



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ANDRIU DOS SANTOS CATENA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LECITINA:COLESTEROL
ACILTRANSFERASE EM PACIENTES INFECTADOS POR ARBOVIROSES E
DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA O ZIKV**

Recife
2020

ANDRIU DOS SANTOS CATENA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LECITINA:COLESTEROL
ACILTRANSFERASE EM PACIENTES INFECTADOS POR ARBOVIROSES E
DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA O ZIKV**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife
2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Catena, Andriu dos Santos

Avaliação da atividade da enzima lecitina: colesterol aciltransferase em pacientes infectados por arboviroses e desenvolvimento de teste rápido para o ZIKV / Andriu dos Santos Catena – 2021.

141 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2021.

Inclui referências.

1. Arboviroses 2. Dengue 3. Zicavírus I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (orient.) II. Título

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-073

ANDRIU DOS SANTOS CATENA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LECITINA:COLESTEROL
ACILTRANSFERASE EM PACIENTES INFECTADOS POR ARBOVIROSES E
DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA O ZIKV**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 28 de Fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins (Orientadora)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Examinador Interno)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, UFPE

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Externo)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, PE

Dr^a. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (Examinador Externo)
Hospital das Clínicas – HC, UFPE

Ao povo brasileiro, guerreiro, por enfrentar as arboviroses durante a tríplice epidemia, em especial as mães das crianças com microcefalia pela constante luta visando conquistar um mundo melhor aos seus filhos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o grande momento da jornada científica, um marco para minha história pessoal e profissional. Se eu consegui estar aqui hoje é devido à presença de pessoas fantásticas ao meu redor, que sempre me motivaram a seguir em frente.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dra^a. Danyelly Bruneska pela amizade, parceria durante os experimentos de bancada e viagens, pelas orientações que vão além do que se aprende no doutoramento. Obrigado pelo incentivo e de acreditar no meu potencial, valeu a pena enfrentar noites de formulários ao seu lado!

Aos meus professores, em especial a José Luiz de Lima Filho, Rosângela Frade, Henrique Castelletti e todos que participaram da minha jornada acadêmica. Tornei-me hoje o profissional que sempre quis ser, espelhando-me nos queridos professores que tive a oportunidade de conhecer, desde o colégio Piaget até a pós-graduação da UFPE.

À comunidade do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA – UFPE, que vive e faz ciência, em especial aos meus colegas de jornada do Laboratório de Prospecção Molecular e Bioinformática (Maria Amélia, Maria de Fátima, Ana Cecília, Gisnaye Silva, Joana D'arc, Thaysa Waléria, Ananda Cristina, Renato Pessoa, Renata Bezerra, e todos os demais membros que fazem e fizeram parte do grupo). Aos colegas de doutorado, Aurenice Arruda e Amanda Ferrão. Agradeço a todos que fazem o LIKA ser um ambiente familiar e auspicioso à ciência, em nome de Vera Lúcia, Luiz Carlos e Fábio Brayner.

Aos pesquisadores japoneses que de longe vieram para validar o equipamento de detecção do vírus da Zika, acreditando no potencial da equipe do LIKA, em nome de Yohei Kurosaki e Jiro Yasuda. Agradeço a minha amiga e parceira Carol Córdula, pelo companheirismo durante essa aventura.

A Dr^a. Sandra Mattos e toda a equipe do Circulo do Coração pela jornada de 14 dias ao longo do sertão paraibano, onde pude conhecer de perto a realidade das pessoas que sofriam com as arboviroses. Foi extremamente importante para minha formação profissional vivenciar histórias de luta e superação dessas mães (guerreiras) que enfrentaram às escuras os primeiros casos de microcefalia associados às doenças arbovirais.

Ao meu companheiro, amigo e eterno parceiro, Pedro Oliveira, por todo apoio durante a jornada científica, desde a graduação até o doutorado. Muito obrigado por acreditar em mim em momentos que eu já havia desistido. Agradeço também pela família que você me deu, em

nome de Ana Nascimento. Em especial, a Aurora Maria e M. Cristina, por todo amor possível desse mundo.

Aos meus familiares, pela paciência, compreensão em relação às ausências, pelo afeto e conforto nos momentos cruciais da minha jornada. À Márcia dos Santos, minha mãe, por ser meu porto seguro; ao André Catena Jr., meu pai, por ser minha referência; à Rilzete Rios, por ser minha segunda mãe e ter acreditado no meu potencial; aos meus irmãos Andréia Catena, André Catena, Natália Catena, Geovanna Catena e Eduardo Rios, por ser a minha base. Não sou nada sem vocês. Agradeço a todos os demais membros da família Santos e Catena, por me transformarem no homem que sou hoje.

Jamais poderei deixar de agradecer a você, Raquel Catena (*in memoriam*) minha irmã de coração, de alma, por todas as aventuras vividas juntos. Queria que você pudesse ver aonde consegui chegar... Sempre te amarei, minha estrelinha.

Aos meus amigos de vida, trabalho, colegas de graduação e pós-graduação, em especial a Wanuska Portugal, Hugo Félix, Mariana Andrade, Mariana Oliveira, Kleyton Clementino, Angélica Salles, Laís Andreza e Ianne Tayrine, por me aguentarem ao longo de tantos anos; aos amigos da madrugada Rafael Zamys, César Tabosa e Bruno Oliveira, por escutarem minhas reclamações diárias. Espero sempre ter vocês ao meu lado.

Aos meus alunos, por serem minha inspiração, por me despertar o desejo de ser um profissional qualificado, pela amizade conquistada dentro e fora da sala de aula. Obrigado por tudo; minha maior realização é poder ver vocês crescendo e trilhando com os próprios pés suas respectivas jornadas. O mundo é de vocês, mas sempre podem contar comigo como ponto de apoio.

E por fim, a todos aqueles que contribuíram na minha formação profissional.

Os meus sinceros agradecimentos.

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem
perder entusiasmo.”*

(Winston Churchill)

RESUMO

As infecções por arboviroses se tornaram emergentes a nível mundial e de elevado impacto à saúde pública, responsável por causar aos pacientes sintomas como febre, rash, artralgia, mialgia e prostração. No Brasil, a dengue (DENV) é a infecção mais prevalente, enquanto os vírus da zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV) foram reportados apenas recentemente. Pacientes infectados por arbovírus podem apresentar alterações do metabolismo lipídico e elevação de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, não está elucidado o papel da enzima lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), responsável pela maturação de lipoproteínas, durante o processo infeccioso. O objetivo desse estudo foi avaliar as variáveis sintomatológicas exibidas em mono/co-infecções por DENV, ZIKV e CHIKV, correlacionado-as com os níveis da enzima LCAT. Dados epidemiológicos foram obtidos de 93 pacientes que apresentavam sintomas agudos por arbovírus em 2016 no estado da Paraíba, dos quais 56, 50 e 13 foram positivos por detecção de RNA ao ZIKV, DENV e CHIKV, respectivamente. A co-infecção por ZIKV/DENV foi registrada em 42 pacientes, enquanto 11 foram positivos para ZIKV/CHIKV e CHIKV/DENV, e nove demonstraram tripla infecção. Níveis alterados de LCAT foram diretamente relacionados ao desenvolvimento de rash e prostração às três infecções, enquanto alterações oftalmológicas foram observadas em paciente com histórico de DENV e CHIKV. Mialgia e edema foram relatados apenas em pacientes com CHIKV. Por fim, o desenvolvimento de métodos *point of care* que permitam realizar o diagnóstico rápido das arboviroses é essencial no auxílio do tratamento personalizado ao paciente infectado. Dessa forma, foi desenvolvido um ensaio de detecção rápido e de baixo custo ao ZIKV por meio da LAMP-PCR, exibindo resultados consistentes quando comparado ao teste de referência (RT-qPCR). Esse método pode ser utilizado como ferramenta de diagnóstico alternativo ao ZIKV durante eventuais novos surtos.

Palavras-chave: Arboviroses. Dengue. Vírus da Zika. Chikungunya. LCAT. LAMP-PCR.

ABSTRACT

The infections caused by arboviruses have become emerging worldwide with a high impact on public health, promoting to patients symptoms such as fever, rash, arthralgia, myalgia, and prostration. In Brazil, dengue virus (DENV) is the most frequent infection, while the Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) have only recently been reported. Patients with arbovirus infection may develop changes in metabolism lipid, causing an increase of pro-inflammatory cytokines. However, is not elucidated the role of lecithin:cholesterol acyltransferase enzyme (LCAT), responsible for the lipoprotein maturation, during the infectious process. The main goal of this study is to evaluate the symptomatological variables exhibited in mono/co-infections by DENV, ZIKV, and CHIKV, correlating with the levels of LCAT enzyme. Epidemiological data were obtained from 93 patients who had profound symptoms due to arboviruses in 2016 in the state of Paraíba, whose 56, 50 and 13 were positive by RNA detection to ZIKV, DENV, and CHIVK, respectively. The ZIKV/DENV co-infection was observed in 42 patients, while 11 were positive for ZIKV/CHIKV and CHIKV/DENV, and nine exhibited triple infection. Altered levels of LCAT were related to the development of rash and prostration to the three infections, while ophthalmological changes were observed in a patient with a history of DENV and CHIKV. The myalgia and edema were reported only in patients with CHIKV. Finally, the development of point of cares methods that allow the rapid diagnosis of arboviruses is essential in the support of personalized treatment to the infected patient. Thus, was developed a quick test of ZIKV detection through LAMP-PCR, exposing consistent results when compared to the reference test (RT-qPCR). This method can be used as an alternative diagnostic tool for ZIKV during possible new outbreaks.

Keywords: Arboviruses. Dengue. Zika virus. Chikungunya. LCAT. LAMP-PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.2	OBJETIVOS.....	14
1.2.1	Objetivo geral.....	14
1.2.2	Objetivos específicos.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	ARBOVIROSES EMERGENTES.....	15
2.1.1	Vírus da Dengue: histórico, epidemiologia e surtos no Brasil.....	18
2.1.2	Vírus Chikungunya: histórico, epidemiologia e surto no Brasil.....	21
2.1.3	Vírus Zika: histórico, epidemiologia e surto no Brasil.....	24
2.1.4	Co-infecção por DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil: dados epidemiológicos e sintomatologia diferencial.....	29
2.1.5	Quantificação da carga viral, detecção de anticorpos e manejo clínico do paciente portador de DENV, CHIKV e ZIKV.....	31
2.1.6	Novas ferramentas de diagnósticas das arboviroses.....	39
2.1.7	Infecções virais e alterações do metabolismo de lipídeos.....	46
2.1.8	HDL e Lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT).....	49
3	METODOLOGIA.....	57
3.1	ÁREA DE ESTUDO.....	57
3.2	TIPO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	58
3.3	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	60
3.4	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	61
3.5	DETECÇÃO DE ANTICORPOS E RNA VIRAL.....	61
3.6	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LCAT.....	62
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	63
4	RESULTADOS.....	64
5	DISCUSSÃO.....	84
6	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE A – DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A RAPID MOLECULAR DIAGNOSTIC TEST FOR ZIKA VIRUS INFECTION BY REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-	

MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION.....	107
ANEXO A – QUESTIONÁRIO SINTOMATOLÓGICO.....	138
ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA.....	139

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do século XX foi observada a reintrodução de mosquitos transmissores de doenças virais em diversas cidades em processo de desenvolvimento, resultando na dispersão de seus agentes infecciosos em escala mundial (ROCHA et al., 2017). Surtos recorrentes de doenças virais foram relatados em diversos países, inclusive em regiões sem histórico de transmissão devido à plasticidade genética dessas viroses associada aos fatores antrópicos e socioeconômicos, como alterações climáticas, desmatamento e migrações (ATKINSON; HEWSON, 2018).

De fato, as últimas décadas foram marcadas pelo surgimento e expansão geográfica de uma série de “arbovírus”, termo que descreve vírus transmitidos por artrópodes que se alimentam de sangue, como mosquitos, carrapatos e flebotomíneos (BALL et al., 2018; GYAWALI et al., 2017). A maioria das arboviroses é mantida em complexos ciclos silvestres em reservatórios de amplificação, como pássaros, pequenos mamíferos e primatas não humanos (PNH). Entretanto, ocasionalmente pode ocorrer adaptação viral em humanos com subsequente origem a ciclos urbanos ou epidêmicos (MAVIAN et al., 2019).

Os arbovírus incluem uma ampla variedade de taxa de vírus de RNA com elevada variabilidade genética (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, e *Orthomyxoviridae*) (CHARLIER et al., 2017; WEAVER; REISEN, 2010). Dentre eles, destacam-se os sorotipos do vírus da dengue (DENV) (BARRERA et al., 2018) e vírus da Zika (ZIKV) (ESTOFOLETE et al., 2018), ambos pertencentes à família *Flaviviridae*; além do vírus da chikungunya (CHIKV), compondo a família *Togaviridae* (SOUZA et al., 2018). Os mosquitos do gênero *Aedes* são um dos principais vetores das arboviroses (GOULD et al., 2017), promovendo surtos dessas infecções emergentes devido a sua elevada distribuição mundial (COSTA et al., 2018a).

