2016). Muito embora haja emergência de outros arbovírus dessas e de outras famílias, a exemplo do *Oropouche vírus*, pertencente à família *Bunyaviridae*, detectado nos estados de Mato Grosso e Pará, e o *West Nile vírus*, que teve sua circulação confirmada no Estado do Piauí (VASCONCELOS *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2020)

A Dengue é a mais prevalente das arboviroses, endêmica em todo mundo, apresenta um período de incubação de 3 a 15 dias, após o qual cerca de 50% dos pacientes apresentam sintomas clínicos inespecíficos que podem evoluir em três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação, (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; PATTERSON *et al.*, 2016; KATZELNICK *et al.*, 2017; AULT *et al.*, 2017; WHO., 2019). O CHIKV tem se destacado por provocar grandes surtos e epidemias, levando à redução da produtividade por longos períodos ocasionando sérios impactos econômicos (HONÓRIO *et al.*, 2015; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; BURT *et al.*, 2017). A doença tem como principal sintoma a artralgia intensa e pode evoluir em três fases: aguda, com duração de 7 a 14 dias; subaguda, com duração de até 3 meses, e crônica, cujos sintomas podem permanecer por mais de 3 meses. Aproximadamente 40-80% dos pacientes evolui para cronicidade com

prevalência dos sintomas articulares, podendo apresentar queixas de dores articulares persistentes ou em recidivas, bem como evoluir para quadros de acometimento neurológico, como polineuropatias. Ainda não há explicações definitivas para a ocorrência, porém acredita-se que fatores inerentes ao hospedeiro, como idade, sexo e comorbidades podem estar relacionadas (MARQUES *et al.*, 2017; DE BRITO, 2017; SILVA *et al.*, 2019).

A região Nordeste tem despontado ao longo dos anos como uma das regiões mais afetadas por diferentes arboviroses. O Estado do Piauí é considerado hiperendêmico com co-circulação dos quatro sorotipos de DENV, além de outros arbovirus como o próprio CHIKV (SANTOS, 2012; VALE, 2015; GARCES, 2015; BARROS, 2018).

O diagnóstico clínico das arboviroses frequentemente é dificultado por apresentarem sintomatologia semelhante nas fases iniciais, como cefaleia, rash, artralgia, mialgia e exantema. Os testes sorológicos apresentam pouca especificidade que advém das reações cruzadas que ocorrem entre os antígenos virais circulantes, com isso contribuem para a subnotificação de outros arbovírus presentes nas mesmas áreas, principalmente onde há co circulação, como o caso do Brasil. Atualmente, os métodos de detecção molecular são os mais sensíveis e específicos na identificação de arboviroses (BRONZONI *et al.*, 2005; MORELI; COSTA, 2013; LIMA-CÂMARA, 2016). Visto isto, é possível dizer que estudos sobre métodos de diagnóstico molecular são de grande relevância para a saúde pública, já que a busca por novos protocolos permite a detecção de uma maior diversidade de vírus, além de possibilitar a detecção e identificação precoce do agente etiológico otimizando o tempo de início do tratamento. Ademais o acompanhamento clínico de casos crônicos relacionados a infecção por CHIKV permite inferir sobre fatores que favorecem tal evolução clínica, possibilitando um rastreio dos pacientes com maior risco.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. 1. Arbovírus

Os arbovírus são vírus de RNA mantidos na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo um vetor artrópode hematófago e um hospedeiro vertebrado (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; DONASILIO *et al.*, 2017; MORELI; COSTA, 2013). De forma geral, são transmitidos pela picada da fêmea de mosquitos durante o repasto sanguíneo, podendo também ser transmitidas por outros insetos, como carrapatos. Cada arbovírus pode ser carregado por múltiplas espécies de mosquitos, sendo o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* as mais importantes, por sua ampla distribuição geográfica e sua capacidade vetorial (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; LETA *et al.*, 2018; EVANS-GILBERT, 2019)

O conjunto dos arbovírus possui cerca de 545 espécies, dessas aproximadamente 150 são consideradas de importância clínica, e estão divididas em cinco famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Bunyaviridae*, essa última têm adquirido destaque recentemente através da emergência do vírus *Oropoche* com ocorrência de surtos em diferentes regiões do Brasil (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2014; DENDASCK *et al.*, 2016).

As arboviroses, infecções com etiologia nos arbovírus, se configuram como um sério problema para a saúde e economia mundial, por sua atuação em grandes epidemias ao longo dos anos e o aumento de gastos públicos com diagnóstico e tratamento, além de sua importância na morbimortalidade (BRONZONI *et al.*, 2005; FIGUEIREDO, 2007; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). A clínica, quando sintomáticas pode se configurar desde uma doença febril indiferenciada a febre hemorrágica ou ainda uma doença neurológica invasiva (LIANG *et al.*, 2015; Mayer; TESH; VASILAKIS, 2017; DONASILIO *et al.*, 2017). A ocorrência de sintomas semelhantes, principalmente na fase aguda, dificulta a realização de um diagnóstico clínico preciso devido à similaridade nas apresentações clínicas (MORELI; COSTA, 2013; BRONZONI *et al.*, 2005).

Diversos fatores têm contribuído para a expansão e epidemias de arbovírus em diferentes regiões do mundo, como a movimentação humana ao redor do globo, uma vez que o vírus é capaz de permanecer em um hospedeiro

por longos períodos favorecendo sua transmissão e introdução em novos países (BROEDERS *et al.*, 2019; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; MOTA *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2019). A grande capacidade de adaptação das espécies, por mutações no genoma de RNA e seleção de linhagens mais resistentes, é conivente a sua distribuição em diferentes ambientes (FIGUEIREDO, 2015; FIGUEIREDO, 2007; COFFEY *et al.*, 2013). No Brasil, a grande proliferação dos vetores de transmissão, o clima tropical e subtropical, a presença de vastas áreas de florestas e o crescimento urbano são fatores favoráveis a emergência e reemergência de diferentes espécies de arbovírus. A busca por formas de diminuição da circulação de novos vírus torna-se importante principalmente em territórios já endêmicos para dengue, visto que surtos concomitantes de arboviroses podem causar colapso dos serviços de saúde (MORELI; COSTA, 2013; ESPOSITO; FONSECA, 2016; LIMA-CÂMARA, 2016; LORENZ *et al.*, 2017).

Dentre os arbovírus circulantes, o DENV configura-se como principal espécie por sua grande distribuição geográfica, facilitada pela onipresença do seu vetor *Aedes aegypti*, ocasionando surtos e endemias em diversas regiões de clima tropical e subtropical do globo, chegando mesmo a níveis hiperendêmicos (ROBERTS *et al.*, 2019; DIGHE *et al.*, 2019). Como verificado nos estudos produzidos no laboratório BIOMIC onde foi detectada a co-circulação dos quatro sorotipos de DENV na cidade de Parnaíba-PI (SANTOS, 2013; VALE, 2015; GARCÊS, 2016)

Outro arbovírus que têm adquirido importância desde seu primeiro surto no Brasil em 2016 é o CHIKV, no mesmo período CARDOSO e colaboradores, 2019, no laboratório BIOMIC, detectaram a circulação do vírus em Parnaíba. Tal patógeno está correlacionado com uma permanência de dores articulares de forma crônica após o período de viremia da doença, o que acarreta perdas econômicas e alta taxa de morbidade, além de estar também relacionado a manifestações graves, como acometimento neurológico (BAGNO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2019).

Os métodos sorológicos são pouco úteis para uma intervenção clínica rápida, além de apresentarem reações cruzadas entre antígenos relacionados, tais testes possuem especificidade reduzida, sendo comum a ocorrência de falso-negativo, como consequência muitos dos arbovírus são negligenciados.

Em contraste, os métodos moleculares de diagnóstico são sensíveis e específicos, e podem ser aplicados logo na primeira semana após início dos sintomas, sendo ideais para o diagnóstico diferencial em áreas de co-circulação de arboviroses (MORELI; COSTA, 2013; FURUYA-KANAMORY *et al.*, 2016; LIMA-CÂMARA, 2016; BROEDERS, 2019).

2.2. Flavivírus

Os flavivírus são um gênero de vírus que possui RNA de fita simples, que causam infecções endêmicas que vão desde infecções clinicamente inaparentes até doenças graves, tais como patologias sistêmicas ou neurotrópica-encefálica em humanos. Os desfechos mais graves incluem manifestações hemorrágicas e vazamento vascular com falência de órgãos (DENV e YFV), meningiomielencefalite (JEV e WNV) e síndrome do Zika congênita em mulheres grávidas e síndrome de Guillain-Barré em adultos associada à infecção pelo ZIKV (CHONG *et al.*, 2019; KRAUER *et al.*, 2017).

O gênero está incluído na família *Flaviviridae* e possui como principais integrantes os vírus: Saint Louis Encefality (SLEV), Dengue (DENV1-4), Zika (ZIKV), West Nile (WNV) e Yellow Fever (YFV). Tais vírus possuem um genoma de aproximadamente 11 kb (FERREIRA *et al.*, 2008) que codifica uma única poliproteína que é clivada por proteases virais em dez proteínas, por ordem de codificação: proteína de capsídeo (C), proteína de membrana (prM) e proteína de envelope (E), que ocupam o final 5' e são proteínas estruturais, o restante da ORF é composta por genes de proteínas não estruturais (NS) denominadas, em ordem: NS1, NS2A, , NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (PUERTA-GUARDO *et al.*, 2019; GRAVINA *et al.*, 2018; SHAH, 2018).

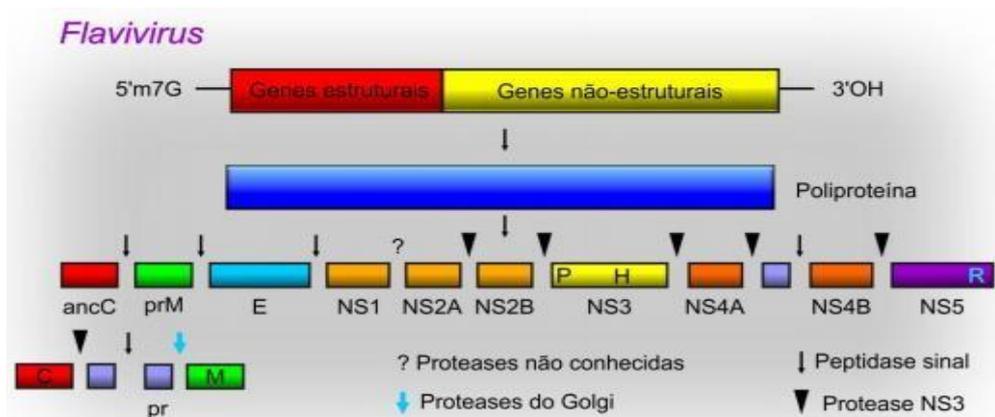


Figura 1. Organização genômica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivirus. Tradução de uma única poliproteína que é posteriormente clivada por proteases virais e celulares. As abreviações C, E, prM e NS indicadas na figura, representam os genes que codificam para proteínas do Capsídeo (C), Envelope Viral (E) e pré-membrana (prM), relacionadas à montagem da partícula viral e finalmente, as proteínas não-estruturais (NS) que se relacionam à replicação do vírus. Adaptado Van Regenmortel e cols, 2000.

Os flavivírus são capazes de infectar monócitos, macrófagos e células dendríticas. O início da infecção envolve a fixação do vírus à superfície celular, seguido de sua entrada por endocitose (GUZMAN *et al.*, 2016). O baixo pH do endossomo induz a fusão do envelope do vírus com membranas celulares, provocando mudanças conformacionais da proteína E, que libera o nucleocapsídeo no citoplasma, com isso o RNA é liberado e a replicação viral é iniciada com a formação de proteínas estruturais e não estruturais (CHONG *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2014). A replicação do genoma acontece por meio da síntese de uma fita de RNA senso negativo, que serve de molde para a síntese das demais moléculas de RNA polaridade positiva. O processo é finalizado após o amadurecimento e liberação das partículas virais maduras, por meio de exocitose, sendo estes capazes de infectar novas células (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005; GUZMAN *et al.*, 2016).

2.2.1. Dengue vírus

2.2.1.1 Epidemiologia

O DENV é o mais prevalente dos arbovírus, cuja incidência teve um aumento de aproximadamente 30 vezes ao longo dos últimos 40 anos, e mais de 390 milhões de novas infecções por ano, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (AULT *et al.*, 2017; GUZMAN *et al.*, 2016; BLANCHARD *et al.*, 2019). As primeiras descrições datam do século XVII, com a ocorrência de

surtos no século seguinte, concomitantemente nos continentes da Ásia, África e América, demonstrando sua ampla distribuição geográfica ainda em sua descoberta (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Sendo isolado pela primeira vez em soldados japoneses acometidos por uma doença febril (KIMURA; HOTTA, 1944).

A crescente globalização contribuiu de forma significativa para a expansão mundial do vírus, que atualmente encontra-se em estado endêmico em mais de 100 países pelo mundo, em sua maioria os de clima tropical e subtropical (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; BHATT *et al.*, 2013; PATTERSON *et al.*, 2016).

Os primeiros relatos de surtos de dengue no Brasil são do início do século XIX, entretanto, a presença do arbovírus foi comprovada após o seu isolamento em 1982, na cidade de Boa Vista, Roraima, onde foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4. Os primeiros casos graves aconteceram em 1990, quando houve a introdução do sorotipo DENV-2, considerada a cepa mais virulenta (JING; WANG, 2019).

Na região Nordeste o Dengue está presente desde o início do século 90, quando os surtos da doença se tornaram mais frequentes. Ao longo dos anos a região foi uma das principais atingidas pelas epidemias no país, juntamente com a região Sudeste (CALVACANTI *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2014; PATTERSON *et al.*, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2015). No Estado do Piauí o primeiro caso foi registrado na cidade de Teresina em 1996, sendo atribuído ao sorotipo DENV-2, desde então os demais sorotipos foram acrescidos a dinâmica de circulação no Estado (CASTRO, *et al.*, 2003; GARCÊS, 2016; SANTOS, 2013; VALE, 2015).

Segundo o Ministério da Saúde, foram registrados 1.544.987 casos prováveis de dengue no Brasil em 2019, destes 1.419 foram confirmados e classificados como dengue grave e 18.740 como dengue com sinais de alarme, sendo que 782 casos evoluíram para óbito. O Nordeste apresentou a terceira maior taxa de incidência (376,7 casos/100 mil habitantes), logo atrás das regiões Centro-Oeste e Sudeste. Dos casos notificados 7.953 foram registrados no Piauí, com uma taxa de incidência de 243 casos/100 mil habitantes.

Enquanto, até a semana epidemiológica número 29 de 2020, com boletim publicado em agosto, 905.912 casos prováveis de Dengue foram notificados em

todo território brasileiro, desses 124.296 no Nordeste, com 1.815 sendo no Piauí. Quando comparado aos casos em 2019 observa-se uma diminuição na incidência, tal redução pode ser atribuída a mobilização nacional para o combate ao SARS-CoV2 o que pode ter ocasionado uma subnotificação nos casos de arboviroses, visto que as observações dos primeiros boletins levavam a aumento de casos (LORENZ, *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2020).