Atualmente, os arbovírus representam 30% dos eventos de doenças infecciosas em humanos em todo o mundo, afetando diversas áreas úmidas tropicais e equatoriais (COSTA et al., 2018b). O vírus da dengue foi introduzido na década de 80 no Brasil, sendo DENV-1 o sorotipo prevalente; no entanto, após seu ressurgimento no país em 2009, foi identificada a co-circulação de diferentes linhagens desse vírus (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2018a). Em 2014, foi confirmada a transmissão autóctone do CHIKV em duas regiões brasileiras geograficamente distintas e distantes (SLAVOV et al., 2018). Por fim, a introdução do ZIKV ocorreu em 2015, havendo um grande surto associado a um aumento no número de casos de microcefalia (BRITO et al., 2018).

As arboviroses apresentam um desafio à saúde pública devido às taxas de mortalidade e morbidade (LIANG; GAO; GOULD, 2015). Na maioria dos casos, essas infecções são assintomáticas ou subclínicas; apenas 20% desenvolvem uma doença semelhante à gripe febril como febre, cefaléia, dor retro-orbital e mialgia (BARZON, 2018). Outros sintomas clínicos são erupção cutânea, artralgia, síndromes neurológicas e hemorrágicas (CLETON et al., 2012). Nos estágios iniciais, pacientes infectados por DENV, CHIKV ou ZIKV apresentam similaridade de sintomas, levando dificuldades em realizar o diagnóstico clínico preciso e o tratamento adequado do paciente pelos profissionais de saúde (AULT et al., 2019; CALVO et al., 2016).

Pacientes infectados por arboviroses estão condicionados a desenvolver um processo inflamatório intenso, mediado pela elevação das taxas de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Essas citocinas pró-inflamatórias podem provocar alterações no metabolismo lipídico, associadas com redução das taxas da lipoproteína de alta densidade (HDL) e da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), responsáveis por diminuir a quantidade de colesterol livre no sangue e a nível celular (LY et al., 1995; VYROUBAL et al., 2008). Como reflexo da inflamação, os pacientes infectados por algum tipo de doença arboviral poderão desenvolver manifestações clínicas mais intensas.

Uma vez que o Brasil vivenciou na última década uma tríplice epidemia envolvendo DENV, CHIKV e ZIKV, a transmissão simultânea dessas arboviroses se tornou factível. Devido à sobreposição sintomatológica dessas infecções, uma triagem molecular torna-se fundamental para avaliação clínica de pacientes que manifestem sinais de doenças virais febris (SACCHETTO et al., 2018). Através de ferramentas de diagnóstico de alta precisão, como a LAMP-PCR (do inglês, *loop-mediated isothermal amplification*), torna-se possível a detecção e atendimento clínico adequado às populações que apresentam elevada vulnerabilidade às infecções arbovirais (SILVA et al., 2018).

O presente trabalho compreende a avaliação da relação do metabolismo lipídico, por meio da alteração da enzima LCAT, com a intensidade das manifestações sintomatológicas em pacientes com infecção por arboviroses. Por fim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de testes que proporcionam o diagnóstico laboratorial aos vírus que co-circulam em áreas afins, uma vez que a sobreposição sintomatológica impacta negativamente no diagnóstico preciso das arboviroses. Dessa forma, foi desenvolvido um teste de fácil manipulação ao ZIKV por meio da LAMP-PCR, sendo extremamente útil para o diagnóstico dessa arbovirose que desencadeou epidemias de caráter emergencial ao redor do mundo na última década.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos sintomatológicos e os níveis da enzima lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) em pacientes infectados pelo vírus da zika (ZIKV), dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) no Estado da Paraíba/Brasil em 2016, assim como desenvolver um teste de diagnóstico rápido para o ZIKV.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Realizar o diagnóstico diferencial de ZIKV, DENV e CHIKV em pacientes suspeitos por meio da detecção de anticorpos e quantificação do RNA viral.
2. Investigar o perfil biológico e sintomatológico de pacientes infectados por ZIKV, DENV e CHIKV a partir do diagnóstico laboratorial.
3. Avaliar a correlação dos níveis de enzima LCAT frente aos sinais clínicos apresentados pelos pacientes infectados por ZIKV, DENV e CHIKV.
4. Desenvolver um método de diagnóstico laboratorial rápido, sensível e específico ao ZIKV baseado no sistema de detecção LAMP-PCR.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

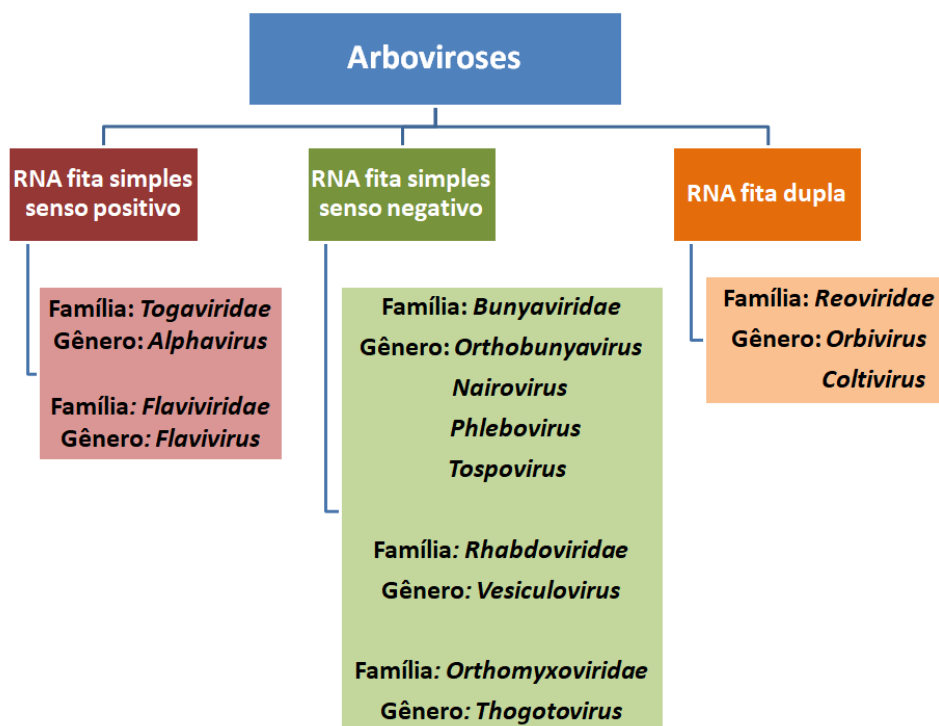
2.1 ARBOVIROSES EMERGENTES

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos com elevada distribuição mundial, sendo uma ameaça constante à saúde pública por impactar diretamente os seres humanos, a vida selvagem, animais domésticos e vegetais (MARÍN-LOPEZ et al., 2019). Mais de 90% das infecções provocadas por esses vírus são transmitidas por vetores de mosquitos. Fatores antrópicos, socioeconômicos e ambientais, como a urbanização, globalização e o aumento das temperaturas contribuíram para a expansão da distribuição geográfica de diferentes mosquitos com consequente elevação do número de casos dessas infecções (ÖHLUND; LUNDÉN; LIE, 2019).

As arboviroses são englobadas em um grupo altamente heterogêneo de aproximadamente 537 vírus de RNA que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados. Apesar de sua significativa diversidade taxonômica, seus mecanismos de ecologia e manutenção genética são semelhantes (HIGUERA; RAMÍREZ, 2018). Os arbovírus clinicamente significativos pertencem às famílias e gêneros *Togaviridae* (Alphavirus), *Flaviviridae* (Flavivirus), *Bunyaviridae* (Bunyavirus) e *Reoviridae* (Orbivirus) (GYAWALI et al., 2017). Arbovírus pertencentes às famílias *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae* são patogênicos para animais domésticos e selvagens (HUBÁLEK; RUDOLF; NOWOTNY, 2014) (Quadro 1).

O genoma dos vírus constituídos por RNA está sujeito a altas taxas de replicação e mutação, resultando em variabilidade na composição genética que aumenta a capacidade de se adaptar a ambientes celulares distintos e cruzar barreiras de espécies (ATKINSON; HEWSON, 2018). A única arbovirose conhecida composta por genoma de DNA é o Vírus da Peste Suína Africana (MICHAUD; RANDRIAMPARANY; ALBINA, 2013). Essa escassez de variedade sugere que somente os vírus contendo RNA tornaram-se aptas de exibir plasticidade genética e taxas mais altas de mutação, sendo fatores cruciais para a disseminação dessas infecções em novos territórios (WEAVER; REISEN, 2010).

Quadro 1 – Classificação de arbovírus, incluídos em seis diferentes famílias de vírus taxonômicos.



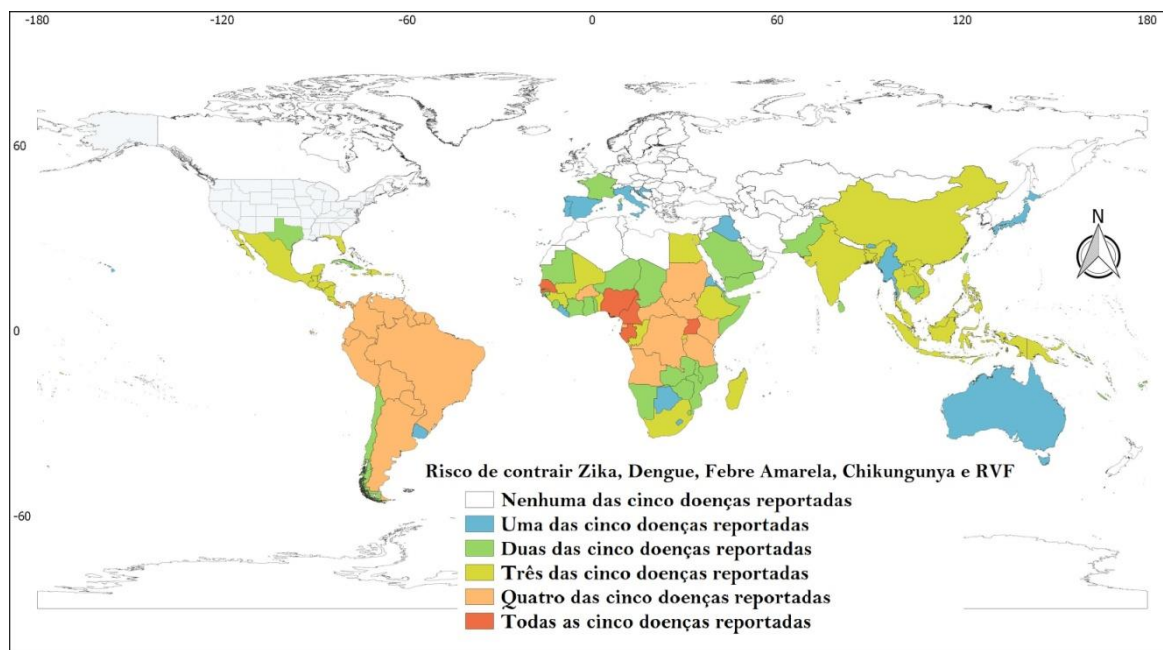
Fonte: Adaptado de GO; BALASURIYA; LEE (2014).

Dentre as principais notificações envolvendo as infecções por arbovírus nos últimos anos destacam-se os surtos anuais de vírus da dengue (DENV) nas Américas (MESSINA et al., 2014), surtos de vírus da febre amarela (FAV) na América do Sul (ROMANO et al., 2014) e o Vírus do Nilo Ocidental (WNV, do inglês *West Nile Fever*) tornando-se endêmicos na Europa (JOHNSON et al., 2018). Houve um crescente número de casos com elevada morbidade envolvendo o vírus da chikungunya (CHIKV) (GONZÁLEZ-SÁNCHEZ; RAMÍREZ-ARROYO, 2018) e o surto do vírus Zika (ZIKV) associado a casos de microcefalia (BRITO et al., 2018). Por fim, a febre do Vale do Rift (RVF, do inglês *Rift Valley Fever*) vem surgindo como uma das principais zoonoses associadas a vírus na África (SUMAYE et al., 2019) (Figura 1).

As doenças arbovirais mencionadas acima estão se tornando cada vez mais uma preocupação de saúde global devido à sua rápida dispersão geográfica e alta carga de doenças. Especialmente nos últimos 30 anos, o impacto na distribuição e na saúde pública desses arbovírus aumentou dramaticamente. De fato, diversos surtos desses arbovírus ocorreram ultimamente em regiões que apresentam endemia aos mosquitos do gênero *Aedes* (LETA et al., 2018). O mosquito se torna infectado quando realiza o repasto sanguíneo em um homem ou um animal em fase virêmica. O vírus ingerido passa a se multiplicar para posteriormente se

alocar nas glândulas salivares de artrópode. Por fim, são inoculados em um novo hospedeiro quando o vetor realiza novamente a hematofagia (MERLE et al., 2018).

Figura 1 – Ocorrências globais em nível de país das doenças arbovirais por Vírus Zika, Dengue, Febre Amarela, Vírus chikungunya e Febre do Vale do Rift – RVF.



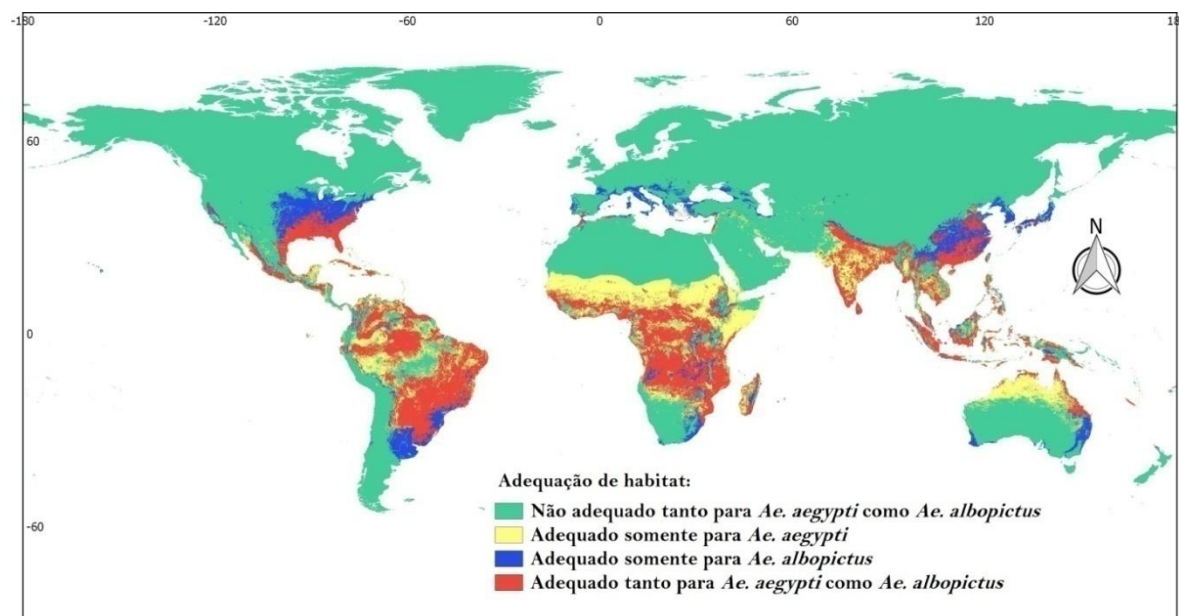
Em branco, países onde não houve detecção das doenças reportadas. Em vermelho, países que apresentaram a ocorrência de todas as infecções. Fonte: Adaptado de LETA et al. (2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014), mais de um bilhão de pessoas são infectadas e mais de um milhão de pessoas morrem de doenças transmitidas por vetores todos os anos. Essas infecções são principalmente transmitidas por mosquitos, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, sendo ambas as espécies vetores eficientes para doenças arbovirais humanas em ambiente urbano. Adicionalmente, possuem uma região de adequabilidade de habitat extremamente ampla que contempla todos os continentes (Figura 2) (LETA et al., 2018).

De origem africana e principal vetor, *Ae. aegypti* apresenta hábitat em ambiente urbano, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (BRAACK et al., 2018), desenvolvendo-se em todos os tipos de água estagnada e realiza hematofagia em períodos diurnos. Esse mosquito pode picar várias pessoas ao longo do dia, levando a uma rápida disseminação das doenças arbovirais. Sua extensão européia e na América do Norte são limitadas devido a sua intolerância a baixas temperaturas. No entanto, *Ae. albopictus* (de

origem asiática) tolera temperaturas negativas, espalhando-se amplamente nessas regiões (MERLE et al., 2018).

Figura 2 – Adequação global do habitat previsto para *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.



Fonte: Adaptado de LETA et al. (2018).

Dessa forma, a principal forma de transmissão dos arbovírus ocorre de modo horizontal através a hematofagia de um vetor contaminado. Apesar dos mosquitos do gênero *Aedes* serem os principais vetores para humanos, há evidências de que outras espécies de mosquitos, como o *Culex quinquefasciatus*, transmitirem infecções como o ZIKV (GUEDES et al., 2017; MARIE et al., 2018). Outras formas de transmissões de algumas arboviroses são possíveis, por exemplo, o ZIKV pode ser sexualmente transmitido como também pode ocorrer de forma vertical envolvendo a passagem do vírus de uma gestante infectada à prole (YARRINGTON et al., 2019).

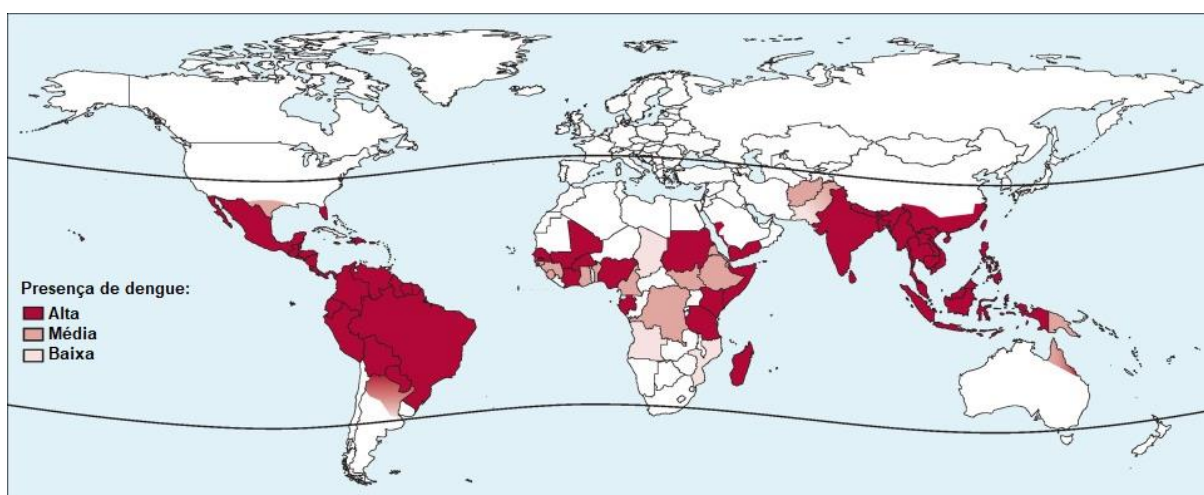
2.1.1 Vírus da Dengue: histórico, epidemiologia e surtos no Brasil

A dengue é uma das doenças negligenciadas mais importantes do mundo, apresentando elevado impacto à saúde pública. Essa infecção apresenta epidemias recorrentes em larga escala com elevado aumento da extensão geográfica, número de casos e gravidade dos sintomas (ALBUQUERQUE et al., 2018; BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2018b). Sua incidência e o risco de surtos aumentaram em mais de 30 vezes nas últimas décadas. Estima-

se que haja aproximadamente 390 milhões de infecções por dengue a cada ano, das quais 96 milhões se manifestam clinicamente (BHATT et al., 2013; MARQUES-TOLEDO et al., 2019; RAMALHO et al., 2018).

A doença é causada pelo vírus da dengue (DENV), um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, com quatro sorotipos antígenicamente distintos de alta variabilidade genotípica (DENV-1 a 4)(RAMALHO et al., 2018). A transmissão da dengue é observada no Mediterrâneo Oriental, nas Américas, no Sudeste Asiático, no Pacífico Ocidental e na África (Figura 3), justamente em áreas endêmicas aos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, seus principais vetores. Há casos frequentes da doença em áreas não endêmicas, incluindo os EUA e a Europa. Nessas áreas, a dengue é responsável por um número crescente de doenças febris agudas relacionadas à viagem (AULT et al., 2019; MARQUES-TOLEDO et al., 2019).

Figura 3 – Presença global da Dengue, 2014.



Fonte: Adaptado de GUZMAN; HARRIS (2015).

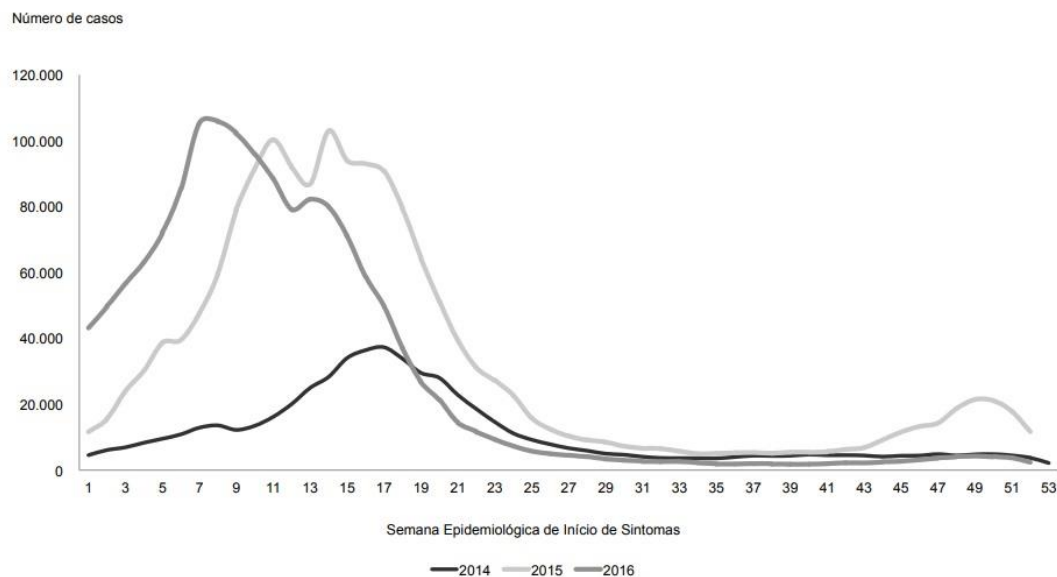
O impacto econômico da dengue nas Américas é estimado em US \$ 2,1 bilhões por ano em média (SHEPARD et al., 2011). Entre as décadas de 1950 e 1960, as Américas eram uma zona virtualmente livre da dengue, devido a campanhas de prevenção continental apoiada pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). No entanto, após o final da campanha na década de 1960, os esforços de controle de vetores não foram mantidos, havendo re-infestação dos mosquitos *Aedes*. No geral, os países sul-americanos relataram mais de 700 mil casos durante 1977-1980, sendo DENV-1 o sorotipo predominante (AULT et al., 2019).

A dengue foi introduzida no Brasil na década de 1980, provocando mais de doze milhões de casos nos últimos 32 anos (BRUYCKER-NOGUEIRA et al., 2018b). Desde então,

caracterizou-se por disseminação geográfica no país com aumento na incidência de casos notificados (MARQUES-TOLEDO et al., 2019). O primeiro surto de dengue com confirmação laboratorial ocorreu em 1982, restrito à região norte, com o isolamento dos sorotipos DENV-1 e DENV-4. Nos anos de 2011 e 2012, o DENV-4 foi responsável por epidemias na maioria dos estados, coincidindo com a circulação simultânea dos quatro sorotipos em todo o território brasileiro (RAMALHO et al., 2018).

Em 2016 houve um grande surto de dengue nas Américas, com aproximadamente 1,5 milhão de casos no Brasil (AULT et al., 2019) (Figura 4). A região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis de dengue (858.273 casos; 57,2%) em relação ao total do país, seguida das regiões Nordeste (324.815 casos; 21,6%), Centro-Oeste (205.786 casos; 13,7%), Sul (72.650 casos; 4,8%) e Norte (39.011 casos; 2,6%). Nesse ano, foram confirmados 861 casos de dengue grave, 8.402 casos de dengue com sinais de alarme e 642 óbitos foram confirmados por dengue (BRASIL, 2017a).

Figura 4 – Casos prováveis de dengue no Brasil (2014, 2015 e 2016), por semana epidemiológica de início de sintomas.

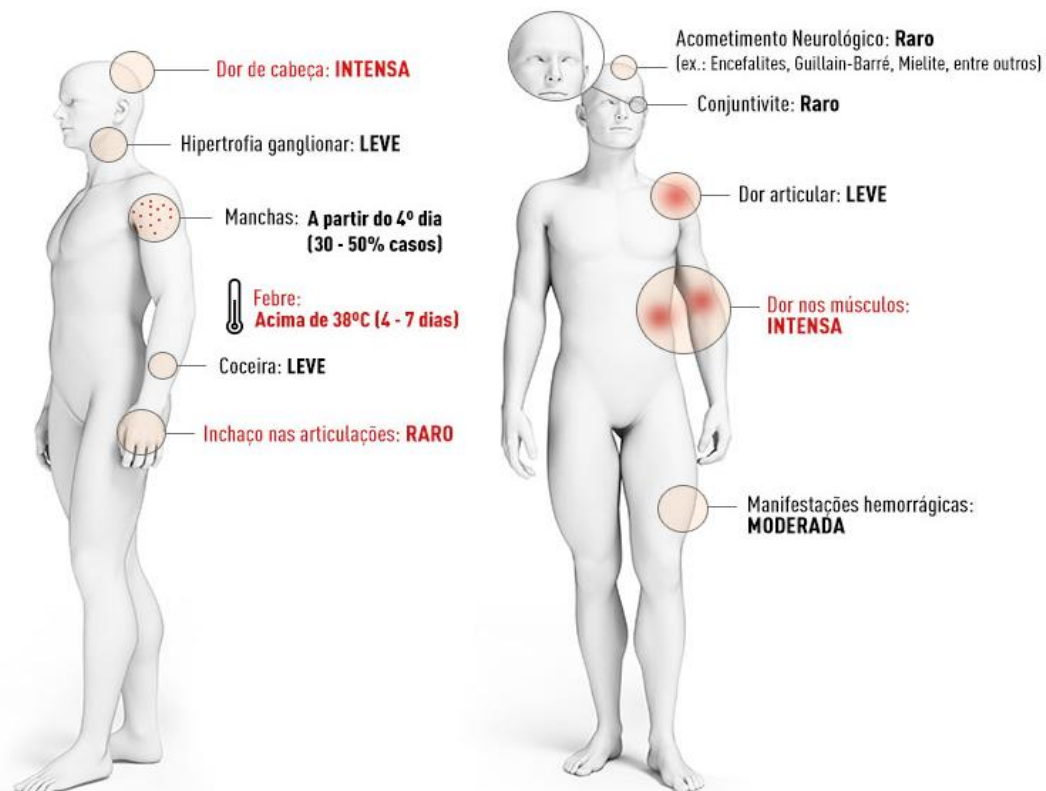


Fonte: BRASIL (2017).