2.2.1.2 Diversidade Genética

O DENV possui quatro sorotipos antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV - 4, pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*, apresentando genoma de RNA fita simples, senso positivo. Formado por 10.644 nucleotídeos organizados em uma única fase de leitura aberta (ORF) que codifica poliproteína de 3.386 aminoácidos flanqueadas por duas regiões não traduzidas (5' e 3' UTR), assim como os demais vírus pertencentes a família (MCMINN, 1997; CLYDES; HARRIS., 2006; FERREIRA *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2014;).

O isolamento do primeiro sorotipo (DENV-1) foi realizado em soldados japoneses e, de forma concomitante, em soldados americanos provenientes do Havaí. Posteriormente um novo sorotipo (DENV-2) foi isolado de amostras provenientes de Nova Guiné (SABIN; SCHLESINGER, 1945). Os sorotipos DENV-3 e DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (HAMMON *et al.*, 1960)

Ao decorrer das atividades desenvolvidas no laboratório BIOMIC, SANTOS (2013), VALE (2015) e GARCÊS (2016) identificaram a co-circulação dos quatro sorotipos do dengue no Estado do Piauí, o que demonstra um padrão hiperendêmico que pode facilitar a evolução clínica para as formas graves da infecção. Apesar das constantes notificações acredita-se que haja uma ampla subnotificação que têm persistido por motivos como: diagnóstico errôneo da infecção, infecções assintomáticas, dificuldade dos pacientes em procurar atendimento médico e mortes nas áreas rurais antes de receber cuidados apropriados (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; ROBERT *et al.*, 2019).

Dentro de cada um dos sorotipos, existe um grau de variação genética, o que confere ao vírus uma constância de surtos, quando um novo sorotipo é introduzido (HALSTEAD, 2006).

2.2.1.3. Ciclo de Transmissão

O *Dengue vírus* são um dos poucos arbovírus que se adaptaram aos seres humanos e ao ambiente doméstico, sem a necessidade de um ciclo florestal, que é o comum aos demais vírus do grupo. Atualmente, o principal ciclo de transmissão envolve somente seres humanos e mosquitos nos grandes centros urbanos tropicais (LINDENBACH *et al.*, 2007).

O principal vetor é o *Aedes aegypti*, entretanto, o *Aedes albopictus* e o *Aedes polynesiensis* são incluídos como vetores secundários, um mosquito pode infectar vários indivíduos (LIM *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). A infecção do vetor acontece durante o repasto sanguíneo da fêmea, ao consumir sangue de paciente anteriormente contaminado (SAHAK., 2020). A presença do vetor é um dos pontos chaves para novos surtos, bem como a introdução de um novo sorotipo (CHONG *et al.*, 2019).

2.2.1.4. Patogênese e Aspectos Clínicos

O DENV tem capacidade de infectar diferentes tipos celulares, iniciando sua replicação nas células dendríticas da pele, apresentando período de incubação que varia entre 3 a 14 dias, após o contato com o vetor. Em seguida, o paciente pode evoluir para 3 fases clínicas distintas: fase febril, que corresponde ao período de viremia e dura de 3 a 7 dias, nessa etapa os sintomas são inespecíficos, sendo febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia, dor retroorbital e manifestações hemorrágicas cutâneas leves, os mais comuns. A maior porcentagem dos pacientes evolui para a fase de recuperação, no entanto aproximadamente 5% sofrem com manifestações hemorrágicas graves e anomalias vasculares, sintomas esses que caracterizam a fase crítica da doença, e podem levar a óbito (LANCIOTTI *et al.*, 1992; PATTERSON *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2014; VALLE *et al.*, 2015).

A Organização Mundial da Saúde classifica as manifestações clínicas da infecção por Dengue de acordo com o nível de gravidade apresentado nas diferentes fases, na fase febril: Dengue Sem Sinais de Alarme (DSSA), fase crítica: Dengue Com Sinais de Alarme (DCSA), Dengue Grave (DG) e Choque (GUZMAN *et al.*, 2016; BRASIL, 2016). A dengue hemorrágica ou a síndrome do choque da dengue levam a 20.000 mortes anualmente (WEBSTER *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2020). O desenvolvimento de dengue grave está diretamente ligado a

produção de anticorpos neutralizantes produzidos em uma primeira infecção por um dos sorotipos do dengue (IVORY; BIRCHALL; PIGUET, 2015; CASTAÑEDA, 2017).

Por ter quatro sorotipos distintos a infecção primária por um deste sorotipos, gera uma resposta imune monotípica que garante a proteção contra vírus de mesmo sorotipo, chamados de homólogos, bem como uma proteção parcial e transitória contra cepas heterólogas de Dengue. Esses anticorpos irão ligar-se a partícula viral de outro sorotipo de DENV em uma segunda infecção, sem provocar sua neutralização, mas facilitando a entrada do vírus em células do sistema imunológico (UNO *et al.*, 2018; DIGHE *et al.*, 2019; BLANCHARD *et al.*, 2019; JOHN; ABRAHAM; GLUBER, 2013). Dessa forma, uma infecção secundária heteróloga, que é a infecção com um sorotipo DENV diferente daquele da infecção anterior, pode aumentar o risco de DG através do realce dependente de anticorpos (GLUBER, 1998; KATZELNICK, 2017). Entretanto, dado que apenas uma pequena proporção de infecções secundárias resulta em doença grave, é provável a predisposição genética subjacente (COFFEY *et al.*, 2009; PARE *et al.*, 2019)

2.3. Alfavírus

Os alfavírus são responsáveis por um número considerável de doenças humanas e animais, podendo causar doenças artríticas e encefalites, os infectados podem apresentar sintomas como febre, erupção cutânea e artrite. O gênero pertencente à família *Togaviridae* tem mais de 40 membros cujos mais significantes são os vírus: Chikungunya virus (CHIKV), Mayaro virus (MAYV), Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e o Ross River virus (RRV) (HERNANDEZ *et al.*, 2014).

Os vírus do gênero têm sido classificados como vírus do Velho ou Novo Mundo, dependendo de sua distribuição geográfica, e é provável que tenham ocorrido várias trocas transoceânicas, provavelmente mediadas por pássaros. Os vírus do Velho Mundo frequentemente causam febre, erupção cutânea e doenças artríticas, enquanto os do Novo Mundo majoritariamente levam a encefalites (POWERS *et al.*, 2001; GARMASHOVA *et al.*, 2007).

Os alfavírus são pequenos (65-70nm de diâmetro), de formato esférico e envelopados. Seu genoma é composto por uma única fita de RNA senso positivo de 11 a 12 kb de comprimento e possui duas matrizes de leitura aberta (ORFs). O RNA codifica quatro proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4 e cinco proteínas estruturais capsídeo, E3, E2, 6K e E1, com ordem de organização inversa a encontrada nos *Flavivírus*, iniciando pelas proteínas não estruturais na porção 5' seguida pelas proteínas estruturais (GRAVINA *et al.*, 2018; ESPOSITO; FONSECA, 2016; GALÁN – HUERTA *et al.*, 2015.)

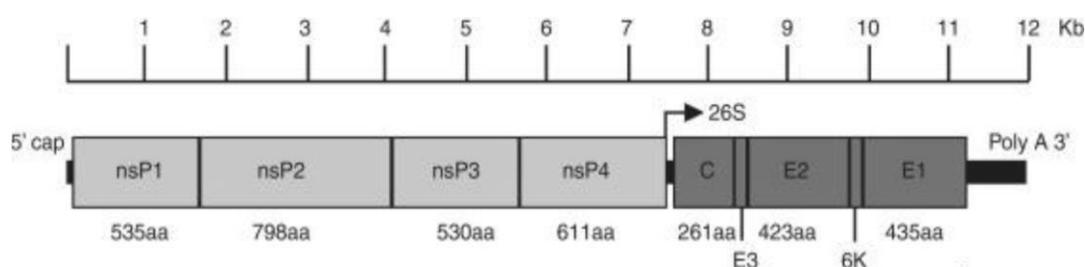


Figura 2. Representação do genoma dos Alfavírus demonstrando organização de proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4, e estruturais C, E3, E2, 6K e E1 (Fonte: GALÁN – HUERTA *et al.*, 2018 – Adaptado).

O processo de entrada em uma célula susceptível começa pelo acoplamento de um receptor do hospedeiro ao vírus, em seguida ocorre a endocitose mediada por receptor, fusão do envelope viral, desmontagem do núcleo e liberação do RNA genômico, após mudanças conformacionais nas glicoproteínas E2 e E1. As proteínas de replicação são traduzidas e processadas, e permitem a replicação do RNA genômico de entrada e a tradução do mRNA em proteínas estruturais (JOSE *et al.*, 2009).

2.3.1 Chikungunya vírus

2.3.1.1. Epidemiologia

O CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1952 no Leste da África, sua infecção é caracterizada pelo desenvolvimento de intensa artralgia, razão de sua denominação que significa “aquele que se dobra para a frente”, no idioma Makonde, fazendo referência a postura que os doentes apresentavam no curso da doença (HONÓRIO *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2017; LIMA-CÂMARA, 2016; GOUPIL; MORES, 2016). Em 2005 a febre Chikungunya chamou atenção por causar diversas epidemias nas ilhas do Oceano Índico, após isso o vírus começou a espalhar-se por diversas regiões da Europa e posteriormente chegou

a outros continentes (SÁ *et al.*, 2017; DENDASCK *et al.*, 2016). O primeiro caso autóctone das Américas foi registrado em 2013 na Ilha Saint Mart, Caribe, no ano seguinte o vírus foi isolado no Brasil, em Oiapoque, estado do Amapá, ocasionando uma epidemia em 2015 (LIMA-CÂMARA, 2016;). A primeira detecção de CHIKV no estado do Piauí (CARDOSO *et al.*, 2019) foi feito em 2016 no nosso laboratório, BIOMIC, entretanto, estudos filogenéticos sugerem uma circulação silenciosa desse vírus, desde 2015, corroborando com achados similares em outros estados, como Alagoas (Costa *et al.*, 2017), Rio de Janeiro (SOUZA *et al.*, 2019).

O Brasil está entre os países com mais casos notificados, seguido por Bolívia e Colômbia (OMS, 2017). Segundo o Ministério da Saúde foram notificados 132.205 casos prováveis no país, em 2019, com as regiões Sudeste e Nordeste apresentando as maiores taxas de incidência, 104,6 casos/100 mil habitantes e 59,4 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Em relação a óbitos, 92 foram registrados, majoritariamente no estado do Rio de Janeiro (71,7%). Dos casos confirmados 898 residiam no estado do Piauí.

Até agosto de 2020, SE 29, foram notificados 35.440 casos prováveis, com a região Nordeste apresentando a maior taxa de incidência, sendo 62,1 casos/100mil habitantes, a respeito dos óbitos 12 foram confirmados por dados laboratoriais. Dos casos 151 foram confirmados no estado do Piauí.

2.3.1.2. Diversidade Genética

O vírus possui quatro genótipos diferentes: Ocidental Africano (Wf), genótipo oriental, ou do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), genótipo Asiático, e o mais recentemente o genótipo do Oceano Índico (IOL), evidências genéticas e epidemiológicas demonstraram que o genótipo ECSA está associado aos surtos que ocorreram no Brasil (GAUTRET; SIMON, 2016). A caracterização de amostras de pacientes provenientes do Piauí determinou a circulação do genótipo ECSA no estado, desde 2015 (BARROS *et al.*, 2017; CARDOSO *et al.*, 2019)

Ao decorrer de sua evolução o vírus sofreu uma importante mutação que substituiu um único aminoácido, uma alanina por valina na posição 226 (A226V) na proteína de envelope E1, o que conferiu um maior poder de disseminação por

umentar a capacidade do mosquito *Aedes albopictus* de transmitir CHIKV (VU *et al.*, 2017)

2.3.1.3. Ciclo de Transmissão

Seu principal meio de transmissão é pela picada da fêmea dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* durante o repasto sanguíneo da fêmea, a transmissão pelo último tornou-se mais acentuada após a mutação A266V na proteína E1 (TSETSARKIN *et al.*, 2007, MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Apesar dessas espécies apresentarem maior recorrência de contaminação, um estudo recente no Brasil o CHIKV foi encontrado em fêmeas de *Aedes fluviatilis* e em *Wyeomyia bourrouli*, bem como em machos de *A. albopictus*, demonstrando possível papel de outras espécies de vetores na transmissão do vírus e transmissão vertical entre os artrópodes (XIMENES *et al.*, 2020).

Além dessa forma de contágio, estudos recentes relataram a transmissão vertical do vírus, acontecendo em 50% das gestações em que a mãe estava em viremia durante o parto (GERARDIN, 2008; PATTERSON *et al.*, 2016; GALÁN – HUERTA *et al.*, 2018).

2.3.1.4. Patogênese e Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da febre Chikungunya se iniciam após um período de incubação de 1 a 12 dias, com média de 3 a 7 dias, após sua replicação nos fibroblastos intradérmicos e dispersão pela corrente sanguínea, podem evoluir em três fases: aguda, subaguda e crônica (KAM *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2016; GIACOMIN *et al.*, 2018). Os sintomas da fase aguda, que pode durar entre 7 a 14 dias, são caracterizados por febre alta de início súbito, artralgia intensa e poli articular, edema, erupção cutânea, também podem ocorrer vômitos, cefaleia, mialgia, principalmente nos braços, antebraços, coxas e panturrilhas, astenia, exantema maculopapular, com ou sem prurido, e lesões orais, entre outros sintomas (CUNHA *et al.*, 2017). Relatos acerca do acometimento articular durante a fase aguda variam entre rigidez nas articulações distais, como interfalangianas das mãos e pés, tornozelos e punhos, principalmente ao acordar (BORGHERINI *et al.*, 2007). Mais de 80% dos pacientes demonstram-se assintomáticos durante essa fase (HONÓRIO *et al.*, 2013; AMDEKAR *et al.*, 2017; MURILLO-ZAMORA *et al.*, 2017).