A infecção por dengue pode resultar em um amplo espectro de sintomas, desde infecções assintomáticas e auto-limitada até dengue grave e resultados potencialmente letais (Figura 5). Sem diagnóstico clínico rápido e terapia adequada, as taxas severas de casos fatais de dengue podem exceder 20% (AULT et al., 2019). Trata-se de uma doença febril ligeira; quando leve a moderada pode se manifestar com febre, dor muscular e óssea, dor de cabeça e

nos olhos, náusea, fadiga e outros sintomas inespecíficos. A dengue não complicada pode ter manifestações hemorrágicas sem danos significativos nos órgãos terminais ou perda de volume intravascular. Em contraste, a dengue grave ocorre como resultado de vazamento plasmático significativo e coagulopatia, resultando em hipotensão ou choque e, potencialmente, morte (THOMAS et al., 2018).

Figura 5 – Principais sintomas da Dengue.



Fonte: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (2016).

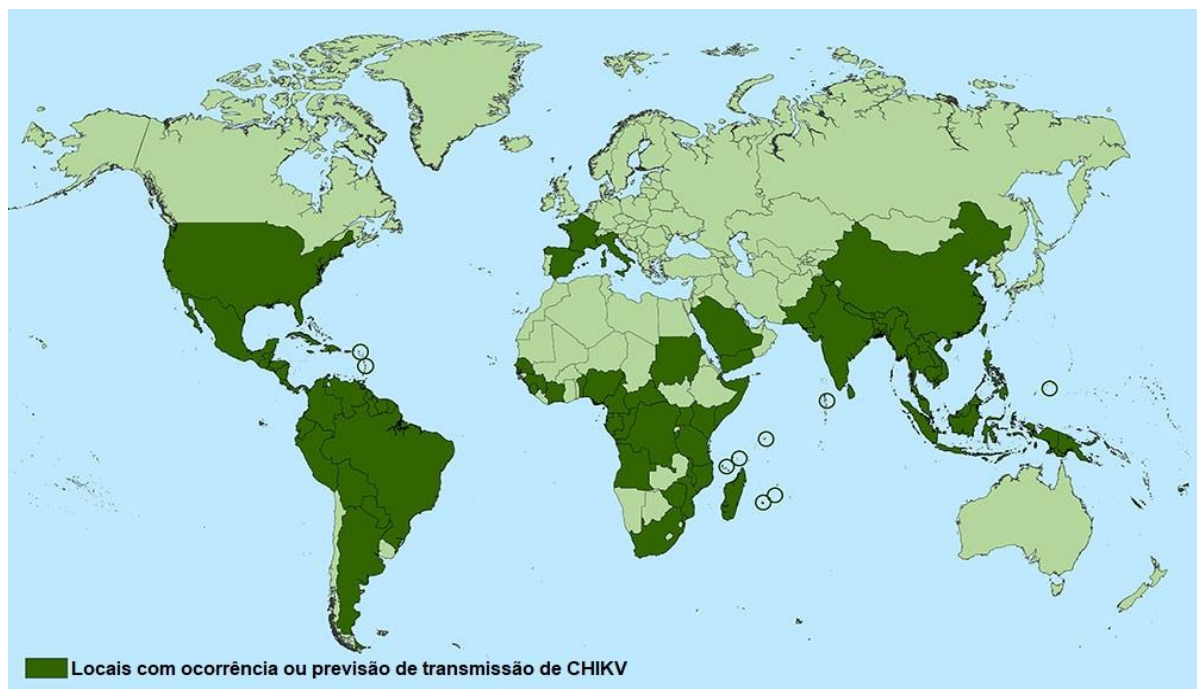
2.1.2 Vírus Chikungunya: histórico, epidemiologia e surto no Brasil

O vírus da chikungunya (CHIKV) é uma doença infecciosa emergente, transmitido através da picada de mosquitos infectados. Trata-se de um organismo pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, com três subtipos (dois africanos e um asiático) (BRITO, 2017), composto por RNA senso positivo com aproximadamente 70 nm de diâmetro, além de um envelope lipídico e genoma de 11,5 kb (OLIVER; CARR; SMITH, 2018). Os sintomas típicos dessa doença são febre e dor nas articulações (HSU et al., 2019). Embora esta doença seja autolimitada e não associada à alta mortalidade, pode causar a artrite grave, crônica e incapacitante, o que representa um grande ônus para os sistemas de saúde (MASCARENHAS et al., 2018).

O CHIKV foi descoberto há mais de seis décadas; no entanto, foi pouco investigado. Recentemente, após a ocorrência de um surto em ambos os hemisférios devido à adaptação viral dessa arbovirose a novas espécies de mosquitos, foi realçada a necessidade de compreender essa infecção (FROLOV; FROLOVA, 2019). Relatado pela primeira vez na Tanzânia, entre 1952-1953, provocou um surto explosivo em várias aldeias com propagação subsequente rápida, envolvendo 60 a 80% da população em um período de duas a três semanas (ROBINSON, 1955). Em *Kimakonde*, linguagem local onde ocorreu a epidemia, o termo *Chikungunya* significa “ficar contorcido” ou “curvar em dor” em referência à postura encurvada assumida pelo paciente em consequência a dor articular e artralgias grave, características marcantes da doença (MASCARENHAS et al., 2018; SPOTO et al., 2018).

Essa arbovirose é principalmente transmitida pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em regiões tropicais e subtropicais, em ciclos urbanos (MUÑOZ-MEDINA et al., 2018). Em 2005, foi relatada a transmissão de CHIKV a várias regiões do planeta, causando milhões de novos casos (MASCARENHAS et al., 2018) em mais de 60 países na Ásia, África, Europa e nas Américas (Figura 6) (SPOTO et al., 2018). Desde 2013, o vírus circula nas Américas do Sul e Central e nas Ilhas do Caribe, causando grandes epidemias em toda a região onde vetores competentes já haviam sido estabelecidos (FROLOV; FROLOVA, 2019; MASCARENHAS et al., 2018).

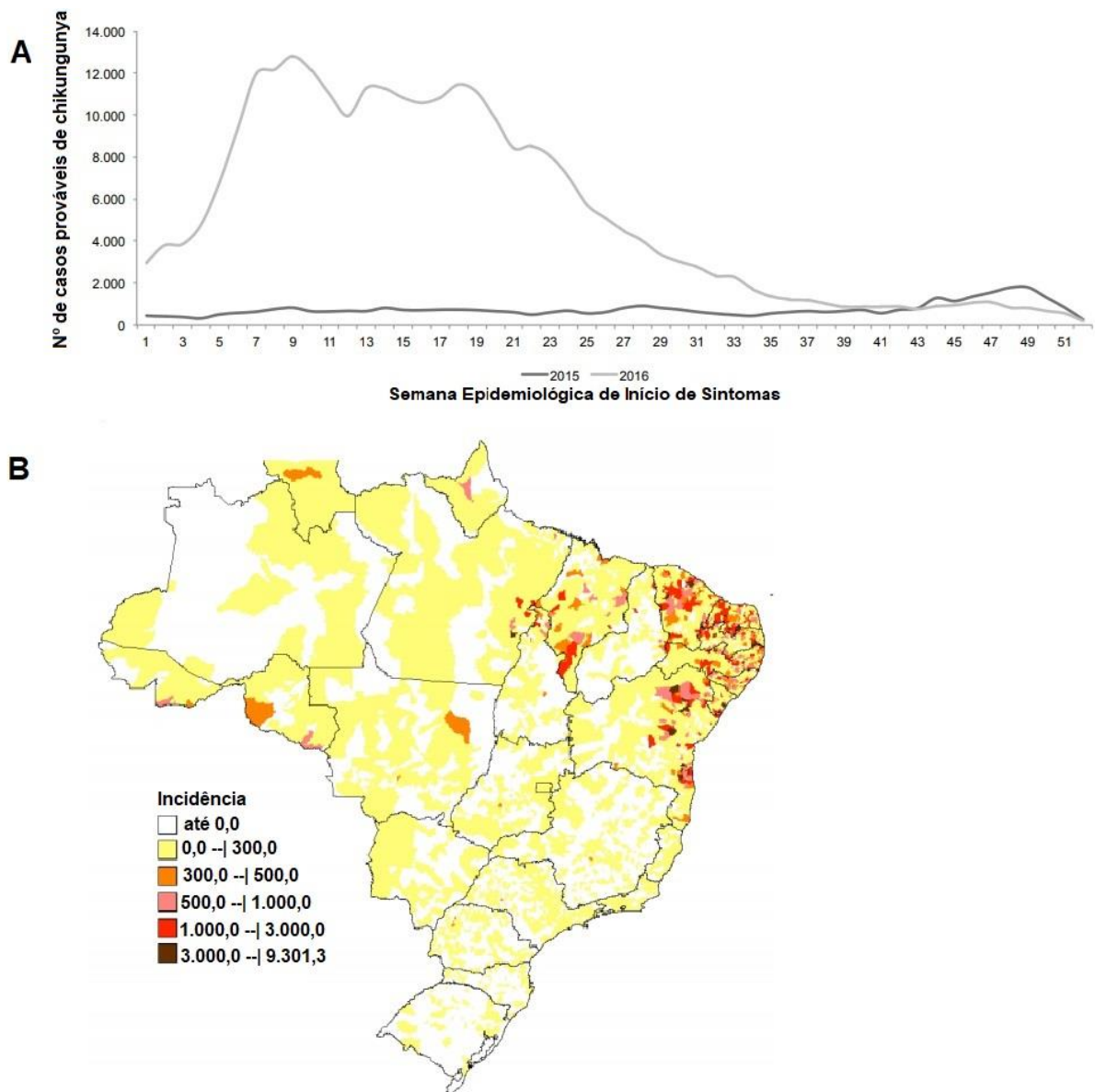
Figura 6 – Ocorrência global do vírus Chikungunya (CHIKV).



Fonte: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2018).

No Brasil, os primeiros casos da Febre Chikungunya foram notificados no segundo semestre de 2014, nas regiões Norte e Nordeste (BRITO, 2017). Em 2016, até a 52ª semana epidemiológica, foram notificados 271.824 casos prováveis dessa infecção no país, com 196 óbitos confirmados (Figura 7). Por regiões geográficas, o Nordeste apresentou a maior taxa de incidência: 415,7 casos/100 mil habitantes.

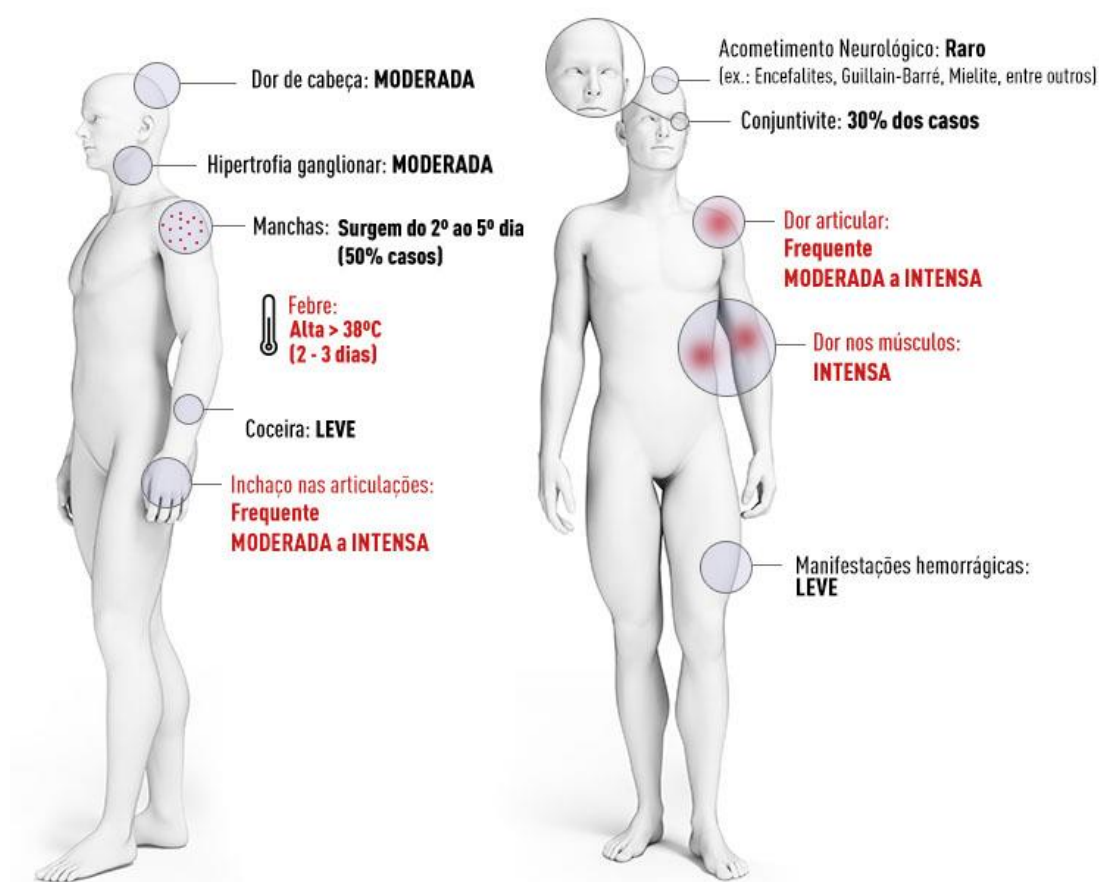
Figura 7 – Dados epidemiológicos da Febre Chikungunya no Brasil (2015 e 2016).



A) Casos prováveis de febre de chikungunya, por semana epidemiológica de início de sintomas. B) Incidência (/100 mil hab.) de febre de chikungunya por município, até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Fonte: Adaptado de BRASIL (2017).

A proporção de infecções assintomáticas por CHIKV durante as epidemias foi relatada entre 3 a 28%. Juntamente com dor articular severa, principalmente nos pés e mãos, além de dedos, tornozelos e pulsos, os pacientes com a febre chikungunya exibem exantema febril e sintomas com padrão tipicamente observados em infecções pelo vírus da Dengue (DENV) e vírus Zika (ZIKV), como dor de cabeça e mialgia (Figura 8), dificultando o diagnóstico preciso dessa arbovirose (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016a; MASCARENHAS et al., 2018).

Figura 8 – Principais sintomas da Febre Chikungunya.



Fonte: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (2016).

2.1.3 Vírus Zika: histórico, epidemiologia e surto no Brasil

O vírus Zika (ZIKV) é uma arbovirose emergente ao redor do mundo, transmitido predominantemente pela picada de mosquitos. Durante 2015-2017, uma extensa epidemia desse arbovírus foi documentada em todo o hemisfério ocidental (ROSENBERG et al., 2018), principalmente na América Latina, em especial no Brasil, chamando a atenção devido à

hipótese de que a infecção está relacionada a danos gestacional e ao aumento da probabilidade de causar microcefalia em recém-nascidos (SOUSA et al., 2018).

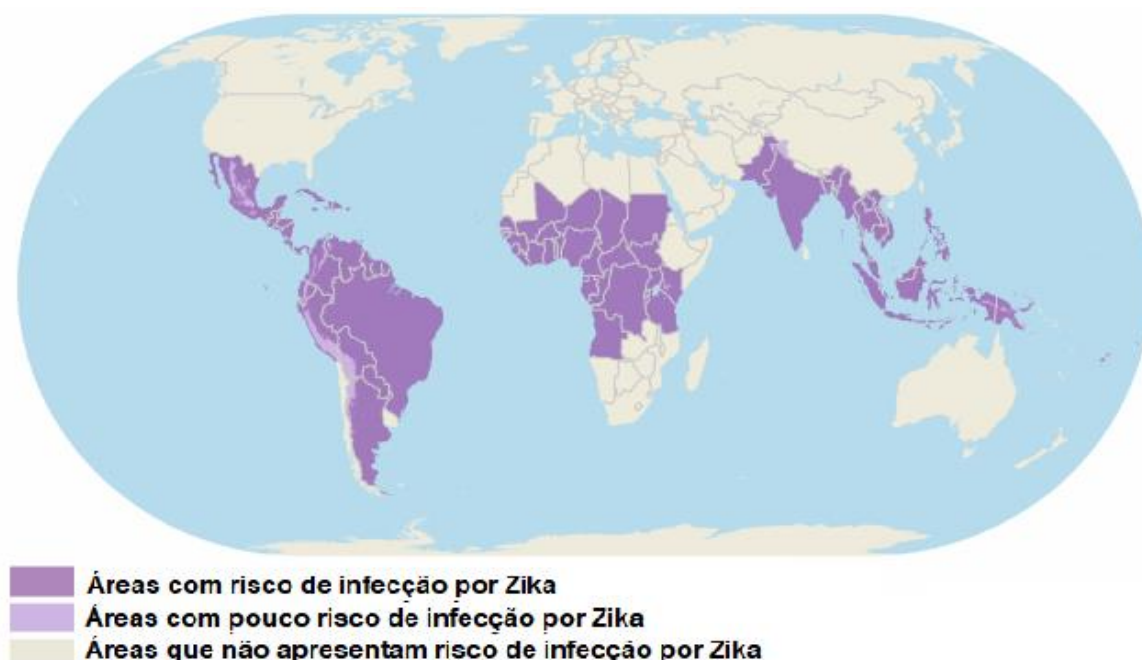
O ZIKV é membro do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, originalmente isolado em 1947 na Uganda em macacos sentinelas *rhesus* próximo a floresta Zika (AZEVEDO et al., 2018; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Não houve registros de casos de infecção humana até 1954. O primeiro grande surto dessa arbovirose ocorreu em 2007 na ilha Yap, Micronésia, onde quase 18% dos indivíduos infectados se tornaram sintomáticos (AL-DAHSHAN et al., 2018). Entre 2012 e 2014, vários casos foram notificados na Tailândia e na Polinésia Francesa (COELHO et al., 2018).

A maior parte da transmissão viral epidêmica e endêmica do ZIKV foi documentada em regiões tropicais e subtropicais. Apesar dos esforços internacionais para conter sua disseminação, atualmente o vírus afeta 84 países e territórios, principalmente o Caribe e na América do Sul e Central (Figura 9) (AL-DAHSHAN et al., 2018). De fato, essas regiões são caracterizadas por ocorrer uma acentuada disseminação do vetor dessa infecção, o mosquito *Aedes* (CHIBUEZE et al., 2017; GATHERER; KOHL, 2016).

Os mosquitos *Aedes* spp. afetam primatas humanos e não humanos, que servem como hospedeiros amplificadores nos ciclos urbano e silvestre, respectivamente (SIMÓN et al., 2018). Os mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são responsáveis por realizarem o ciclo urbano do ZIKV, também podendo promover a transmissão de outras arboviroses, como dengue. No entanto, há evidências sugestivas de que o ZIKV seja transmitido através de sangue, urina, contato sexual (SOGHAIER et al., 2018), sendo também detectado no leite materno, embora a transmissão do ZIKV pelo leite materno ainda não tenha sido relatada (KARWOWSKI et al., 2016).

Os primeiros relatos de um surto de doença exantemática desconhecido no Brasil, posteriormente identificado como infecção por ZIKV, foram emitidos em dezembro de 2014 (LOWE et al., 2018). A transmissão autóctone foi notificada em maio de 2015, sendo desde então o país mais afetado por casos positivos para essa arbovirose (COELHO et al., 2018). Nesse período, foi relatado um aumento de quase 20 vezes mais casos de microcefalia em relação aos anos anteriores, concomitante com o início da transmissão do ZIKV. Essa tendência levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional em fevereiro de 2016 (CHIBUEZE et al., 2017; VICTORA et al., 2016).

Figura 9 – Áreas com risco de infecção pelo vírus da Zika (2018).

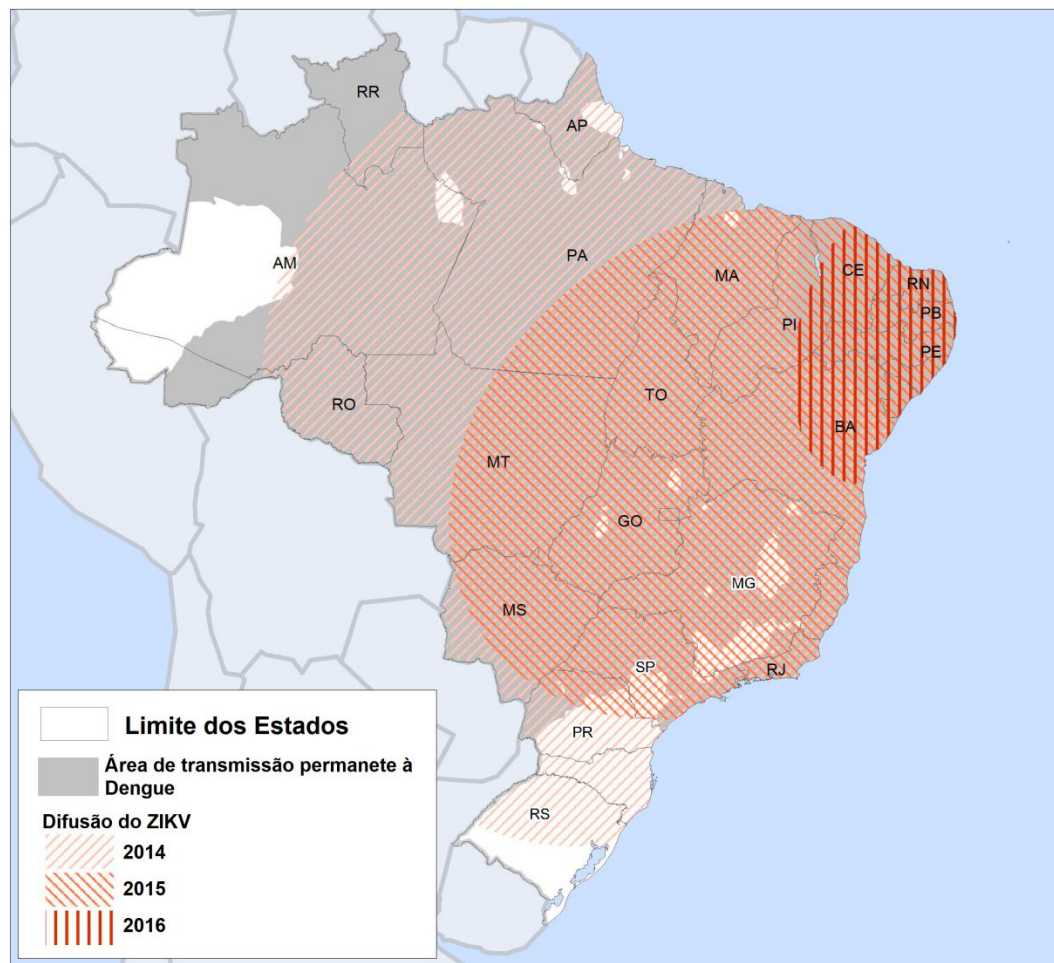


Fonte: Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2018b).

A propagação do ZIKV na população brasileira, com confirmação laboratorial, ocorreu primeiramente na região Nordeste nos estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA). Em seguida, espalhou-se para as regiões Centro-Oeste e Sudeste. Em 2016, o ZIKV havia se propagado para a maioria dos estados, exceto algumas áreas remotas na região amazônica e na parte mais ao sul do país, onde o clima não é favorável para o vetor (Figura 10) (LOWE et al., 2018). No total, foram registrados 215.319 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, com oito óbitos confirmados laboratorialmente. Em relação às gestantes, foram registrados 17.000 casos prováveis, sendo 11.052 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial (Figura 11) (BRASIL, 2017a).

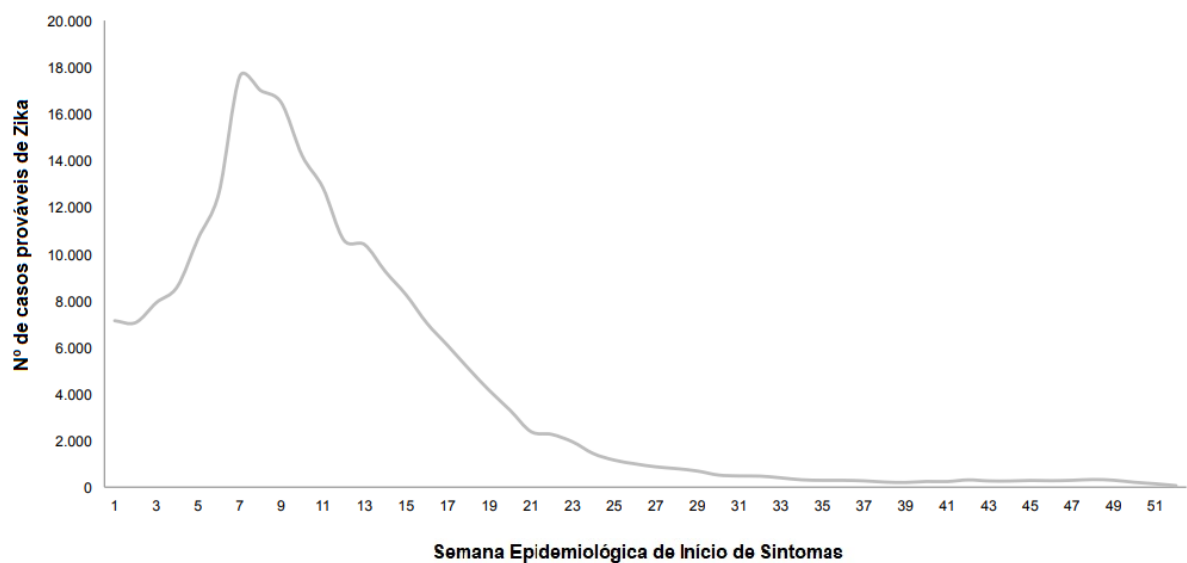
O genoma do ZIKV consiste de uma molécula de RNA senso positivo de fita simples com cerca de 10,7 kb, apresentando duas regiões não codificantes flanqueadoras e um único quadro de leitura aberto longo, que codifica uma poliproteína (SIMÓN et al., 2018). Esse quadro de leitura codifica três genes estruturais e sete não-estruturais, clivados tanto por maquinarias virais quanto hospedeiras, enquanto regiões não traduzidas em cada extremidade contribuem para replicação, tolerância e proteção contra fatores antivirais do hospedeiro, contribuindo para a variedade de sintomas dessa infecção (PETERS; STEVENSON, 2018). Por fim, são conhecidos três genótipos ao ZIKV, classificados como oeste africano, leste africano e asiático (LOWE et al., 2018).