Cerca de 88% dos pacientes tem persistência dos sintomas após a fase aguda, o que caracteriza a fase subaguda que pode durar até 3 meses e possui como principal queixa os sintomas articulares, entre eles: artralgia, artrite, bursite e tenossinovite, em conjunto com astenia e rigidez matinal, podendo ocorrer de maneira intermitente ou em recidivas (GOUPIL; MORES, 2016; JAVELLE *et al.*, 2015). Alguns pacientes ainda apresentam uma melhora transitória em sua condição clínica com recidiva ocorrendo após um breve período sem sintomatologia (CUNHA *et al.*, 2018). Nesse período pode ocorrer descompensação de artropatias traumáticas ou degenerativas pré-existentes, como osteoartrite ou tendinite. Além disso, edemas reacionais, síndrome de compressão nervosa, rigidez articular matinal, dor neuropática e fenômenos vasculares periféricos, como a síndrome de Raynaud, também foram descritos (SIMON *et al.*, 2015)

Cerca de 40 a 80% dos infectados seguem com a sintomatologia por mais de 3 meses, o que configura a fase crônica da doença, estudos realizados no Brasil demonstraram essa proporção está entre 45,7% a 75%, enquanto dados internacionais apontam que a taxa de casos crônicos é de aproximadamente 50%. (DIAS *et al.*, 2018; BURT *et al.*, 2017). Aproximadamente 5% dos pacientes desenvolvem artrite reumatoide atingindo principalmente as articulações dos punhos, joelhos, tornozelos, mãos e pés, associada a rigidez matinal e edema articular, a cronicidade também inclui a presença de oligo ou poli artralgia de intensidade variável, que assim como na doença aguda tende a ser bilaterais e simétricas (HONÓRIO *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2019). Outras manifestações musculoesqueléticas podem caracterizar a fase crônica, como a tenossinovite, atingindo um ou mais tendões (WAYMOUTH *et al.*, 2013). Durante a fase crônica, a dor incapacitante pode afetar as atividades diárias do paciente, causando redução da qualidade de vida, astenia, depressão e ansiedade, além disso deformidades musculoesqueléticas foram descritas, além do agravamento de comorbidades, como hipertensão e diabetes (SCHILTE *et al.*, 2013; COUTURIER *et al.*, 2012; SIMON *et al.*, 2015; CALVACANTI *et al.*, 2018)

Quanto ao mecanismo responsável pela cronicidade provocada por CHIKV, este não está totalmente elucidado, no entanto, alguns fatores inerentes ao hospedeiro se mostram propícios a evolução da doença, como idade acima

de 40 anos, presença de comorbidades, intensidade da dor no início da infecção, sexo feminino, dentre outros, além disso, algumas características associadas a variabilidade genética do vírus podem estar associadas a intensidade e gravidade dos sintomas (ZAID *et al.*, 2018). Nas fases subaguda e crônica a infecção pode apresentar quadro clínico semelhante a algumas doenças reumáticas crônicas, acredita-se que esses sintomas sejam decorrentes de danos tissulares em articulações causados pela resposta imune do hospedeiro contra a replicação viral (PATTERSON *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2017).

Alguns pacientes, em especial os neonatos, idosos e paciente com algum tipo de comorbidade, correspondendo a aproximadamente de 0,3-1%, podem apresentar sintomas graves, como falência múltipla de órgãos, acometimento do sistema nervoso, arritmia cardíaca, hepatite e insuficiência renal, podendo ainda envolver manifestações oculares, cutâneas e pulmonares (HONÓRIO *et al.*, 2013; ESPOSITO; FONSECA, 2016; GOUPIL; MORES, 2016; ARAÚJO, 2016; AMDEKAR *et al.*, 2017; DE BRITO, 2016; CALVACANTI *et al.*, 2017; FRUTUOSO *et al.*, 2020). As complicações neurológicas são as segundas mais prevalentes, representando até 25% dos casos atípicos e 60% dos casos atípicos graves, variando entre encefalite, neurite óptica, mielorradiculite à síndrome de Guillain-Barré (SGB), podendo causar sequelas drásticas, como deficiência mental, cegueira e paralisia persistente, até mesmo em pessoas jovens e previamente saudáveis (TANDALE *et al.*, 2009; CERNY *et al.*, 2017; BELTRÁN-SILVA *et al.*, 2018), Tais manifestações afetam os pacientes de maneira significativa, um estudo realizado por SILVA e colaboradores, 2019 relata um caso clínico cuja paciente apresentou polineuropatia com redução da capacidade de condução motora, confirmada por estudos de condução nervosa.

2.4. Diagnóstico molecular

Os arbovírus apresentam sintomatologia similar principalmente em suas fases iniciais, o que dificulta o diagnóstico clínico e aumenta a necessidade de um diagnóstico laboratorial. Diferentes métodos podem ser utilizados a depender do período clínico de infecção (Figura 3) (MULLER *et al.*, 2017)

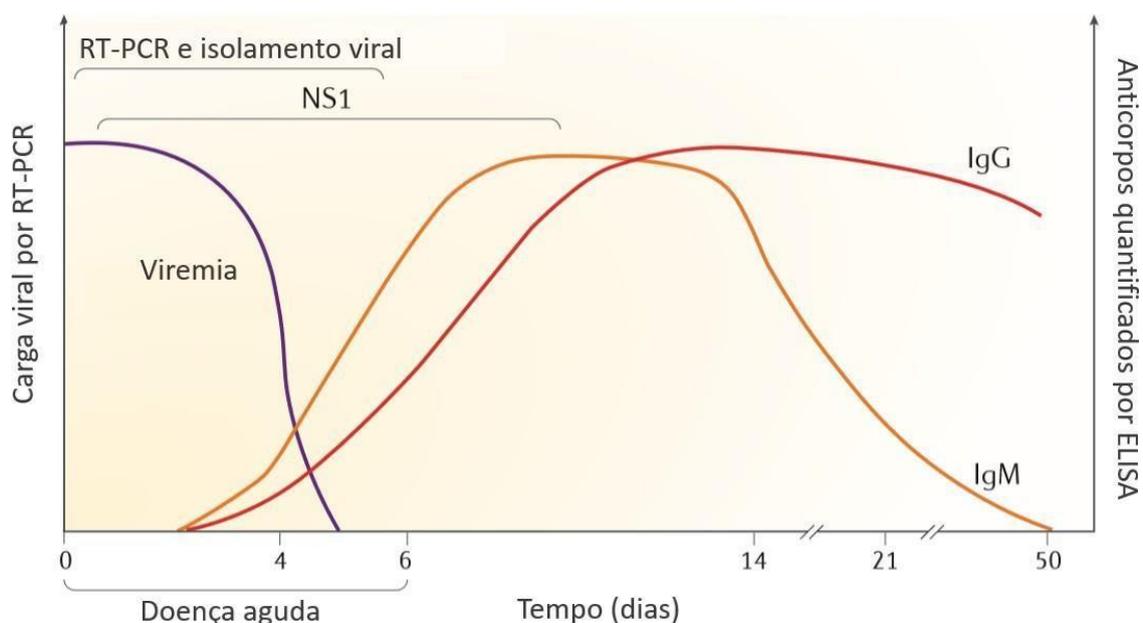


Figura 3. Marcadores de infecção por DENV. Viremia, antígeno não estrutural 1 (NS1) e anticorpos mudam com o tempo e diferentes testes diagnósticos serão apropriados de acordo com o estágio da infecção (Fonte: Guzman et al., 2016 - Adaptado)

Os testes de detecção mais utilizados são os sorológicos, por serem rápidos e possuírem com custo acessível. A sorologia detecta anticorpos (IgM e IgG) produzidos contra a infecção (PEELING *et al.*, 2010). No entanto, essas técnicas por vezes podem se mostrar falhas, apresentando reações cruzadas entre vírus filogeneticamente relacionados, principalmente em áreas endêmicas para mais de um arbovírus, como é o caso do estado de Manaus, onde uma infecção pelo *Dengue virus* pode ser confundida com febre amarela, febre MAYV, malária ou febre Oropoche. O Piauí também apresenta circulação de diversos arbovírus, sendo confirmado por diferentes estudos, como VIEIRA, 2014 que identificou o vírus *West Nile* no Estado por métodos sorológicos (MORELI; COSTA, 2013; KAM *et al.*, 2015).

As informações acerca do diagnóstico previnem os erros inerentes ao contexto epidêmico, como em regiões com circulação de diversos arbovírus, e garantem a intervenção terapêutica precoce o que, principalmente nos casos de pacientes com suspeita de infecção por Chikungunya, pode diminuir a ocorrência de pacientes com sintomas crônicos (MARQUES *et al.*, 2017; BLETTYERY *et al.*, 2019).

Os métodos moleculares utilizados para detecção de patógenos tem ganhado destaque por apresentarem melhor especificidade e sensibilidade (MYHRVOLD *et al.*, 2018). Os testes moleculares atuam na identificação da replicação dos ácidos nucléicos virais presentes em amostras clínicas de pacientes infectados em estado de viremia, para diagnóstico diferencial de arbovírus a técnica mais utilizada é a RT-PCR (do inglês “*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*”) e suas variantes, como o caso da RT-PCR quantitativa (qRTPCR), que fornece o resultado durante a amplificação por meio de reações fluorescentes (MORELI; COSTA, 2013; XAVIER, 2017).

A RT-PCR em tempo real permite a detecção mais rápida do patógeno pesquisado. Durante a execução uma curva de amplificação é formada pela captura da fluorescência emitida durante os ciclos. Atualmente há duas principais metodologias, SYBR®Green e o sistema TaqMan®, a primeira utiliza um corante que se liga a qualquer DNA dupla fita na reação, emitindo fluorescência durante a etapa de polimerização do DNA (NIESTERS, 2001). Como o corante intercala a qualquer fita dupla produzida durante a reação, incluindo dímeros dos iniciadores e outros produtos inespecíficos, pode-se superestimar a concentração do fragmento alvo (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A reação pelo sistema TaqMan® ocorre pela hibridização de uma sonda interna à sequência alvo que será amplificada, a sonda deve ser marcada por dois corantes fluorescentes, um deles emite fluorescência (*reporter*) e o outro que captura a fluorescência (*quencher*). Quando a sonda está intacta, a fluorescência emitida pelo repórter é absorvida pelo *quencher*, porém, durante a fase de extensão da DNA polimerase, a sonda é clivada e a fluorescência não é mais absorvida e sim capturada pelo aparelho (HEID *et al.*, 1996).

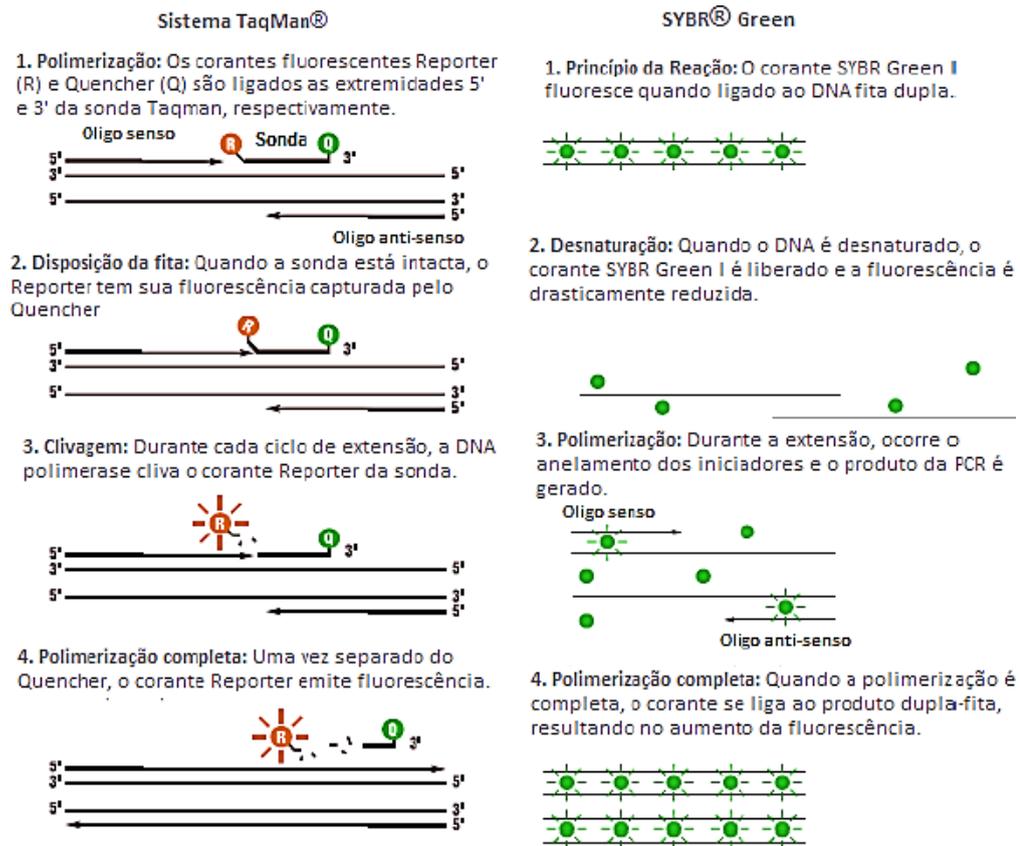


Figura 4. Comparação entre os sistemas TaqMan e SYBRGreen extraído e adaptado de <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/realtime-pcr/taqman-and-sybr-green-chemistries.html>

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Detecção por técnicas moleculares dos Dengue virus (DENV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e análise da evolução clínica dos casos confirmados de CHIKV, na cidade de Parnaíba –PI.

3.2. Objetivo Específico

- Realizar detecção de DENV e CHIKV em amostras clínicas de soro, por RT-PCR;
- Identificar a ocorrência de possíveis co-infecções entre os arbovírus pesquisados;
- Padronizar reações de RT-PCR quantitativo (qPCR);
- Investigar evolução clínica de pacientes positivos para CHIKV.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos e legais

A pesquisa foi executada mediante aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, respeitando a Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, que trata dessas diretrizes.

4.2 Coleta e Obtenção dos dados clínicos laboratoriais dos pacientes positivos para CHIKV

As amostras foram coletadas de pacientes voluntários com sintomatologia sugestiva para a infecção por arbovírus que procuraram os serviços do Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA), Pronto Socorro Municipal da cidade de Parnaíba/PI ou no Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMIC) localizado no campus Ministro Reis Velloso da Universidade Federal do Piauí. Os pacientes foram devidamente informados quanto ao objetivo da pesquisa, e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). As amostras então foram processadas para retirada do soro e armazenadas a temperatura - 80°C.

As informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes atendidos em Parnaíba foram obtidas por meio de aplicação de questionário semiestruturado (Anexo I) diretamente com o paciente, após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

4.3 Testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e/ou IgG para DENV

Para triagem inicial dos casos clínicos com suspeita de dengue, as amostras coletadas no PSM, foram direcionadas ao LACEN-PI para realização de testes sorológicos a partir de duas metodologias (testes rápidos imuncromatográficos e/ou ELISA) para identificação de anticorpos IgM/IgG anti-DENV. Os resultados disponíveis foram obtidos através de acesso *online* ao sistema de Gerenciamento de Ambiente Laboratorial – GAL.

4.4 Diagnóstico Molecular

4.4.1 Seleção de amostras

As amostras que foram encaminhadas para testes moleculares de detecção viral foram selecionadas a partir de critérios pré-definidos, a exemplo: período de sintomatologia, sintomas sugestivos para CHIKV ou DENV a

dependem do vírus pesquisado, outro critério relevante foi a disponibilidade suficiente de soro para detecção.