Figura 10 – Difusão espacial do ZIKV no Brasil de 2014 a 2016.



Dados obtidos segundo relatos de casos e dados epidemiológicos produzidos pelo Ministério da Saúde e Secretárias Estaduais de Saúde. Fonte: Adaptado de LOWE et al., (2018).

Figura 11 – Dados epidemiológicos da Febre Zika no Brasil (2016).

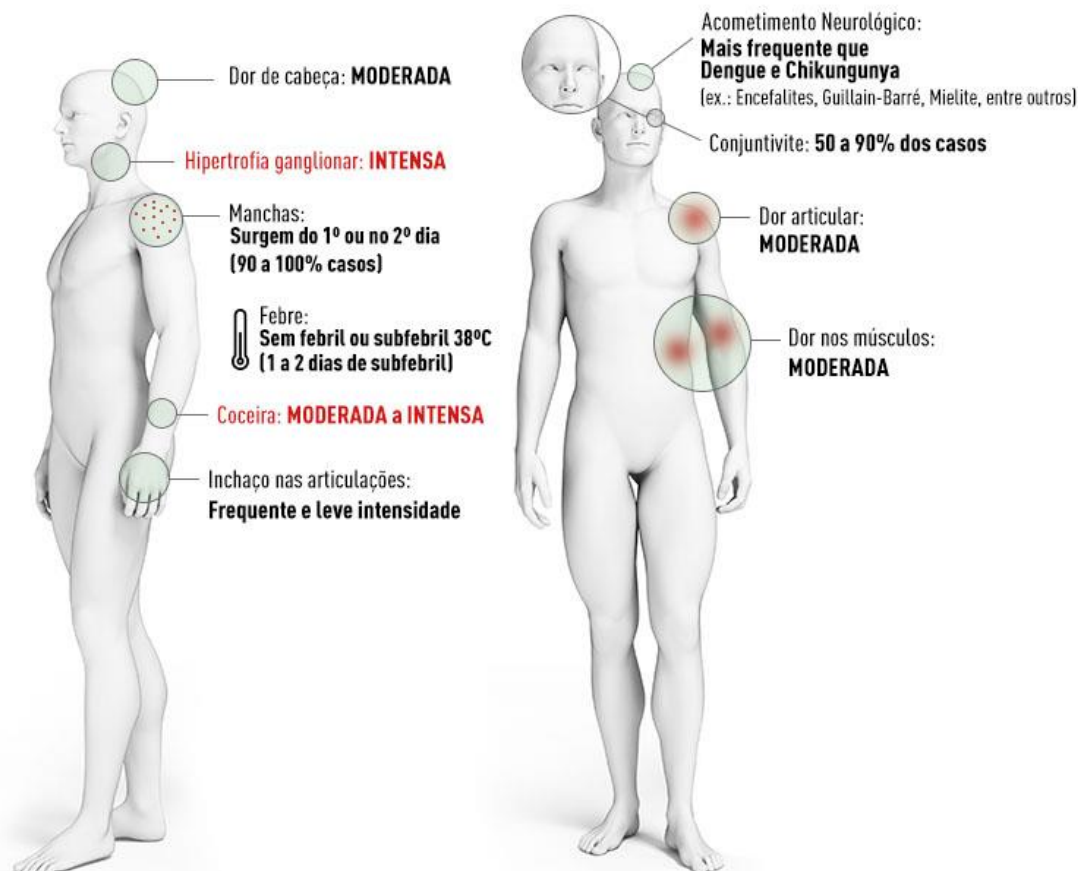


Casos prováveis de febre pelo vírus Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas. Fonte: Adaptado de BRASIL (2017).

A infecção por ZIKV é assintomática em até 80% dos casos (50% -80%), enquanto a infecção sintomática é geralmente leve, autolimitada e inespecífica, com febre baixa, artralgia, mialgia, cefaléia e conjuntivite (WATSON-BROWN et al., 2019). Outros sintomas menos freqüentes são inchaço no corpo, coceira, tosse e vômitos. No geral, a evolução da doença é benigna e os sintomas desaparecem espontaneamente após três a sete dias (Figura 12) (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016a).

O ZIKV também pode provocar a síndrome de Guillain-Barré e, quando adquirido durante a gravidez, causar aborto ou defeitos congênitos neurológicos (WATSON-BROWN et al., 2019). A taxa de resultados perinatais anormais após a infecção materna pelo ZIKV foi estimada entre 6% a 55% para infecções adquiridas no primeiro trimestre e de 3% a 29% para infecções adquiridas no terceiro trimestre (PEREIRA et al., 2018). Como atualmente não há vacina ou tratamento específico, os principais métodos para prevenir a disseminação da doença são o controle das populações de mosquitos e adaptação comportamental humana, como o uso de repelentes (WATSON-BROWN et al., 2019).

Figura 12 – Principais sintomas da Febre Zika.



Fonte: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (2016).

2.1.4 Co-infecção por DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil: dados epidemiológicos e sintomatologia diferencial

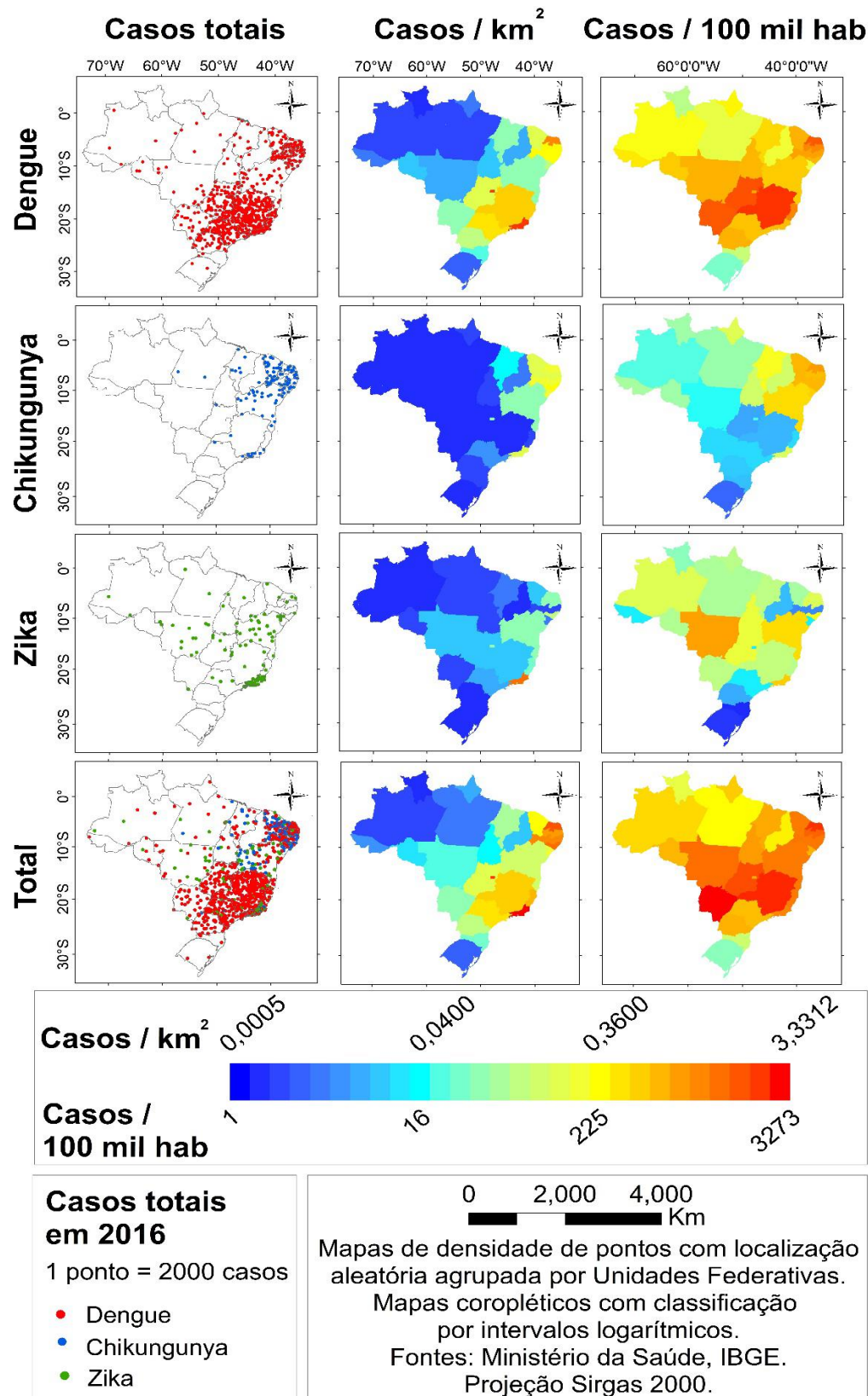
As doenças infecciosas transmitidas por vetores são responsáveis por mais de 700 mil mortes por ano, impactando os sistemas públicos de saúde devido a sua crescente incidência (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2017; VEGA et al., 2019). CHIKV e ZIKV são doenças emergentes nas Américas, enquanto a dengue é o vírus que apresenta maior prevalência no mundo. Essas doenças exibem elevada distribuição geográfica devido à globalização (MARTINEZ et al., 2019), tornando-se alarmante o crescente número de regiões epidêmicas que mostram co-circulação a essas arboviroses (VEGA et al., 2019).

DENV, CHIKV e ZIKV apresentam elevadas taxas de morbidade e formas clínicas graves. Essas infecções estão podendo provocar alterações neurológicas (MARTINEZ et al., 2019), complicações articulares e hemorrágicas (AZEREDO et al., 2019). Diversos estudos caracterizaram a ocorrência de uma epidemia tripla em andamento no território brasileiro, causada por DENV, ZIKV e CHIKV (Figura 13) (AZEREDO et al., 2019; ESTOFOLETE et al., 2018; PESSÔA et al., 2016). Essa co-infecção constitui um grave problema de saúde no país em termos de dinâmica de transmissão das arboviroses, competência de vetores, aspectos clínicos e complicações de saúde dos pacientes acometidos por tais viroses (ESTOFOLETE et al., 2018).

O principal vetor dessas arboviroses é o *Aedes aegypti*, encontrado em todas as regiões do Brasil. A maior parte do país apresenta padrões climáticos favoráveis para a reprodução e sobrevivência desses mosquitos. Em conjunto com o clima, outros fatores também contribuíram para a proliferação dos vetores, como infra-estrutura urbana precária, irregularidades no abastecimento de água e coleta de lixo, além de pouca efetividade dos programas governamentais de controle de vetores (COSTA et al., 2018c).

Pacientes infectados por DENV, CHIKV ou ZIKV podem desenvolver uma doença febril aguda com características clínicas semelhantes (Tabela 1). Na maioria dos casos, essas infecções são assintomáticas ou subclínicas; apenas 20% desenvolvem sintomas como febre, cefaléia, dor retro-orbital, mialgia, erupção cutânea (exantema ou rash cutâneo) e artralgia (BARZON, 2018; WAGGONER et al., 2016). Apesar das manifestações sintomatológicas serem parecidas, o manejo clínico dessas doenças é diferente (CALVO et al., 2016). Dessa forma, a apresentação clínica inespecífica e variável pode retardar o diagnóstico final (ECKERLE et al., 2018).

Figura 13 – Matriz de Pequenos Múltiplos com os mapas univariados representando casos totais, por quilômetro quadrado e por 100 mil habitantes, para as ocorrências de Dengue, Chikungunya e Zika no Brasil em 2016.



Fonte: VASCONCELOS; MOUTINHO; PINHO (2017).

Tabela 1 – Comparativo entre as características das infecções causadas por DENV, CHIKV e ZIKV.

Características	DENV	CHIKV	ZIKV
Período de Incubação (dias)	5-8	1-12	3-12
Assintomático	60%-80%	<30%	>80%
Febre $\geq 39^{\circ}\text{C}$	+++	+++	++
Rash	+	++	+++
Artralgia/Mialgia	+ / ++	+++ / +	+++ / +
Artrite	-	+++	++
Sangramento	++	-	-
Linfocitopenia	++	+++	+
Neutropenia	+++	++	+
Trombocitopenia	+++	-	-
Artrite crônica	-	+	-
Síndrome de Guillain-Barre	+ / -	+ / -	+
Choque	+	-	-
Transmissão sexual	-	-	+
Transmissão por transfusão de sangue	+ / -	+ / -	+
Microcefalia	-	-	+
Edema de articulações	-	++ / +++	+
Conjuntivite	-	+	++ / +++
Cocceira	-	+	++ / +++

+++ = 70-100% dos pacientes; ++ = 40-69%; + = 10-39%; + / - = < 10%; - = 0%. Fonte: Adaptado de MARTINEZ et al. (2019) e BRASIL (2016).

Apesar dos primeiros relatos de infecção congênita por ZIKV ocorrerem em 2015 no Brasil, há pouca informação sobre as conseqüências para o feto da co-infecção materna pelo ZIKV e outros arbovírus (PRATA-BARBOSA et al., 2018). ZIKV apresenta chances de resultar abortamento quando ocorre no primeiro trimestre de gestação ou mesmo provocar microcefalia e restrição de crescimento intrauterino (BRASIL et al., 2017). Já a infecção pelo CHIKV tem sido associada a uma variedade de sintomas no recém-nascido, desde sintomas clássicos de doenças febris agudas, até meningoencefalite e microcefalia (TORRES et al., 2016). Por fim, a infecção por DENV durante a gestação está associada a um maior risco de aborto, morte fetal, parto prematuro e baixo peso ao nascer (PAIXÃO et al., 2016).

2.1.5 Quantificação da carga viral, detecção de anticorpos e manejo clínico do paciente portador de DENV, CHIKV e ZIKV

As arboviroses são doenças de notificação compulsórias tanto em casos autóctones como importados (NOUVELLE-AQUITAINE, 2017). Devido os sintomas iniciais serem semelhantes, associados a febre, cefaléia, artralgia e erupções cutâneas (MERLE et al., 2018), o diagnóstico clínico de DENV, CHIKV e ZIKV pode ser comprometido devido à co-

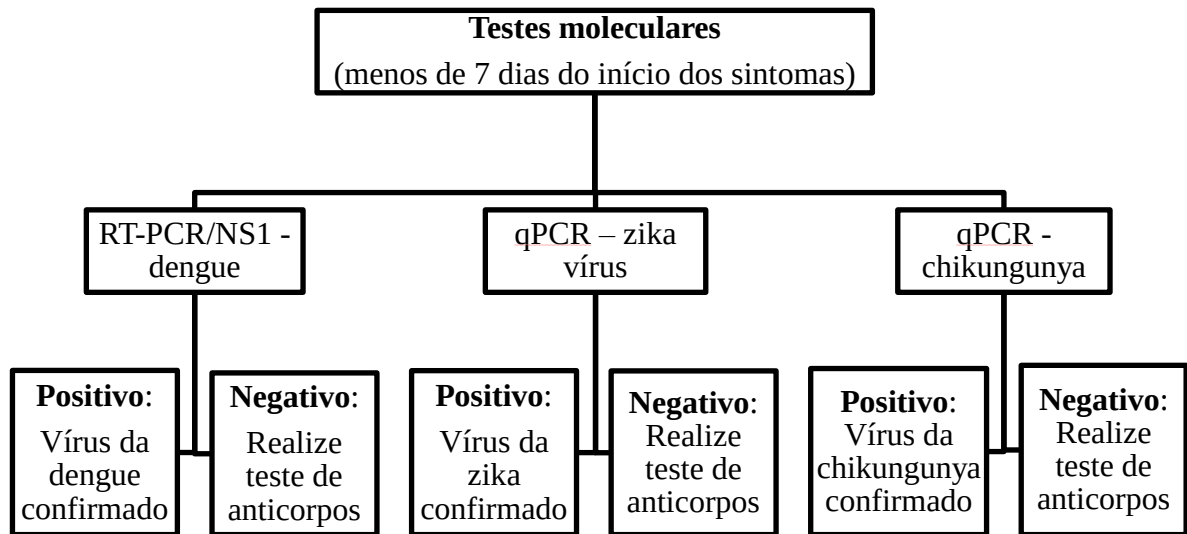
circulação desses patógenos (MASCARENHAS et al., 2018). Além disso, o diagnóstico laboratorial das arboviroses apresenta como desvantagem a necessidade de um longo tempo de processamento, impedindo o tratamento clínico imediato aos pacientes infectados (VEGA et al., 2019).

Os serviços laboratoriais para diagnóstico eficiente das arboviroses não estão prontamente disponíveis na maioria das unidades de saúde e de emergência em países tropicais e subtropicais. Dessa forma, poucos estudos avaliaram sistematicamente a frequência de infecções arbovirais e compararam os dados e características epidemiológicas de infecções simples versus co-infecções (SILVA et al., 2018). Assim, uma melhor caracterização de DENV, CHIKV e ZIKV é fundamental para realização de diagnósticos diferenciais que, em associação ao acompanhamento clínico e epidemiológico, ajudariam a entender melhor os padrões de morbidade dessas doenças (VEGA et al., 2019).

A detecção de patógenos e o tratamento adequado do paciente infectado dependem de um esforço mútuo entre sociedade, governo e comunidade científica. Esses esforços devem incluir a procura do serviço de saúde no início dos primeiros sintomas pelos pacientes suspeitos; profissionais de saúde bem treinados para diagnosticar as infecções; ações governamentais para vigilância e monitoramento dos vetores. Adicionalmente, torna-se fundamental a realização de pesquisas para desenvolvimento de ferramentas precisas de diagnóstico diferencial entre os arbovírus (ESTOFOLETE et al., 2018).

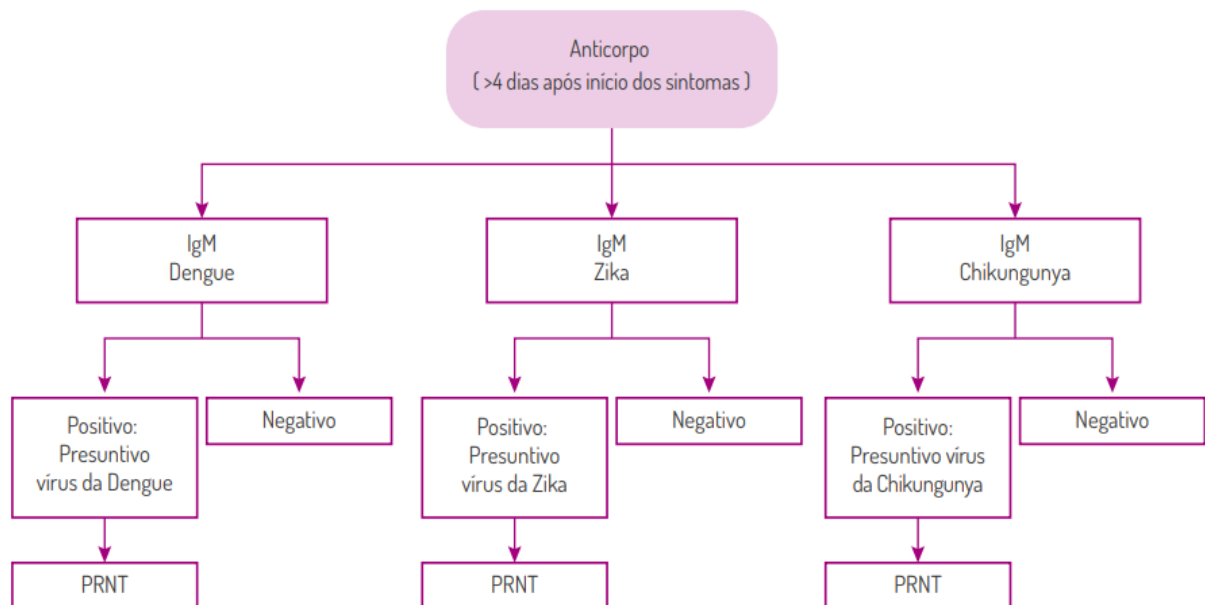
Dentre os principais métodos de diagnóstico de DENV, CHIKV e ZIKV, destaca-se a reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) por sondas *Taqman*, sendo a técnica mais rápida utilizada na rotina (Quadro 2). Ensaio imunoenzimático são também amplamente realizados (Quadro 3); contudo, devido ao baixo nível de imunoglobulina M (IgM) na infecção precoce e reatividade cruzada, esse exame não é aconselhado para ser usado na determinação de arbovírus em seus estágios iniciais. Por fim, o isolamento do vírus em células suscetíveis é o padrão ouro para sua detecção, porém não é um diagnóstico clínico comumente utilizado na rotina médica (WU et al., 2018). Recomenda-se a utilização de amostra de sangue (sorológicas) para realização dos exames laboratoriais, bem como amostras obtidas por métodos não invasivos (como urina e urina, por exemplo) (Quadro 4) (NIEDRIG et al., 2018).

Quadro 2 – Algoritmo de Teste para Detecção de Arbovírus por testes moleculares



Fonte: Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2016)

Quadro 3 – Algoritmo de Teste para Detecção de Arbovírus por ensaios imunoenzimáticos.



Testes tidos como positivos, duvidosos ou inconclusivos devem ser encaminhados para confirmação por testes de neutralização por redução de placas (PRNT), realizado um laboratório designado pelo CDC. Fonte: Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2016)

Quadro 4 – Orientações para coleta, rotulagem e conservação das amostras para diagnóstico laboratorial de DENV, CHIKV e ZIKV.

Arbovírus	Tipo de Diagnóstico	Tipo de Material	Procedimento de coleta	Armazenamento e conservação
DENV	Isolamento viral RT-PCR	Sangue	Coletar 2-5 mL de sangue de criança e 10 mL do adulto do 1º ao 4º dia da doença. Punção venosa.	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Transporte imediato: 4°C em 48h; após, manter a -70 °C.
	Sorológico	Sangue/ soro	Coletar 2-5 mL de sangue de criança e 10 mL do adulto entre o 6º ao 30º dia de início dos sintomas. Punção venosa.	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular o tubo com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Conservar em freezer a -20 °C.
CHIKV	Isolamento viral RT-PCR	Sangue/ soro	Coletar 2 mL de sangue do 1º ao 8º dia da doença (preferencialmente 5º. dia. Punção venosa	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Transporte imediato: 4°C em 48h; após, manter a -70 °C.
	Sorológico	Sangue/ soro	Coletar no mínimo 5 mL. Fase aguda: primeiros 8 dias de doença. Fase convalescente: entre 15 e 45 dias após início dos sintomas. Punção venosa	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular o tubo com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Conservar em freezer a -20 °C.
ZIKV	Isolamento viral RT-PCR	Sangue/ soro	Coletar cerca de 10 ml de sangue sem anticoagulante, de 3 a 5 dias após o início dos sintomas.	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Conservar em freezer a -20 ou -70°C até o envio para o laboratório.
		Urina	Coletar 10 ml até 8 dias após o início dos sintomas.	

ZIKV	Sorológico	Soro	Coletar cerca de 10 ml de sangue do adulto, sem anticoagulante, sendo a 1ª coleta 3 a 5 dias após o início dos sintomas e a 2ª coleta após 3 a 4 semanas.	Utilizar tubo plástico estéril. Rotular o tubo com o nome do paciente, data da coleta e tipo de amostra. Conservar em freezer a -20 °C.
------	------------	------	---	---

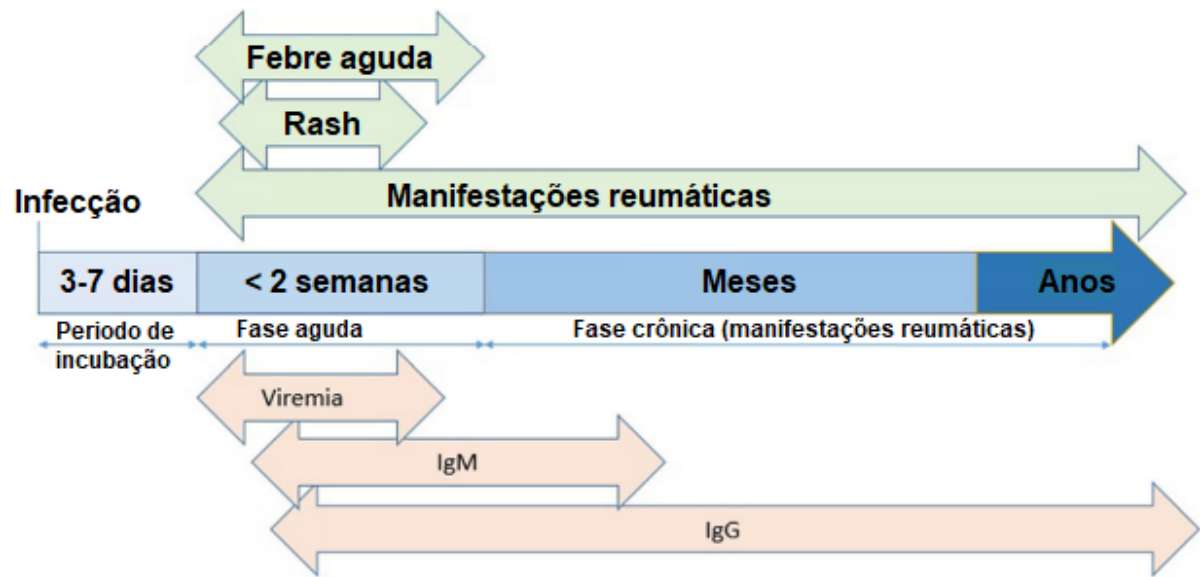
Fonte: Adaptado de BRASIL (2016b).