4.4.2. Extração de RNA e Transcrição Reversa (RT)

As amostras de soro foram submetidas a extração de RNA viral utilizando o kit QIAmp RNA MiniKit (QIAGEN®, Alemanha), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. O produto da extração foi submetido a etapa de Transcriptase Reversa (RT), a fim de obter o DNA complementar (cDNA), inicialmente foram utilizados: 10 µl de RNA molde e 5 µl de Radom Hexamers (50 µM) levados a incubação no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) à 25°C por 10 min e 70°C por 5 min, em seguida as amostras foram armazenadas no gelo por 2 minutos com intuito de evitar a formação de dímeros. Na segunda etapa, foram adicionados 5 µl de tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl), sendo novamente incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

4.4.3. RT-PCR convencional

4.4.3.1 Construção de iniciadores e padronização de reação para amplificação das regiões NSP2 e E2-6K do genoma de CHIKV.

A fim de realizar a detecção de ácidos nucleicos de CHIKV em amostras sugestivas para a infecção foram padronizadas duas reações de RT-PCR, cujo resultado possibilitou a amplificação de regiões distintas desse vírus. A padronização foi iniciada após a construção de dois pares de iniciadores, desenvolvidos a partir de regiões com o maior nível de conservação no genoma do CHIKV, a análise de mutações foi realizada através do software *Jawviel* pela comparação de sequências do genoma e a sequência de referência (*RefSeq*), disponíveis no *GenBank* (NCBI). Após a verificação das mutações foram feitas marcações na sequência de referência a fim de submeter a avaliação do programa online Primer3 que sugere pares de iniciadores de acordo com parâmetros previamente estabelecidos, como tamanho dos iniciadores, do fragmento amplificado, temperatura de anelamento, entre outros. Uma vez desenhados, os iniciadores foram avaliados quanto a sua especificidade molecular empregando-se a ferramenta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool).

Para a amplificação das regiões foi adaptado o protocolo de reagentes proposto por Bronzoni e colaboradores (2005), após a mistura dos reagentes e distribuição nas amostras a reação foi levada ao termociclador *Thermal Cyclers* (*Amplitherm®*), onde foi submetida a variações de temperaturas apresentadas por Kumar e colaboradores (2008), o qual foi modificado para que se adequasse a temperatura de anelamento (T_a) de cada par de primer, o ciclo está demonstrado na **tabela 1**. A seguinte relação de reagentes foi utilizada para um volume final de 25 μ l: 17 μ l de água estéril, 2,5 μ l de tampão (10x), 1,2 μ l de $MgCl_2$ (50mM), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 0,3 μ l de cada iniciador (10 pmol/ μ l), Taq DNA polimerase (5 U/ μ l) 0,2 μ l e 3,0 μ l de cDNA.

Tabela 1. Ciclo de temperatura adaptado de Kumar e colaboradores (2008).

Ciclo de temperaturas apresentado por Kumar et al (2008)	
Etapas	Temperatura / tempo
Desnaturação inicial	94°C/ 5 minutos
35 ciclos de amplificação	94°C/ 45 segundos; T_a ideal/ 30 segundos; 72°C/ 1 minutos
Extensão final	72°C/ 30 minutos

A seleção das temperaturas de anelamento foi realizada através de testes utilizando controles positivos de CHIKV diluídos na proporção de 1:50 e 1:100, com o objetivo de avaliar o limite de detecção. A reação seguiu para termociclador com gradiente Veriti 96-well termal cycler (*Applied Biosystems®*), onde foi submetida a temperaturas de anelamento variantes para verificar qual delas resultava na melhor amplificação, o intervalo de T_a testadas foi definida com base na média da temperatura de melting (T_m) dos dois iniciadores do par. A T_m foi definida de acordo com os valores obtidos dos iniciadores quando submetidos ao programa *OligoAnalyzer*.

4.4.3.2. Dengue vírus (DENV)

Para tipagem de DENV (1-4) foram utilizados iniciadores desenvolvidos por Bronzoni e colaboradores (2005). Estes iniciadores são capazes de detectar a região do gene que codifica a glicoproteína *NS5* e ocorre em duas etapas de amplificação. Na primeira, os iniciadores FGI e FG2 foram utilizados para detecção de *Flavivirus*, resultando em um produto de 958 pb. Na segunda etapa,

foram utilizados iniciadores específicos para DENV 1-4, gerando produtos de diferentes tamanhos.

Para um volume final de 25 µl foram adicionados: 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl₂ (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de FG1 (10 pmol/ µL), 0,3µl de FG2 (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H₂O estéril e 3µl de cDNA para cada amostra. Posteriormente, foram incubados no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) e submetidos às seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 56°C por 45 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. Foram utilizados 2,5ul do produto da primeira etapa em cada um dos microtubos distintos na segunda reação de amplificação, utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira.

4.4.3.3 Visualização dos produtos amplificados

Todos os produtos da amplificação foram visualizados através de corrida em eletroforese, utilizando gel de agarose na concentração de 1,5%, onde foram adicionados um marcador de peso molecular (*Ladder*) para identificação do tamanho do fragmento amplificado e adição de corante intercalante fluorescente *GelRed*® para subsequente visualização através do transiluminador de luz ultravioleta.

4.4.4. RT-PCR em tempo real

4.4.4.1. Chikungunya virus

A fim de implantar a PCR quantitativa no laboratório BIOMIC uma reação para detecção de CHIKV foi padronizada, a metodologia selecionada tem como princípio a captação da fluorescência emitida pela sonda Taqman® (Thermo Fisher) específica para uma região alvo do vírus. A técnica inclui um duplo quencher (FAM/Zen/Iowa Black), nesta metodologia foram utilizadas sondas com a presença de um fluorocromo (FAM) à extremidade 5' e quenchers de dupla ativação que foram adicionados à extremidade 3' da sequência (ZEN), como também adição de um quencher interno (Iowa Black) visando o aumento da sensibilidade.

Os iniciadores e a sonda foram selecionados a partir de busca na literatura sendo eles propostos por Liu e colaboradores (2017) e visa à amplificação da região de nsP1 do genoma de CHIKV, e especificados na **tabela 3**.

Tabela 2. Sequência de iniciadores e de sonda selecionados para amplificação da região nsP1 do genoma de CHIKV em qPCR.

Iniciador e sonda	Sequência	Produto	Tm de anelamento
F2	ACGTGGATATAGACGCTGACAG		59.8 °C
R2	GCATGGTCATTTGATGTGACC	100	59.1 °C
Probe 2	FAM-CGTGCGTACCCCATGTTTGAGG-BHQ1		65.0 °C

Com o objetivo de definir a melhor concentração dos iniciadores quatro testes com concentrações variantes entre 350nM a 500nM foram feitos, a relação de reagentes e concentrações dos testes está especificada na **tabela 4**. As amostras de controle positivo para o vírus Chikungunya foram submetidas a diluição seriada a partir de 10^2 até 10^5 e a concentração da sonda Taqman foi fixada em 250nM.

Tabela 3. Descrição dos testes realizados para otimização de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

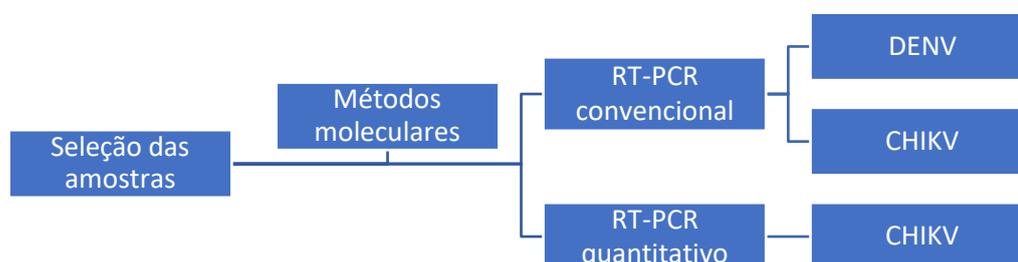
Reagentes	TESTE 1	TESTE 2	TESTE 3	TESTE 4	CONCENTRAÇÃO
Master Mix	5	5	5	5	-
CHIKV - Forward	0,5	0,45	0,4	0,35	500-350nM
CHIKV – Reverse	0,5	0,45	0,4	0,35	500-350nM
Sonda Taqman	0,5	0,5	0,5	0,5	250 nM
H₂O	1,0	1,1	1,2	1,3	
RNA/cDNA	2,5	2,5	2,5	2,5	$10^2 - 10^5 \mu\text{l/mL}$
Volume final	10	10	10	10	

A RT-qPCR foi realizada utilizando os reagentes do Kit FAM/Zen/lowa Black (IDT Technologies) com adição das sondas fluorescentes de hidrólise específicas para cada vírus, e o master mix GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, Custom (Promega). Após preparação do mix de reagentes o mesmo foi distribuído em placa MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems), em seguida as amostras foram levadas ao termociclador com sistema óptico ou câmera CCd (Charge Coupled Device) para excitação da fluorescência e captação da emissão 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem), que realizada a ciclagem e em conjunto com computador que contém software disponível que realiza a leitura da amplificação durante a ciclagem das amostras, bem como armazenamento dos dados. As temperaturas e ciclagens utilizadas foram preconizadas pela Promega® **tabela 4**.

Tabela 4. Descrição de ciclagem e temperatura utilizadas na qPCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação	40	95°C	3 segundos
Anelamento e extensão		60°C	30 segundos

Dessa forma, o delineamento para realização dos testes moleculares durante o projeto seguiu fluxo apresentado na figura 5. Em seguida, os pacientes com detecção positiva para CHIKV foram selecionados para acompanhamento clínico.

**Figura 5.** Delineamento dos testes moleculares realizados durante o projeto.

4.5 Acompanhamento clínico

O acompanhamento foi realizado através de telefonemas para aqueles pacientes que obtiveram resultados positivos por RT-PCR ou sorologia IgM realizada pelo LACEN-PI, o contato aconteceu em períodos estratégicos que fizessem referência a fase subaguda e crônica da doença, sendo esses com 90 dias após o início dos sintomas e 180 dias, respectivamente. O contato foi retomado após 180 dias com a finalidade de avaliar a tendência de manifestações clínicas e cronicidade.

Um questionário semiestruturado proposto por BARROS, 2018 e SILVA, 2019 (Anexo III) foi utilizado para reunir informações sobre persistência dos sintomas, presença de comorbidades, principais membros/articulações acometidas, terapêutica utilizadas e registro de manifestações atípicas. Nos casos de indivíduos com idade inferior a 15 anos, os pais ou responsáveis legais encarregaram-se de responder.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A urbanização, globalização e aquecimento global aumentaram a expansão e distribuição das arboviroses para diversas regiões geográficas fora de sua origem, que seriam áreas tropicais e subtropicais. Estima-se que três milhões de pessoas estão vivendo em regiões de risco de contaminação por arbovírus (WILDER-SMITH *et al.*, 2017; GLUBER, 2011; DUCHEYNE *et al.*, 2018).

No período entre os anos de 2017 ao primeiro semestre de 2019 foram coletadas um total de 363 amostras, tendo a seguinte distribuição: 347 de 2017, 6 de 2018 e 10 em 2019, tais amostras foram coletadas mediante sintomatologia sugestiva para arbovírus, a exemplo de mialgia, artralgia, febre, exantema. Tal declínio foi observado em diversos países da América Latina, este pode estar relacionado a múltiplos fatores, dentre eles: Imunidade de rebanho para hospedeiros humanos e demais hospedeiros, a exemplo das aves e primatas não humanos, podendo ser adquirida através de imunidade cruzada entre diferentes arbovírus em circulação, entre outras causas estão uma possível super notificação nos anos anteriores, principalmente nos casos de dengue, pela introdução de novos arbovírus e as reações cruzadas em testes sorológicos, e ainda uma possível redução na densidade dos vetores, ocasionada pelo aumento nas intervenções de controle dos mesmos (AULT *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2020; PEREZ *et al.*, 2019).

Após avaliação de alguns critérios (sintomatologia, duração dos sintomas, e disponibilidade de material), algumas das amostras coletadas foram selecionadas para extração de RNA e posteriores testes de RT-PCR para detecção de possíveis infecções. Dessa forma, um total de 55 amostras sendo: 46 de 2017, 4 de 2018 e 5 de 2019 foram encaminhadas para a extração de RNA viral e posterior testes utilizando os iniciadores desenhados para as regiões NSP2 e E2-6K de CHIKV.

Os iniciadores são reagentes básicos para as reações em cadeia de polimerase. Possuem como principal finalidade permitir ligação da Taq polimerase a fita molde que deverá ser amplificada, cada par anela-se especificamente a uma região alvo do genoma escolhido (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Visto isso, o desenho de iniciadores é uma etapa chave para a

reação de PCR, o desenvolvimento de reações que amplifiquem diferentes regiões do genoma nos permite ter uma maior variedade de sequências, abrangendo melhor as inúmeras mutações que podem ocorrer no genoma de RNA e, por conseguinte, facilita a caracterização filogenética. A fim de investigar novas regiões, diferentes daquelas utilizadas anteriormente no laboratório BIOMIC para detecção de CHIKV, foram desenhados dois pares de iniciadores por SILVA, 2018.

O primeiro iniciador amplifica uma região comum aos genes estruturais E2 e 6K, gerando um fragmento de 618 pares de base (bp), o segundo tem como alvo o gene não estrutural NSP2, com um fragmento de 491pb (**tabela 5**). Ao serem analisados pelo programa *Oligo Analyzer*, apresentaram parâmetros adequados, segundo a literatura correspondente: Ambos os pares se mantiveram entre 20 a 21 pares de bases, o que favorece a especificidade dos mesmos; a porcentagem de GC permaneceu entre 40 e 60%, tais valores favorecem a permanência da Tm entre 56 – 62°C elevando a eficiência da reação. Os intervalos entre as temperaturas não ultrapassaram 5°C o que facilita a escolha da média para a etapa de anelamento (DIEFFENBANCH, 2018).

Ao serem submetidos a avaliação de especificidade molecular no algoritmo *BLAST*® os iniciadores mostraram-se específicos para as regiões alvos, com 100% de homologia e não foi apresentado nenhuma complementariedade ao genoma humano, tal resultado otimiza a obtenção de um produto de PCR satisfatório e específico (KUBISTA *et al.*, 2006). Ademais o e-value apresentado pelo algoritmo apresentou-se entre 0,13 e 0,42, o que confirma o alto grau de similaridade entre as sequências dos iniciadores e as presentes no banco de dados, de acordo com a literatura quanto mais próximo de zero for o e-value, maior chance de evidenciar uma similaridade real entre as sequências (Ye e cols, 2012).

Tabela 5. Sequências dos iniciadores desenhados para amplificação das regiões E2 – 6K e NSP2 do genoma do arbovírus Chikunguya, e tamanho dos fragmentos.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Produto	Tm de anelamento
E2-6K-F	GAGCTACCGTCCCTTTTCCTG	618 pb	57 °C
E2-6K-R	GCGGTATGAGCCCTGTATGC		
NSP2-F	GAGAGGACAGAACACGAGTAC	491 pb	54°C
NSP2-R	CATATTGAAGAAGCCGCACTG		

Para validação dos iniciadores frente ao seu desempenho durante a reação de PCR foram realizados testes de padronização. Os testes têm como finalidade a seleção dos melhores parâmetros para as reações moleculares, a fim de obter um produto satisfatório.

Os testes de padronização das reações moleculares com iniciadores selecionados seguiram para amplificação no termociclador com gradiente *Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems®)*, as temperaturas testadas variaram entre 52°C e 55°C para o par NSP2-F e NSP2-R e entre 55°C e 57°C para E2-6K-F e E2-6K-R. As temperaturas de anelamento mantiveram-se entre 40°C e 60°C, pois temperaturas abaixo diminuem a especificidade e a eficiência da reação, o que pode favorecer o surgimento de bandas inespecíficas, como indicado por Chen (2003).

Durante os testes de padronização buscamos otimizar a reação afim de evitar problemas de execução como: aparecimento de fragmentos com tamanhos inespecíficos, ausência de bandas na visualização do gel, contaminações e dimerização de primers (VIEIRA, 2002). Ao visualizar os géis, figura 4 e 5, podemos concluir que a utilização da metodologia: protocolo descrito por Bronzoni et al (2005) e ciclos de temperaturas modificado a partir de Kumar et al (2008), e T_a ideal de 55°C para ambos os pares de iniciadores, nos permitiu uma observação mais adequada dos resultados da RT-PCR demonstrando que a execução da técnica foi realizada de maneira satisfatória.

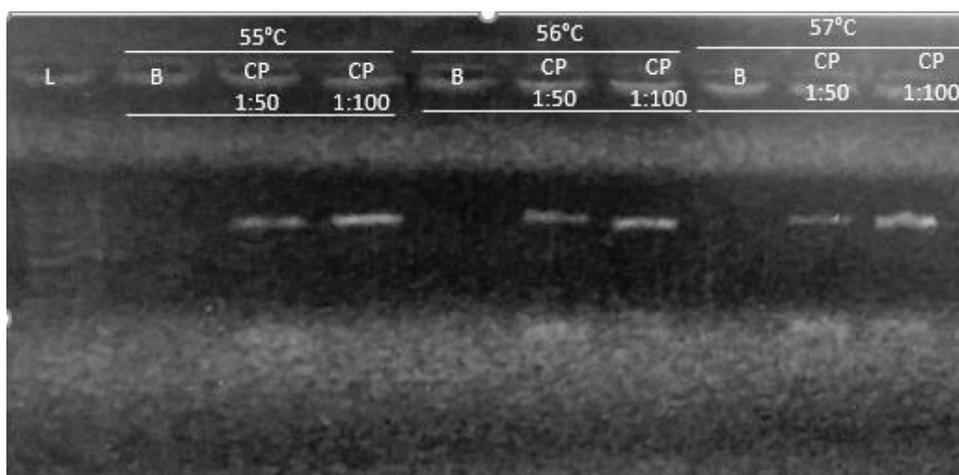


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de CHIKV (1:50 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados para região dos genes E2 e 6K em diferentes condições de T_a (55°C, 56°C e 57°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos.

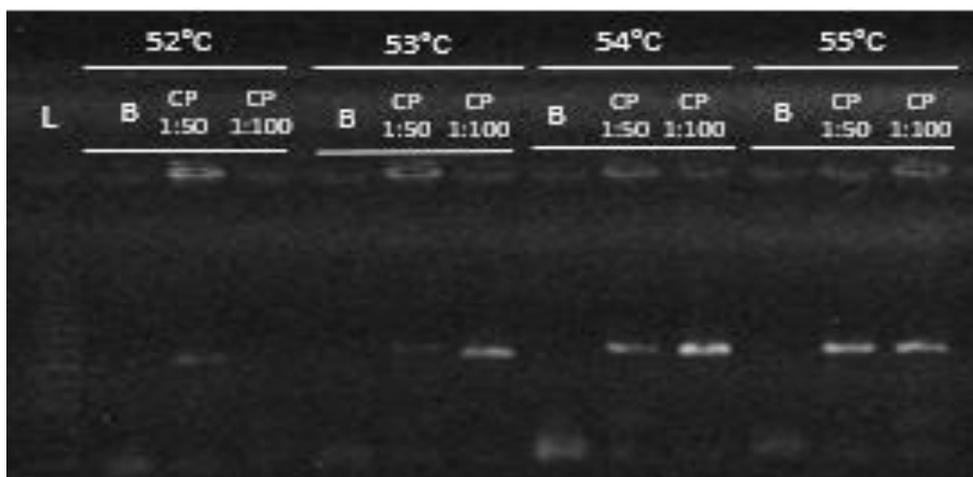


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com controles positivos de CHIKV (1:50 e 1:100) utilizando iniciadores desenhados para o gene NSP2 em diferentes condições de Ta (52°C, 53°C, 54°C e 55°C). L: marcador de peso molecular; B: branco e CP: controles positivos

Todas as amostras foram testadas para o par de primers homólogos a região E2-6K, dessas apenas as 180-17, 217-17, 218-17, 244-17 obtiveram resultados positivos. Um total de 11 amostras foram testadas para o par de iniciadores para a região NSP2 todas com ausência de amplificação de RNA viral.

Não foi possível testar ambos protocolos em todas as amostras principalmente por indisponibilidade de material, visto que algumas dessas haviam sido testadas para protocolos anteriores como o de Porter et al (2004) e Kumar et al (2008), os quais possibilitam a amplificação dos genes E2 e E1 de CHIKV, respectivamente. A escolha do iniciador E2-6K para o teste da maioria das amostras foi feita a partir da observação do tamanho do fragmento obtido ao final da reação, um produto de amplificação com maior quantidade de pares de bases permite uma possível genotipagem de amostras positivas, como analisado pelo nosso laboratório (CARDOSO *et al.*, 2019), levando ao conhecimento e confirmação do genótipo circulante do vírus estudado. Além disso, possibilitam a identificação de mutações que podem acarretar alterações significativas no comportamento viral, como ocorrido em 2016 com a mutação A266V no gene E1 (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Ao testar amostras já utilizadas em protocolos anteriores, Porter et al (2004) e Kumar et al (2008), foi possível comparar os protocolos propostos, com aqueles em uso. Permitindo aferir que a metodologia implantada que amplifica

da região E2- 6K e aquelas já desenvolvidas obtiveram resultados semelhantes, confirmando a eficácia da metodologia.

Tabela 6. Amostras testadas para os genes E2-6K e NSP2, especificadas por número de protocolo, dias de sintomas e manifestações clínicas. +: positivo; -: negativo.

Amostra	Dias de sintomas	Manifestações clínicas	E2-6K	NSP2
05-17	7	Febre, artralgia intensa, náuseas, vômito, dor abdominal, edema nos pés, dor nos ombros e joelhos e falta de apetite	-	-
88-17	5	Febre, cefaleia, artralgia intensa, náuseas, mialgia, prostração, vômito, dor abdominal	-	-
89-17	7	Febre, cefaleia, artralgia intensa, náuseas, mialgia, dor retroorbitária, prostração, exantema com prurido, falta de apetite	-	-
121-17	2	Febre, cefaleia, artralgia, mialgia, prostração, vômitos, exantema com prurido, edema articular	-	NT*
125-17	5	Cefaleia intensa, artralgia intensa, dor retroorbital, mialgia, prostração, exantema com prurido, falta de apetite, edema nos pés, dor nas costas	-	-
127-17	7	Cefaleia, artralgia intensa, mialgia, diarreia, exantema com prurido, olhos vermelhos	-	-
166-17	7	Febre, cefaleia, artralgia (pés), náuseas e exantema sem prurido	-	-
180-17	2	Febre, cefaleia, artralgia (ombros, tornozelos e mãos), náuseas, mialgia, dor nas costas, artrite	+	NT
188-17	3	Febre alta, cefaleia, artralgia intensa, mialgia, prostração, edema (dedos das mãos e tornozelo), vermelhidão na pele	-	-

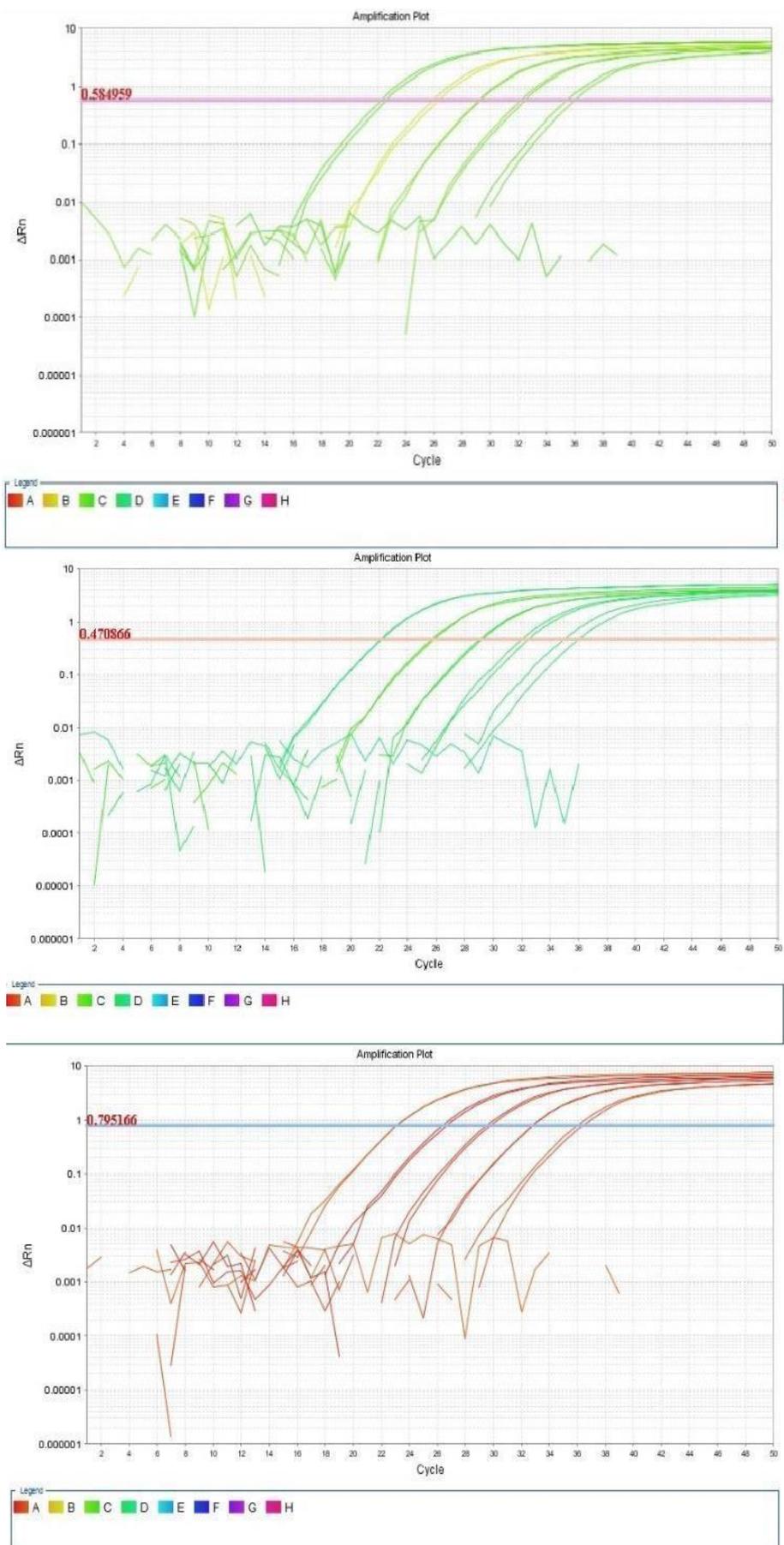
217-17	4	Febre, cefaleia, artralgia, náuseas, mialgia, prostração, exantema sem prurido, dor abdominal, edema articular, dificuldade em fechar as mãos, olhos lacrimenjantes, irritação ocular, falta de apetite, cansaço, dor nas costas.	+	NT
218-17	3	Febre alta, cefaleia intensa, artralgia, náuseas, mialgia, prostração, exantema com prurido, dor no corpo, edema (pés, pernas e mãos)	+	NT
244-17	5	Artralgia intensa, cefaleia, dor nas costas, febre alta, exantema em MMII, náuseas, mialgia e dor retroorbital	+	NT
250-17	8	Febre, mialgia, cefaleia, exantema, náuseas, dor nas costas, artralgia intensa, petéquias, leucopenia, dor retroorbital	-	-
254-17	5	Cefaleia, náuseas, exantema, edema nos pés	-	NT
293-27	8	Cefaleia, artralgia, náuseas, dor retroorbital, mialgia, prostração, dor abdominal	-	NT
312-17	5	Febre, cefaleia, mialgia, náuseas, artralgia intensa	-	NT
334-17	4	Febre, cefaleia intensa, artralgia, náuseas, mialgia, prostração	-	NT
03-18	6	Febre, cefaleia, artrite, mialgia, dor retroorbital, dor nas costas	-	-
04-18	8	Febre, dor nas costas, dor retroorbital, artralgia, náuseas, cefaleia	-	-
05-18	4	Febre, artralgia, mialgia, dor retroorbital, prostração, falta de apetite, vômito	-	-
06-18	5	Febre, artralgia (tornozelo, joelhos), cefaleia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, dor abdominal, prostração	-	-

*NT : Não testadas para a respectiva região

Para detecção do *Dengue virus* em amostras sugestivas foram selecionadas um total de 24 amostras, de acordo com os critérios: período de sintomas, sintomatologia e quantidade de material, sendo cinco do ano de 2019, quatro do ano de 2018 e quinze do ano de 2017, não houve detecção para este arbovírus para as amostras analisadas.

A otimização da reação de RT-qPCR foi feita através da realização de 4 testes com concentrações de iniciadores distintas. Para os testes foram utilizadas amostras com concentrações conhecidas de cDNA, sendo estas diluídas em escalas de 10X e adicionadas em duplicata. Alguns parâmetros foram avaliados a fim de decidir qual a melhor concentração de iniciadores para a reação proposta, entre eles: *slope*, R^2 ou coeficiente de determinação, Eficiência e *Y-interceptor*.

A curva de amplificação apresenta o número de Ct, representado por uma linha de intersecção presente nos gráficos (Figuras 8a, 8b, 8c e 8d), esta é uma medida relativa da concentração do alvo em cada amostra. É possível observar que à intersecção em 5 pontos do gráfico, o que faz jus a presença de amostras em concentrações variadas feitas pela diluição seriada. Os pontos de contato entre as linhas ocorrem de forma concordante em cada um dos testes ocorrendo de maneira decrescente (maior diluição para menor) da esquerda para direita, evidenciando a sensibilidade de ambas as concentrações de iniciadores. Além disso o gráfico demonstra a amplificação de todas as duplicatas permitindo inferir acerca da reprodutibilidade do teste.



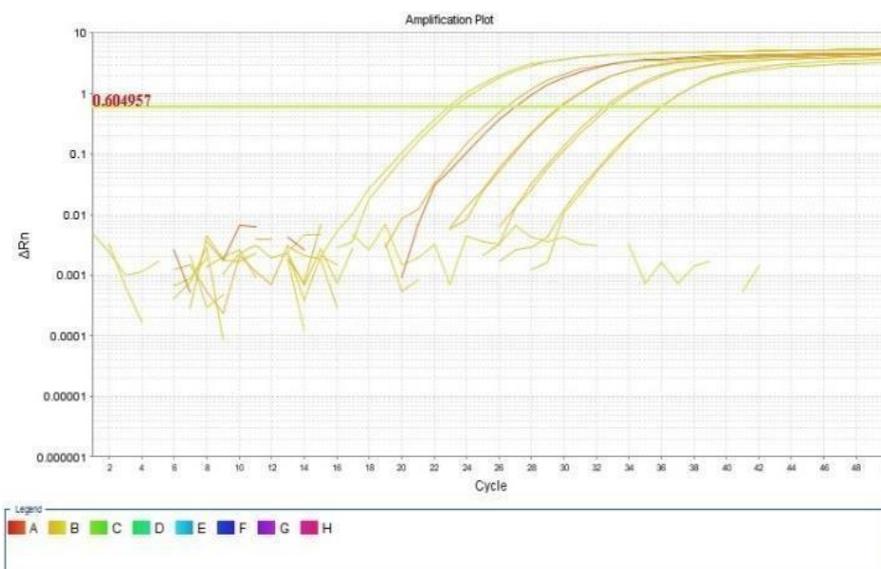
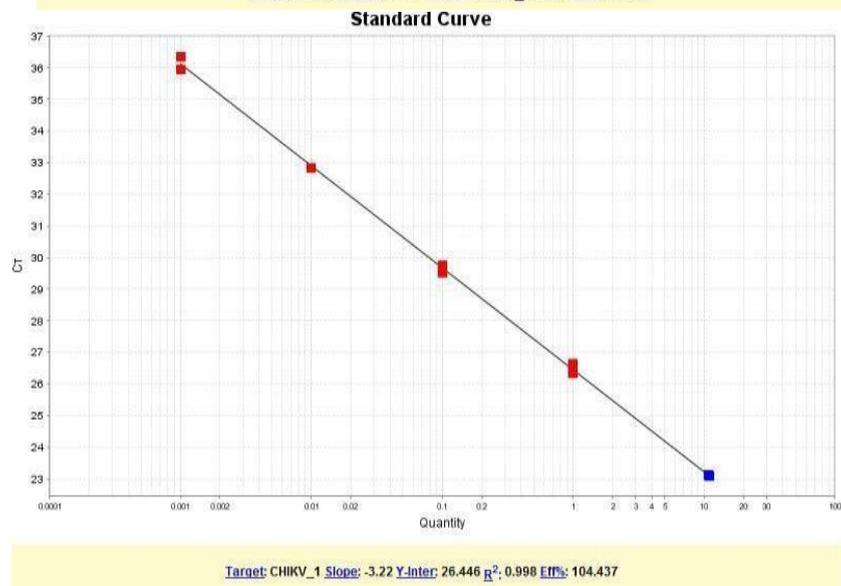
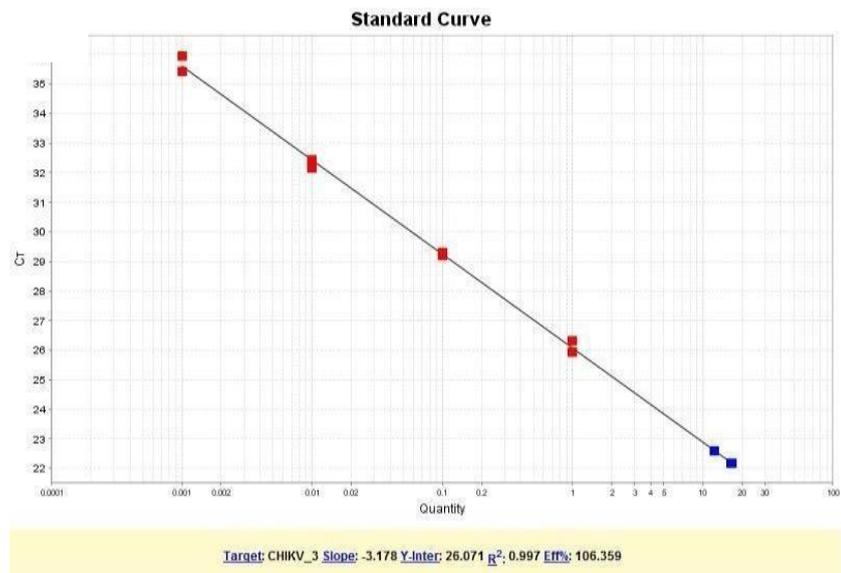
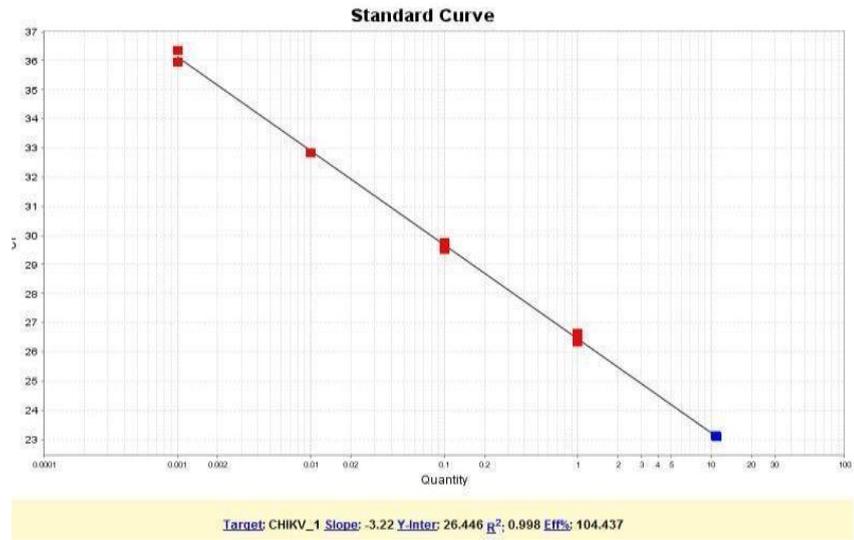


Figura 8(a,b,c,d). a. Curva de amplificação do Teste 1 com concentração de iniciadores a 500 nM; b. Curva de amplificação do Teste 2 com concentração de iniciadores a 450 nM; c. Curva de amplificação do Teste 3 com concentração de iniciadores a 400 nM; d. Curva de amplificação do Teste 4 com concentração de iniciadores a 350 nM.

Uma curva padrão foi emitida por cada teste (Figura 9a, 9b, 9c, 9d), essas foram feitas em cinco pontos através da diluição seriada (10X) das amostras de cDNA. As curvas mostraram uma eficiência de 104,437; 104,437; 106,359; 104,382, respectivamente. Reações com eficiência variando entre 90 a 110% são consideradas precisas para a realização da quantificação relativa do genoma viral presente nas amostras, eficiências próximas a 100% confirmam a premissa de que a quantidade de produto dobra a cada ciclo (BUSTIN *et al.*, 2009).



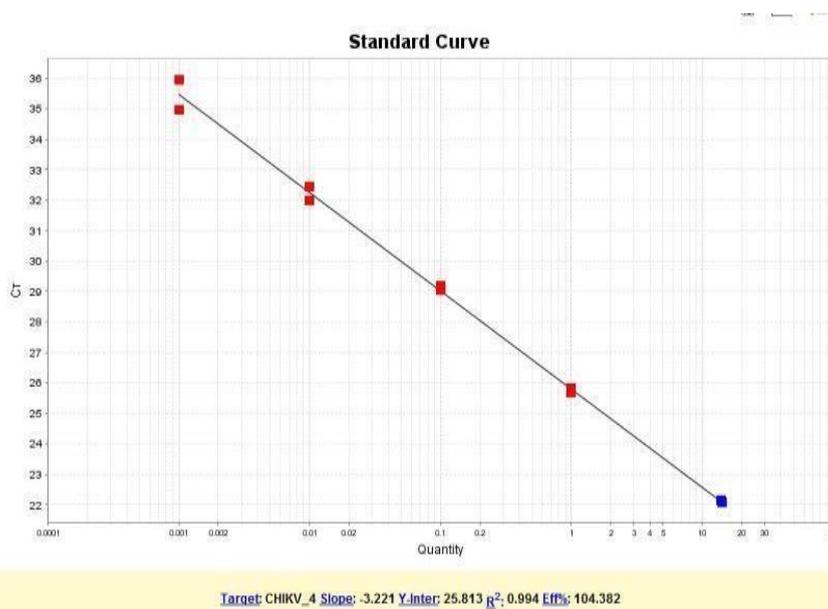


Figura 9.a. Representação gráfica da curva padrão do teste 1 com concentração de iniciadores a 500 nM; b. Representação gráfica da curva padrão do teste 2 com concentração de iniciadores a 450 nM; c. Representação gráfica da curva padrão do teste 3 com concentração de iniciadores a 400 nM; d. Representação gráfica da curva padrão do teste 4 com concentração de iniciadores a 350 nM.

Outros parâmetros disponibilizados pela curva padrão, e que são importantes na reação de tempo real, são: *slope*, os valores ideais para esse variam entre -3,8 a -3,1 e permitem inferir acerca da eficiência da reação; o R², ou coeficiente de determinação, que deve encontrar-se o mais próximo possível de 1 e é usado para avaliar o ajuste da curva padrão aos pontos dos dados representados no gráfico; o *Y-Interceptor*, que representa o número de ciclos necessários para a quantificação de 1 única cópia de DNA, os valores esperados giram em torno de 40 representando boa sensibilidade do teste.(DORAK, 2012). Os valores obtidos para esses parâmetros nos diferentes testes estão descritos na **tabela 7**.

Tabela 7. Valores dos parâmetros avaliados nos testes de padronização da reação de q PCR.

Parâmetros	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste4
Slope	-3.22	-3.22	-3.178	-3.221
R²	0.998	0.998	0.997	0.994
Y- Interceptor	26.446	26.446	26.071	25.813

Após avaliação desses critérios foi possível elucidar a sensibilidade e eficiência para a reação proposta, todos os testes demonstraram boa eficiência e sensibilidade. Dessa forma, a escolha foi realizada sobretudo pelo volume

utilizado de iniciadores, este foi menor para o teste 4 com concentração de 350nM de iniciadores e sondas.

O acompanhamento dos pacientes foi feito durante o período de agosto de 2017 e agosto de 2018, um total de 184 pacientes tiveram resultados positivos para CHIKV, sendo 17 por detecção molecular e 140 por sorologia. Desses 88 responderam o questionário semiestruturado de cronicidade e permitiram acompanhamento clínico. Desses, 68 pacientes apresentaram queixas relacionadas a artralgia persistente durante as fases subaguda, até 90 dias, e crônica, após 90 dias, esses dados corroboram com os achados brasileiros (DIAS *et al.*, 2018).

O perfil epidemiológico dos pacientes foi traçado, referindo prevalência do sexo feminino (79,4%), o que corrobora com estudo já desenvolvidos (KÖHLER *et al.*, 2018; MÉNDEZ *et al.*, 2017). A idade média encontrada foi de 46 anos, variando em 33,3 e 57,6 anos, a persistência dos sintomas em indivíduos com idades acima de 40 anos é mais comum, informação essa já confirmada por diversos estudos anteriores (MARQUES *et al.*, 2016; DUVIGNAUD *et al.*, 2018; FRED *et al.*, 2018). Grande parte dos surtos de Chikungunya são marcados pelas mesmas características epidemiológicas (PAUL *et al.*, 2020; SITEPU *et al.*, 2020; GELETA *et al.*, 2020). Um recente estudo realizado por MORAES e cols, 2020, delimitou cinco características que representam bons preditores para a cronificação, dentre eles, sexo feminino, hipertensão, edema e idade, tais características também se fizeram presentes em nosso trabalho.

No que concerne ao sexo feminino ainda não há explicação acerca de sua maior susceptibilidade no desenvolvimento de artrite crônica ocasionada pela infecção de CHIKV. Sabe-se, no entanto, que o nível de resposta humoral durante a infecção é mais elevada no gênero feminino, esta diferença pode ser promovida pela mudança natural induzida pelo estrogênio em direção ao perfil de citocinas Th2 promovendo produção de anticorpos e ao efeito inibitório da diidrosterona (DHS) em mulheres, além da maior produção de IL-10 imunossupressora, que se correlaciona positivamente com DHS (GERARDIN *et al.*, 2013).

Em relação as manifestações clínicas recorrentes foram observadas a presença de edema nas articulações (64,7%), corroborando com a literatura, que descreve o edema presente entre 20-65% dos pacientes, sendo esse um

sintoma que pode ser considerado preditor de uma doença crônica, e com risco aumentado para incapacidade dos pacientes (RAHIM *et al.*, 2015; YASSEN *et al.*, 2014). Outras manifestações foram: queixa de rigidez matinal (54,4%) e dormência em membros distais (44,4%), apresentados em achados de outros autores (HUIITS *et al.*, 2018). 26,5% dos casos relataram ainda déficit de concentração, dados acerca do comprometimento físico e emocional são observados em estudos já desenvolvidos (ABELLA *et al.*, 2020; CHIRATHAWORN *et al.*, 2013)

A febre Chikungunya causa perdas econômicas significativas principalmente por seus sintomas incapacitarem os indivíduos de exercerem suas atividades cotidianas e com frequência solicitarem afastamento do trabalho (SILVA; DERMODY, 2017; JAVALLE *et al.*, 2015), tais dados foram confirmados pelo presente estudo no qual 66,2% dos pacientes afirmaram que a dor impossibilitou a realização das atividades de vida cotidiana e 51,5% solicitaram afastamento do trabalho. Como confirmado a dor incapacitante nos casos leva a redução na qualidade de vida, astenia, depressão e ansiedade. Assim é importante monitorar a condição médica do paciente durante esta fase, visando além da recuperação física, o tratamento de sintomas emocionais (COULTRIER *et al.*, 2012; YASEEN *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2019)

A utilização de medicações para combater as dores também foi bastante comum entre os indivíduos que compuseram o N amostral (91,2%), o uso prolongado de medicamentos pode acarretar a outras complicações, foram relatados insuficiência renal e complicações gástricas relacionadas ao uso de medicamentos para tratar dor, bem como a depressão (ELSINGA *et al.*, 2017; MORAES *et al.*, 2020)

Tabela 8. Características epidemiológicas dos pacientes com infecções crônicas por Chikungunya N=68.

GÊNERO	N	(%)
Masculino	14	20,6
Feminino	54	79,4
IDADE (MÉDIA [IQR])	46,0	[33,3-57,6]
<18 anos	03	4,5
18-40 anos	26	38,0
41-60 anos	26	38,2
>60 anos	13	19,3
SINTOMAS	N	(%)

Edema nas articulações	44	64,7
Dormência	30	44,1
Manifestações cutâneas	10	14,7
Mialgia	16	23,5
Rigidez matinal	37	54,4
Déficit de concentração	18	26,5
Depressão	6	8,8
HISTÓRIA CLÍNICA	N	(%)
HAS*	13	19,1
Diabetes	05	7,4
Doenças Reumáticas Prévias	17	25,0
Doenças Autoimune	04	5,9
Obesidade	06	8,8
Outras comorbidades	35	51,5
ABSENTEÍSMO	N	(%)
Limitações nas AVD**	45	66,2
Afastamento do trabalhos	35	51,5
Tratamento Medicamentoso	62	91,2

*HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica; **AVD – Atividades de vida diária

As principais características dos sintomas articulares presentes em fase crônica estão descritas na **tabela 9**, acometimento simétrico de múltiplas articulações (72,4%), sendo os membros periféricos como joelhos, tornozelos e dedos dos pés em mesma proporção (72,1%), seguidos de mãos (69,1%), dedos das mãos (67,6%), os mais afetados pela artralgia persistentes. A artralgia ainda foi descrita como recorrente por 65,5% dos pacientes, tal sintoma encontra-se prevalente na maioria das infecções por CHIKV, permanecendo em aproximadamente 50% dos indivíduos acometidos (CHOPRA et al, 2008). O acometimento simétrico das articulações está em concordância com estudos realizados recentemente no nordeste brasileiro por SOARES-SCHANOSKI e colaboradores, 2019 e SILVA et al, 2019.

Tabela 9. Padrão de Acometimento Articular (n=68).

ARTICULAÇÕES AFETADAS	N	(%)
Mãos	47	69,1
Dedos das mãos	46	67,6
Punhos	37	54,4
Cotovelos	13	19,1
Ombros	15	22,1
Quadril	8	11,8

Joelhos	49	72,1
Tornozelos	49	72,1
Pés	49	72,1
Dedos dos pés	49	72,1

Vale ressaltar que dentre as amostras positivas que evoluíram para a fase crônica uma paciente apresentou acometimento neurológico associado a CHIKV. A amostra 217-17 foi acompanhada após apresentar fraqueza progressiva associada à perda de sensibilidade nos membros distais, além de processo de inflamação articular. A polineuropatia axonal periférica foi confirmada por meio de condução nervos. (SILVA et al., 2019)

6. CONCLUSÃO

De acordo com o referido estudo, pode-se concluir que:

- A circulação de arbovírus sofreu um declínio ao longo dos últimos dois anos, apresentando suspeitas esporádicas, porém sem confirmação;
- A padronização de reação de PCR convencional utilizando os novos iniciadores permitiu a detecção do genoma viral de CHIKV através da amplificação da sequência alvo dos genes nsP2 e E2-6K.
- A implantação da metodologia de RT-qPCR obteve êxito através de reação que permitiu amplificação a região alvo do gene nsP1 do genoma de CHIKV.
- As manifestações clínicas apresentadas por pacientes com confirmação de infecção por CHIKV corroboram com os achados da literatura, bem como a epidemiologia dos mesmos
- A definição de características epidemiológicas e clínicas que tenham ligação com a permanência dos sintomas de CHIKV para a fase crônica pode delinear um grupo de risco, possibilitando uma intervenção terapêutica que se proponha a reduzir tal risco.

REFERÊNCIAS

- ABELLA, J., et al. Clinical and immunological features of post-chikungunya virus chronic arthritis and its effect on functional ability and quality of life in a cohort of Colombian patients. **Revista Colombiana de Reumatologia**, v. 26, n. 4, p. 255-261, out-dez, 2019;
- AMDEKAR, S., PARASHAR, D., ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, 2017;
- ARAÚJO, A. Q. C. Why should neurologists start to be interested in Arboviruses? **Arq. Neuro- Psiquiatr**, v. 74, n. 11, Nov. 2016;
- AULT, S., *et al.* The Decline of Dengue in the Americas in 2017: Discussion of Multiple Hypotheses **Trop Med Int Health**, Jan. 2019;
- BAGNO, F.F., et al. Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of Dengue and Zika. **J Clin Virol**. V. 113, p. 27-30, feb. 2019;
- BARROS, E. L. T. **Caracterização molecular de Chikungunya virus e investigação dos arbovírus Dengue virus, e Mayaro virus no Estado do Piauí**. Março de 2018. Dissertação – Universidade Federal do Piauí;
- BELTRÁN-SILVA, S. L., et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, Chikungunya and Zika. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, n. 3, p. 146-53, jul-sep. 2018;
- BHATT, S., et al. The global distribution and burden of dengue, **Nature**, v. 496, p. 504-507, ap. 2013;
- BLANCHARD, J., et al. Seasonal dengue surge: Provides tm perceptions about the impacto f dengue on patient volume, staffing and use of point of care testing in Indian emergency departments. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 6, p. 794-98, dec. 2019;
- BLETTERY, M., et al. Management of acute-stage Chikungunya disease: Contribution of ultrasonographic joint examination. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 84, p. 1-4, 2019;
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. 5. ed. Brasília, 2016;
- BROEDERS, S., et al. A new multiplex RT-qPCR method for the simultaneous detection and discrimination of Zika and Chikungunya viroses. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 92, p. 160-170, 2020;
- BRONZONI, R. V. M., *et al.* Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PACR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, Feb. 2005;
- BORGHERINI., G., et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 11, jun. 2007;

- BURT, F.J., et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Lancet Infect Dis** 2017; v. 17, n. 4, p. 107–117, fev. 2017;
- BUSTIN, S. A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009;
- CARDOSO, F. D., et al. Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 61, 2019;
- CASTAÑEDA, J.R.; et al. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n.1, p. 1-24, jan, 2017.
- CAVALCANTI, L. P. G., et al. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 583-585, ago. 2017;
- CAVALCANTI, L. P. G., et al. Trinta anos de dengue no Ceará: história, contribuições para ciência e desafios no cenário atual com tripla circulação de arbovírus. **J. Health Biol Sci**, v. 6, n. 1, p. 65-82, 2018;
- CERNY, T., et al. The range of neurological complications in Chikungunya fever. **Neurocrit care**, v. 27, n. 3, p. 447-57, 2017;
- CHEN, S. H. Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3751–3754, mar. 2003;
- CHIRATHAWORN, C., et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 8, p. 631-4, aug. 2013;
- CHONG, H. Y., et al, Flavivirus infection – A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Research**. V. 274, dec. 2019.
- CHOPRA, M. D. A., et al. Chikungunya virus aches and pains: Na emerging challenge. **Rheumatism**, v. 58, n. 9, p. 2921- 22, doi. 10.1002/art.23753, aug. 2008;
- CLYDE, K.; HARRIS, E. RNA secondary structure in the coding region of Dengue virus type 2 directs translation start codon selection and is required for viral replication. *Journal of virology*, v. 80, n. 5, p. 2170-2182, mar. 2006;
- COFFEY L.L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**, v.8, n. 2, p. 155–176, 2013;
- COSTA, A. C., et al. Spread of Chikungunya virus East/Central/South African genotype in Northeast Brazil. **Emerg Infect Dis**. v. 23, p. 1742-4; 2017;
- COUTURIER, E., et al. Impaired quality of life after Chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, n. 7, p. 1315-22, mar. 16;
- CUNHA, R. V.; TRINTA., K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, aug. 2017;

- DIAS, J.P., et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus after its emergence in Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 24, n. 4, p. 617-24, 2018;
- DE BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 585-589, sep-oct. 2017;
- DENDASCK, C. V.; OLIVEIRA, E.; LOPES, G. F. Chikungunya: Aspectos Gerais do Arbovirus. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 2, p. 23-32, Mayo. 2016;
- DIEFFENBACH, C. W., et al. General Concepts for PCR primer design. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 2, p. 530-537, 1993;
- DIGHE, S. N., et al. Recent update on anti-dengue drug Discovery. **Eur J Med Chem**. v. 15, n. 176, p. 431-455, aug. 2019;
- DONASILIO, M. R., FREITAS, A. R. R., VON ZUBEN, A. P. B. Arbovirose emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Rev Saúde Pública**, v. 51, n. 30, 2017;
- DORAK, M. T. **Real-time PCR**. Disponível em: <http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html>, acesso em junho de 2019.
- DUCHEYNE, E., et al. Current and future distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in WHO Eastern Mediterranean Region. **Int J Health Geogr**, v. 17, n. 1, feb. 2018;
- DUVIGNAUD, A., et al. Rheumatism and chronic fatigue, the two facets of post-chikungunya disease: the TELECHIK cohort study on Reunion Island. **Epidemiol Infect.** 2018; 146 (5); 633-641;
- ELSINGA, J., et al. Health-related impact on quality of life and coping strategies for Chikungunya: A qualitative study in Curaçao. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 10, Oct. 2017;
- ESPOSITO, D. L. A.; DA FONSECA, B. A. L. Sensitivity and Detection of Chikungunya viral Genetic Material Using Several PCR-based Approaches. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 4, p. 465-469, July-August. 2017;
- EVANS-GILBERT, TRACY. Vertically transmitted Chikungunya, Zika and dengue virus infections: The pathogenesis from mother of fetus and the implications of co-infections and vaccine development, **International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine**, <https://doi.org/10.1016/j.ijpam.2019.05.00>;
- FERNADES, A. G. **Padronização e validação de método de RT-PCR em tempo real para o vírus da febre amarela vacinal e cinética de replicação viral in vitro**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2012;
- FERREIRA, G. P.; et al. Climbing the steps of viral atomic force microscopy: visualization of Dengue virus particles. **Journal of Microscopy**, v. 231, n. 1, p. 180-185, jul. 2008.
- FIGUEIREDO, L. B. *et al.* Dengue Virus 2 American-Asian Genotype Identified during the 2006/2007 Outbreak in Piauí, Brazil Reveals a Caribbean Route of Introduction and Dissemination of Dengue Virus in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n.

8, p. 1-11, Aug. 2014;

FIGUEIREDO, L. B., *et al.* Dengue Virus 2 American-Asian Genotype Identified during the 2006/2007 Outbreak in Piauí, Brazil Reveals a Caribbean Route of Introduction and Dissemination of Dengue Virus in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, e104516;

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

FURUYA-KANAMORI L., *et al.* Co-distribution and co-infection of Chikungunya and dengue viroses. **BMC Infect Dis**, v. 16, n. 188, mar. 2016;

FRED, A., *et al.* Individual and contextual risk factors for Chikungunya vírus infection: the cross-sectional population-based study of SEROCHIK. **Epidemiol Infect.** 2018;

GALÁN-HUERTA, K. A., *et al.* Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175-183, 2015;

GAMASHOVA N., *et al.*, The old world and new world alphaviruses use diferente virus-specific proteins for induction of thanscriptional shutoff. **Journal of virology**, v. 81, n. 5, mar. 2007;

GARCÊS, T. C. C. C. **Caracterização molecular de Dengue vírus circulantes e investigação de Flavivírus emergentes no Estado do Piauí.** 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piau, Parnaíba, 2016;

GAUTRET, P., SIMON, F. Dengue, Chikungunya, and Zika and mass gatherings: What happened in Brazil, 2014. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, p. 7-8, feb. 2016.

GELETA, D., *et al.* Epidemiological description of Chikungunya vírus outbreak in Dire Dawa Administrative City, Western Ethiopia, 2019. **Internationa Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences.** V. 6, n. 3, p. 41-45, jun. 2020;

GÉRARDIN, P., *et al.* Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infect Dis**, v. 8, n. 99, jul. 2008;

GIACOMIN, N. T., *et al.* Optic neuritis secondary to chikunya virus infection. **Rev Bras Oftalmol**, v. 77, n. 4, p. 222-224, 2018;

GOULPIL, B. A., MORES, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **The Open Rheumatology Journal**, v. 10, p. 129-140, 2016;

GRAVINA, H. D., *et al.* Identification of insect-specific flaviviruses in areas of Brazil and Paraguay experiencing endemic arbovírus transmission and the discription of a novel flavivírus infecting *Sabethes belisarioi*. **Virology**, v. 527, p. 98-106, jan 2019;

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, jul. 1998;

GUBLER, D. J. Dengue, urbanization and globalization: The unholy Trinity of the 21st Century. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4, p. 3-11, 2011.

- GUZMAN, M. et al.; Dengue infection. **Nature Review**. v. 2, n. 6, p. 1-25, ago. 2016.
- HALSTEAD, S. B, Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? **Rev Panam Salud Publica**, v. 6, p. 407-15, 2006;
- HAMMON, W.M., Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand, **Science**, v. 131, n. 3407, apr. 1960;
- HEID, C. A., et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
- HERNANDEZ, R., BROWN, D.T., PAREDES, A. Structural differences observed in arboviroses of the alphavirus and flavivirus genera. **Adv Virol**, v. 2014, doi: 10.1155/2014/259382;
- HONÓRIO, N. A., *et al.* Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906-908, may. 2015;
- IVORY, M. O.; BIRCHALL, J. C.; PIGUET, V. Early Dengue Virus Infection in Human Skin: A Cycle of Inflammation and Infectivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1711-1712, jul. 2015.
- JAVELLE, E., *et al.* Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Restrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. 1- 18, Mar. 2015;
- JOHN, A. L. S.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 420-426, jun. 2013;
- JOSE., J., SNYDER, J. E., KUHN, R. RJ. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, p. 837-856, sep. 2009;
- KAM, Y. W., et al. Sero-prevalence and cross-reactivity of Chikungunya specific anti-E2EP3 antibodies in arbovirus-infected patients. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 1, jan. 2015;
- KATZELNICK, L. C., *et al.* Dengue: Knowledge gaps, unmet needs and research priorities. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 88-100, Mar. 2017;
- KIMURA, R., HOTTA, S., Studies on Dengue fever. On the inoculation of dengue virus into Mice (in Japanese), **Nippom Igaku**, v. 3379, p. 629-33, 1944;
- KOHLER, L. I., et al. Epidemiologic profile of patients with subacute and chronic Chikungunya infection Evolution. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 16, n. 1, p. 13-7, 2018.
- KRAUER F., et al. Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and guillain-narré syndrome: systematic review. **PLoS Med** v. 14, n. 1, jan. 2017;
- KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.
- KUMAR, N. P. *et al.* A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1945-1948, 2008;

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545-551, Mar. 1992;

LETA, S. *et al.* Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegyptu* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis*. V. 67, p. 25-35, fev. 2018;

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

LIM, J. K., *et al.* Clinical and epidemiologic characteristics associated with dengue fever in Monbasa, Kenya. **International Journal of Infectious Diseases**, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.074>;

LIMA-CAMAR, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 50, n. 36, 2016;

LINDENBACH, B. D., *et al.* In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields virology**. 5 th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1101-52.

LIU, S., *et al.* Development and evaluation o fone-step multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus. **J Med Virol**, v. 90, p. 389-396, 2018

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

LORENZ, C., *et al.* Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 9, Sep. 2017;

Lorenz C, Azevedo TS, Chiaravalloti-Neto. COVID-19 e dengue: Uma combinação perigosa para o sistema de saúde no Brasil. **Travel Med Infect Dis** . 2020; 35: 101659. doi: 10.1016 / j.tmaid.2020.101659.

LUTZ, B. S., *et al.* Padronização das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para diagnóstico de *Candida albicans*. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 3, n. 1, p. 51-66, 2013;

MARQUES, C. D. L., *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia parra diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 – Diagnóstico e situações especiais. **Rev Bras Reumatol**, v. 5, n. 7, p. S421-S437, 2017;

MARTINS, M. M., *et al.* Arboviral diseases in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)*. 2019.<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2019.08.005>

MAYER, S. V.; *et al.* The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155-163, nov. 2016.

MCMINN, P. C. The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. **Journal of General Virology**, v.78, p. 2711-2722, 1997;

MELO, K. F. L., *et al.* O vírus oropouche e o seu contexto epidemiológico na america latina no período de 2009 a 2019. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 57, e4138. <https://doi.org/10.25248/reas.e4138.2020>

MÉNDEZ, N. et al. Clinical and epidemiological profile of Chikungunya infection in hospital patients in 2015 in Mérida, Mexico. **Rev Panam Salud Publica**, v. 41, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico.

Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika;

MORAES, L., et al. A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study. **PloS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 7, jul. 2020;

MORELI, M. L., DA COSTA, V. G. A systematic review of molecular diagnostic methods for the detection of arboviruses in clinical specimens in Brazil and the importance of a differential diagnosis. **Virology Discovery 2013**. Disponível em < <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2052-6202-1-1.pdf> >;

MOTA, M. T. O., et al. Mosquito-transmitted viruses: the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 171, n. 1, p.1-8, 2013;

MUKHOPADHYAY, S., et al. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews microbiology**, v. 3, p. 13-22, jan. 2005;

MURILLO-ZAMORA, E., et al. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. **Rev Panam Salud Publica**, v. 41, 2017;

MYHRVOLD, C. et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. **Science**, v. 360, p. 444-448, apr. 2018;

NIESTERS, H. G., et al. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 419-29, dec. 2001;

NOVAIS, C. M., PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. Revista Biotecnologia Ciência e desenvolvimento. Edição 33 julho/dezembro 2004.

Pan American Health Organization. Chikungunya interactive map. Available at: <http://www.arcgis.com/apps/MapTools/index.html?appid=ce2372254ce743b79d332b43724cd9e5>. Accessed July 8, 2016.

PARE, G., et al. Genetic risk for dengue hemorrhagic fever and dengue fever in multiple ancestries, **EBioMedicine**, v. 51, 2020;

PATTERSON, J., SAMMON, M., GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, nov. 2016;

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

PEREZ, F., et al. The decline of dengue in the Americas in 2017: discussion of multiple hypotheses. **Trop Med Int Health**, v. 24, n. 4, p. 442-53, apr. 2019;

PORTER, K. R. et al. A serological study of Chikungunya Virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. The Southeast Asian **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 35, n. 2, p. 408-415, 2004;

- POWERS, A. M., et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **J Virol**, v. 75, n. 21, nov. 2001;
- PUERTA-GUARDO H., et al. Flavivirus NS1 triggers tissue-specific vascular endothelial dysfunction reflecting disease tropismo. **Cell Reports**, v. 26, n. 6, p. 1598-1613, feb. 2019;
- RAHIM, Asma A. et al. Disability with Persistent Pain Following an Epidemic of Chikungunya in Rural South India. **The Journal Of Rheumatology**, Toronto, v. 43, n. 2, p.440-444, 15 dez. 2015.
- RIBEIRO, G. S., et al. Influence of herd immunity in the cyclical nature of arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 40, p. 1-10, feb. 2020;
- Ribeiro VST, Telles JP, Tuon FF. Arboviral diseases and COVID-19 in Brazil: Concerns regarding climatic, sanitation, and endemic scenario. **J Med Virol**. 2020 May 28:10.1002/jmv.26079. doi: 10.1002/jmv.26079. Epub ahead of print. PMID: 32462677; PMCID: PMC7283674.
- ROBERT, M. A., et al. Arbovirus emergence in the temperate city of Córdoba, Argentina, 2009-2018. **Scientific Data**. v. 276, nov. 2019;
- ROMERO-ALVAREZ, D., ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergente disease from the Americas. **Microbes Infect**. v. 20, n. 3, p. 135-146, mar. 2018;
- SÁ, P. K. O., *et al.* Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 2, p. 265-268, March-April. 2017;
- SABIN, A. B., SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, n. 2634, p. 640-2, jun. 1945;
- SAHAK, M. N. Dengue fever as na emerging disease in Afghanistan: Epidemiology of the first reported cases. **Int J Infect Dis**, v. 99, p. 23-27, jul. 2020;
- SAKKAS, H. et al. Oropouche fever: A review. **Viruses**. V. 10, n.175, 2018;
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York;
- SANTOS, D. R. X., *et al.* Fatores predisponentes ao surgimento das arboviroses emergentes do Brasil: Revisão integrativa da literatura. **Revista saúde**, v. 10, n. 1, 2016
- SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue vírus no Piauí: busca de sorotipos circulantes**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013;
- SCHILTE, C., et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: A month prospective longitudinal study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n.3, mar. 2013;

- SHAH, P. S., et al. Comparative Flavivirus-Host protein interaction mapping reveals mechanisms of Dengue and Zika virus pathogenesis. **Cell**, v. 175, n. 7, p. 1931-1945, dec. 2018;
- SILVA, L. A., DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J Clin Invest**, v. 127, n. 3, p. 737-749, mar. 2017.
- SILVA, L. A., DERMODY, T.S. Vírus Chikungunya: epidemiology, replication, disease mechanisms and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**. 2017; 127 (3): 737-749. doi: 10.1172 / JCI84417.
- SILVA, V. P. Aspectos clínicos detecção por métodos moleculares da infecção por *Chikungunya virus*. 2019. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba – PI, 2019.
- SITEPU, F. Y., et al. Epidemiological investigation of Chikungunya outbreak, West Kalimantan, Indonesia, v. 8, n. 1, p. 113-116, mar. 2020;
- SOARES-SCHANOSKI, A. et al. Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 15, n. 6, 2019;
- SOUZA, T. M., et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Sci Rep**. v. 9, n. 2760, 2019;
- TaqMan® Copy Number Assays Protocol. © Copyright 2010, Life Technologies Corporation. All rights reserved. Part Number 4397425 Rev. D09/2010.
- TANDALE, B. V., et al. Systematic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. **J Clin Virol**, v. 46, n. 2, p. 145-9, oct. 2009;
- TEIXEIRA, M. G. *et al.* East/Central/South african genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 906-8, 2015.
- TSETSARKIN, K. A., *et al.* A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 12, p. 1895-1906, Dec. 2007;
- UNO, N., ROSS, T. M. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 167, oct. 2018;
- VALE, V. S. **Análise Molecular e Considerações Filogenéticas sobre o Dengue virus**. 2015. 64f.
- VASCONCELOS, H. B., et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: Epidemiology and molecular characterization of isolates. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 2, p. 129-133, feb. 2009;
- VIEIRA D. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. 2002. Disponível em < <http://www.etall.hpg.ig.com.br> > Acesso em: 24 de janeiro de 2019.
- VU, D. M. et al. Chikungunya virus. **Clin Lab Med**, v. 37, n. 2, p. 371-82, mar. 2017;
- WANG, W., et al., Dengue hemorrhagic fever – A systemic literature review of current perspectives on pathogenesis, prevention and control. **Journal of**

Microbiology, Immunology and Infection,

<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.007>;

WAYMOUTH., H. E. Chikungunya-related arthritis: case report and review of the literature. **Semin Arthritis Reum**, v. 43, n. 2, p. 273-8, oct. 2013;

WEBSTER, D. P., et al. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 678-687, nov. 2009;

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue control. Disponível em <

<https://www.who.int/denguecontrol/human/en/>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2019.

WILDER-SMITH, A. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **Lancet Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. E101-e106, mar. 2017;

XAVIER, A. R., et al. Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: an update. **J Bras Patol Med Lab**, v. 53, n. 4, p. 252-257, Aug. 2017.

XIMENES, M. F. F. M., et al. Arbovirus expansion: New species of culicids infected by the Chikungunya virus in na urban park of Brazil. **Acta Tropica**, v. 209, 2020;

YASSEN, H. M., et al. Identification of initial severity determinants to predict arthritis after Chikungunya infection in a cohort of French gendarmes. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 15, jul. 2014;

YE, J., et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 134, jun. 2012;

ZAID, A., et al. Review Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n.4, dec. 2017.

ANEXO I

FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

DATA DO ATENDIMENTO: _____

NOME: _____

SEXO: Masculino Feminino

DATA DE NASCIMENTO:

NOME NA MÃE: _____

CEP:

ENDEREÇO: _____

NÚMERO: _____

BAIRRO: _____

MUNICÍPIO: _____ UF:

Adulto Criança (até 12 anos) Idoso (acima de 60 anos) Gestante 1º T 2º T 3º T

Início dos sintomas Febre há dias.

SINAIS E SINTOMAS PRESENTES

- Cefaleia Artralgia Náuseas Dor retroorbitaria Mialgia Icterícia
- Prostração Diarreia Vômitos Exantema com ou sem prurido
- Choro persistente/irritabilidade
- Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses
- Dor abdominal
- Outros

COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES

- Hipertensão Arterial Doença Hematológica _____
- Diabetes Mellitus Doença Cardiovascular _____
- DPOC Doença Autoimune Insuficiência Renal Doença ácido-péptica
- Hepatopatia Anemia Falciforme
- Outras
- Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE

- Comprometimento respiratório
- Hemorragia grave com ou sem sinais de choque
- Hemorragia presente Não Sim. Qual (is)?
- Conjuntival Epistaxe Gengivorragia Petéquias Equimose

- Metrorragia
- Hematúria
- Hematêmese
- Melena
- Hemoptoicos

Sinais de choque:

- Pulso rápido e fino
- Extremidades frias
- Pele pálida e úmida
- Enchimento capilar lento (> 2 seg.)
- Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg)
- Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)
- Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:

“Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes no Estado do Piauí.”

Pesquisador responsável:

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Profa. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

Universidade Federal do Piauí – Campus Universitário de Parnaíba

Av. São Sebastião, 2819 – CEP 64202-020

Telefones: (86) 9482-1278/99203470 / 94013035

Esclarecimentos

Você está convidado a participar deste estudo e contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído no estudo se este apresenta sintomatologia da dengue/arbovirose e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena porção de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no Serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue mas os técnicos disponíveis para coleta são bem treinados e credenciados e utilizam todo o material estéril que provê segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecida pelo pesquisador.

Os resultados desse estudo serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí e quais condições relacionadas ao hospedeiro frente a Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade de infecção. Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, com os responsáveis pela pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento e sua decisão não acarretará qualquer prejuízo na continuidade do seu

acompanhamento e tratamento. Se concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

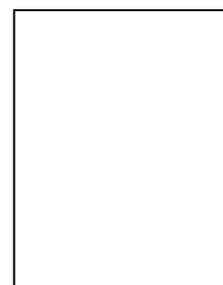
A realização desse projeto não terá custos aos voluntários. Além disso, fica garantida a manutenção de sigilo, por parte dos pesquisadores, sobre a identificação dos voluntários que decidirem colaborar com esse projeto de pesquisa.

Este documento será assinado em duas vias sendo uma de posse do participante e outra do pesquisador.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu, _____, CPF nº _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo/participação do estudo "Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes no Estado do Piauí.", como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Eu discuti com o Dr. Gustavo Portela Ferreira/ Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço.

Parnaíba, _____ / _____ / _____



Impressã
o digital

Assinatura do sujeito ou responsável

.....

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

RG: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

RG: _____ Assinatura: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, _____ / _____ / _____

Gustavo Portela Ferreira
Pereira

Anna Carolina Toledo da Cunha

Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga.
Pró Reitoria de Pesquisa - PROPESQ.
CEP: 64.049-550 - Teresina - PI.

ANEXO III
QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DE CRONICIDADE CHIKV

Nome: _____

Endereço:

Idade: _____

Profissão: _____

Data da coleta: _____

Primeiro contato: _____ Segundo Contato
 (Atual): _____

Criança () Jovem () Adulto () Idoso () Gestante () _____
 Puerpério ()

SINTOMAS E DADOS CLÍNICOS DE FASE CRÔNICA

1. Tempo de duração dos sintomas (semanas ou meses):

2. Rigidez matinal (>30 min): sim () não ()

3. Quantifique Principais membros/sítios anatômicos/articulações acometido (a)s:

Dedos das mãos () Mãos () Punhos () Cotovelos () Ombros ()

Quadril () Joelhos () Tornozelos () Pés () Dedos dos pés ()

Dores na coluna: cervical () Torácica () Lombar ()

3.1 - Outros membros/articulações
 acometidos _____

4. Intensidade da artralgia: Fraca () Moderada () Forte ()

5. Padrão de acometimento articular: simétrico () assimétrico ()

6. Presença de edema/inchaço nos membros ou articulações: não () sim ()

Quais membros _____

6.1 - Edema com vermelhidão: sim ()
) _____

não ()

6.2 - Edema com calor sobre a articulação: sim ()
) _____

não ()

7. Dormência nos membros: sim ()

não ()

8. Outros sintomas Clínicos: mialgia () manifestações cutâneas/ coceira/
 vermelhidão () falta de concentração () depressão ()

9. Presença de Comorbidades

9.1. Hipertensão arterial ()

Usa medicação ()

• Quais _____

9.2. Diabetes ()

Usa medicação ()

• Quais _____

9.3. Doenças reumáticas Prévias ()

Usa medicação ()

• Quais _____

9.4. Doenças autoimunes ()

Usa medicação ()

• Quais _____

9.5. Obesidade () Peso _____ Altura _____ Usa medicação ()

• Quais _____

9.6. Outras comorbidades ()

Usa medicação ()

• Quais _____

10. Duração e Recorrência

Queixas: Permanente () Recidivante ()

10.a - Na média, quantos dias você passou sem dores?

10.b - Quantos períodos sem dores você teve nas últimas 12 semanas?

10.c - Quantos desses períodos duraram mais que 1 mês?

11. Limitação dos movimentos articulares ao realizar atividades cotidianas: sim () não ()

12. Houve necessidade de afastamento nos últimos 3 meses de suas atividades usuais (trabalho, escola, serviço doméstico) devido a dor? _____ dias

13. Segue algum tratamento medicamentoso para combater as dores ocasionadas por CHIKV: sim () não ()