Desde 2002, o Brasil adota como critério para diagnóstico de DENV uma abordagem clínico-evolutiva. Esse método se baseia no reconhecimento de elementos clínico-laboratoriais e de condições associadas para a realização da conduta terapêutica, classificação de risco e manejo do paciente (BRASIL, 2013). Um caso suspeito ocorre quando o paciente, que vive em uma área endêmica, apresenta febre com duração máxima de 7 dias e pelo menos outras duas manifestações, como náuseas ou vômitos, erupção cutânea, dores, teste do laço positivo, leucopenia, sangramento e trombocitopenia (DIAZ-QUIJANO et al., 2018).

O diagnóstico diferencial de CHIKV é feito com outras doenças febris agudas associadas à artralgia. O clínico deve estar atento para causas potencialmente fatais e que exijam uma conduta medicamentosa específica imediata, como artrite séptica. O manejo do paciente com suspeita de CHIKV é diferenciado de acordo com a fase da doença em aguda, subaguda ou crônica (Figura 14). Grupos de risco: gestantes, maiores de 65 anos, menores de 2 anos e pacientes com comorbidades. Sinais de gravidade: acometimento neurológico, sinais de choque, dispnéia, dor torácica, vômitos persistentes e sangramentos de mucosas (BRASIL, 2015).

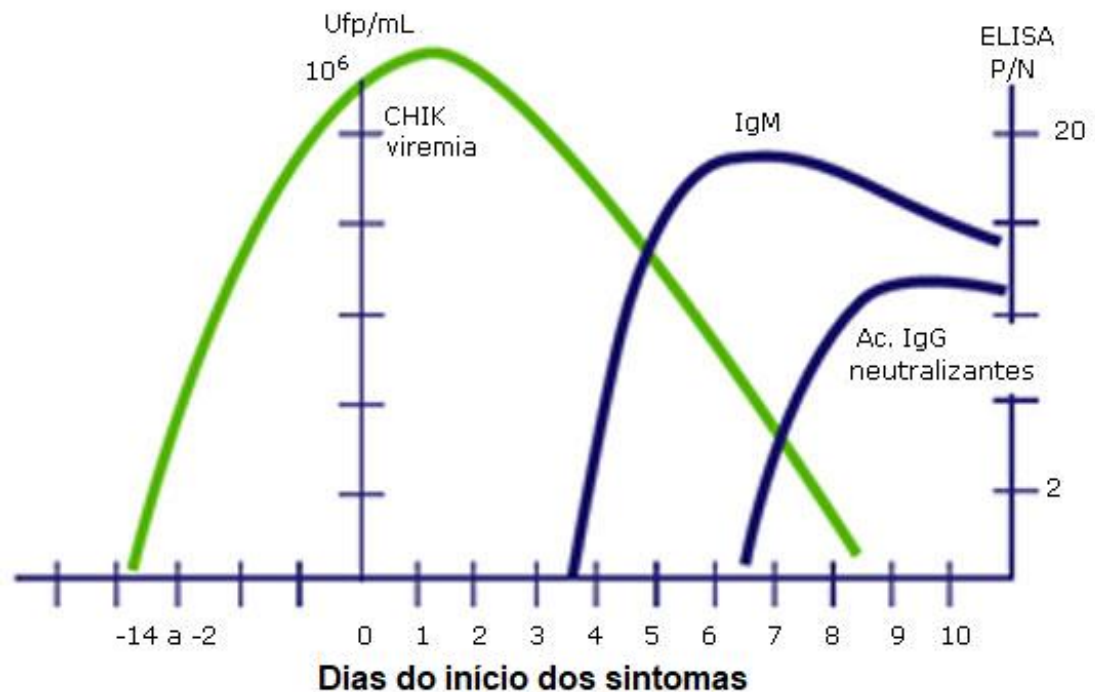
Devidos aos aspectos de replicação e viremia do CHIKV, para realização de detecção viral as amostras (sangue ou soro) devem ser coletadas até o 3º dia do início dos sintomas, enquanto que a análise imunológica deve ser realizada a partir do 4º dia do início dos sintomas (em soro ou plasma) (Figura 15) (BRASIL, 2014).

Figura 14 – Avaliação das manifestações clínicas da infecção pelo vírus Chikungunya.



Fonte: Adaptado de HUA; COMBE (2017).

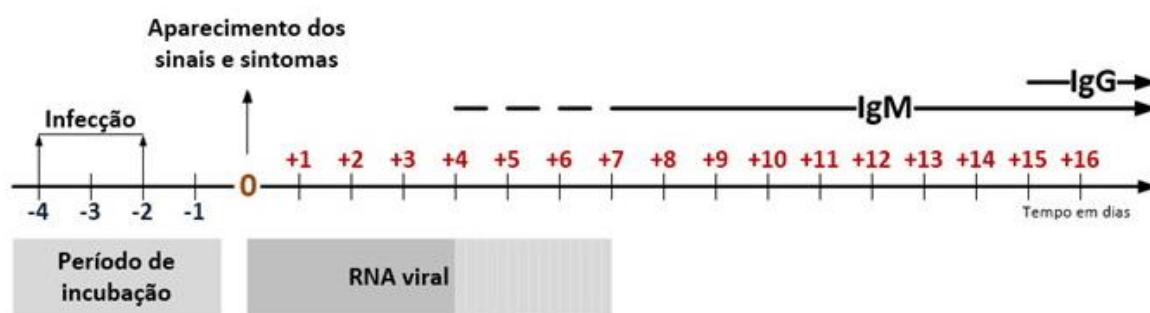
Figura 15 – Viremia e resposta imune seguida de infecção por vírus Chikungunya.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2014).

Paciente com suspeita de ZIKV deve se submeter tanto a testes moleculares para detecção de RNA viral como testes imunológicos para avaliação de IgM no soro. O período virêmico ainda não foi estabelecido, acreditando-se que seja curto o que permitirá a detecção direta do vírus até 4-7 dias após o início dos sintomas (Figura 16) (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016b). Se o soro e a urina do paciente forem positivos na avaliação molecular, considera-se infecção aguda pelo ZIKV mesmo que o resultado da IgM seja negativo. Se tanto o soro quanto a urina forem negativos e a IgM for positiva, um teste de neutralização por redução de placa (PRNT) deve ser realizado no paciente (AGUMADU; RAMPHUL, 2018).

Figura 16 – Esquema proposto para diagnóstico laboratorial do ZIKV por técnicas de isolamento, RT-PCR e sorologia (IgM/IgG).



Fonte: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (2016b)

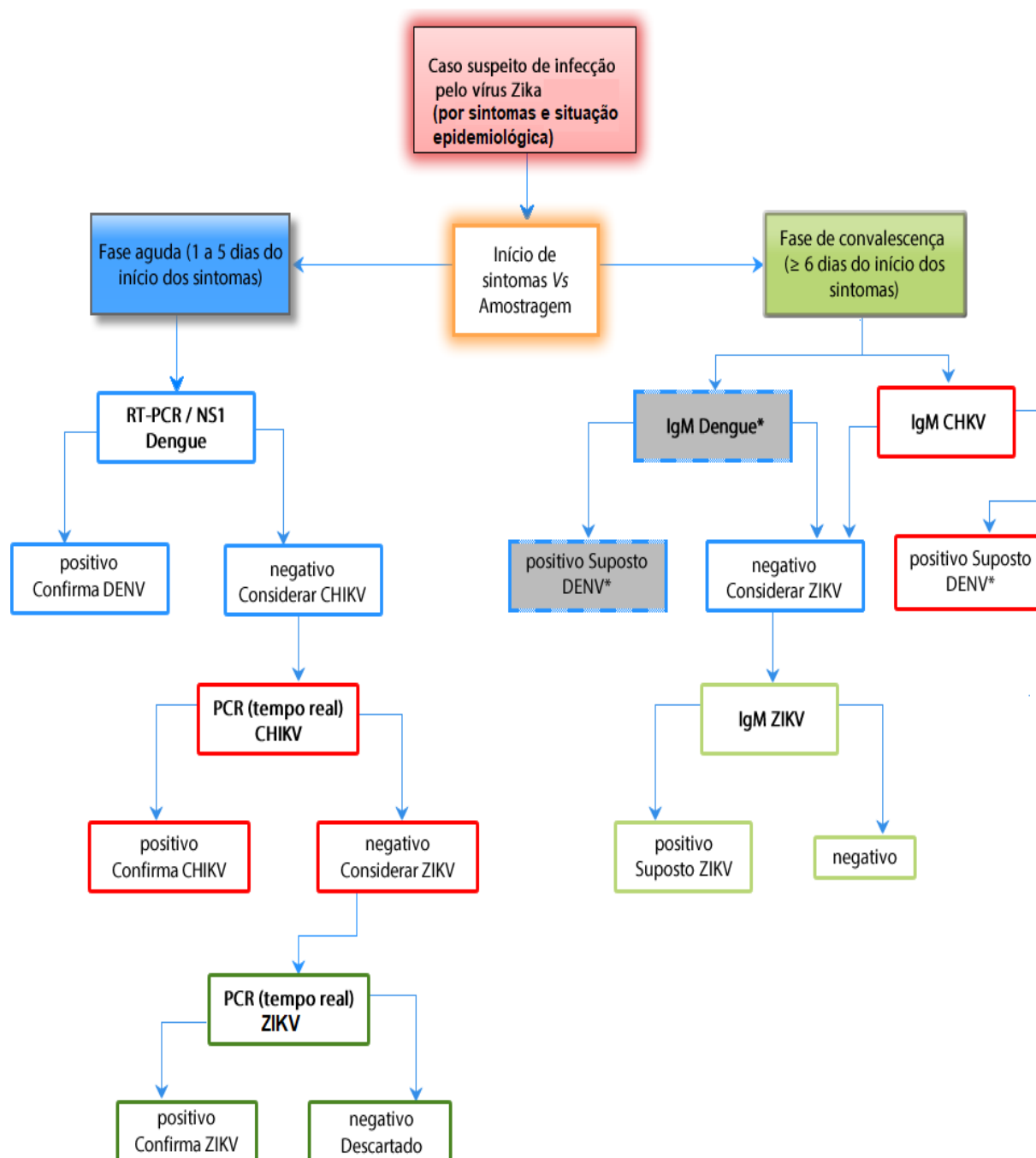
O diagnóstico da doença provocada pelo ZIKV é feito através de testes laboratoriais que permitam diferenciar entre as demais arboviroses, já que as manifestações clínicas produzidas são parecidas. Portanto, a Fundação Oswaldo Cruz, em parceria com o Ministério da Saúde do Brasil, elaborou um algoritmo para detecção molecular/antigênica e sorológica para DENV, CHIKV e ZIKV (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016b) (Quadro 5).

Mediante o cenário epidemiológico do Brasil e considerando a necessidade de ampliação de acesso a produtos de diagnósticos para DENV, CHIKV e ZIKV, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) concedeu em 2016 registros para cinco produtos de diagnóstico *in vitro* a tais agentes infecciosos. Os registros foram concedidos em tempo recorde, transcorrendo apenas 28 dias entre os pedidos de registro por parte das empresas e a concessão da autorização para produzir e comercializar os testes (ANVISA, 2016).

Ainda segundo a ANVISA, dentre os registros concedidos havia dois kits do tipo enzimático para determinação de anticorpos IgM (identificação da fase aguda da infecção) e anticorpos IgG (diagnóstico pós-infecção). Tais resultados podem ser prontamente obtidos, a depender da rotina do laboratório clínico e da qualidade da amostra clínica em questão. Ainda

foram registrados outros três kits que possibilitam a identificação viral por PCR através da determinação das sequências de material genético dos vírus nas amostras (Quadro 6).

Quadro 5 – Algoritmo para detecção do ZIKA vírus com diagnóstico diferencial à DENV e CHIKV.



* Ensaio de IgM para DenV pode resultar em pacientes infectados por ZIKV, em que uma vasta reatividade cruzada em áreas onde ocorrem co-circulação. Assim, a detecção molecular de amostras de fase aguda deve ser priorizada. Fonte: Adaptado de FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (2016b).

Quadro 6 – Kits comerciais aprovados pela ANVISA para o diagnóstico de Zika no Brasil em 2016.

Testes	Doenças identificadas	Fabricante	Período de Detecção	Método
Detecção de anticorpos (ELISA)				
IF: Mosaico Arbovírus 2 IgG	Zika / Chikungunya / Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)	Euroimmun	Fase aguda e período pós- infecção	Imunofluorescência Indireta (detecção dos anticorpos IgG)
IF: Mosaico Arbovírus 2 IgM	Zika / Chikungunya / Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)		Fase aguda da infecção	Imunofluorescência Indireta (detecção dos anticorpos IgM)
Ensaio de detecção do material genético (PCR)				
Bio Gene Zika Vírus PCR	Zika	Quibasa	Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em cadeia da polimerase (PCR) – Detecta o material genético do vírus
Bio Gene Dengue PCR	Dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4)		Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em cadeia da polimerase (PCR) – Detecta o material genético do vírus
Bio Gene Chikungunya PCR	Chikungunya		Fase em que o vírus está presente no organismo	Reação em cadeia da polimerase (PCR) – Detecta o material genético do vírus

IF: imunofluorescência. Fonte: Adaptado de ANVISA, 2016.

2.1.6 Novas ferramentas de diagnósticas das arboviroses

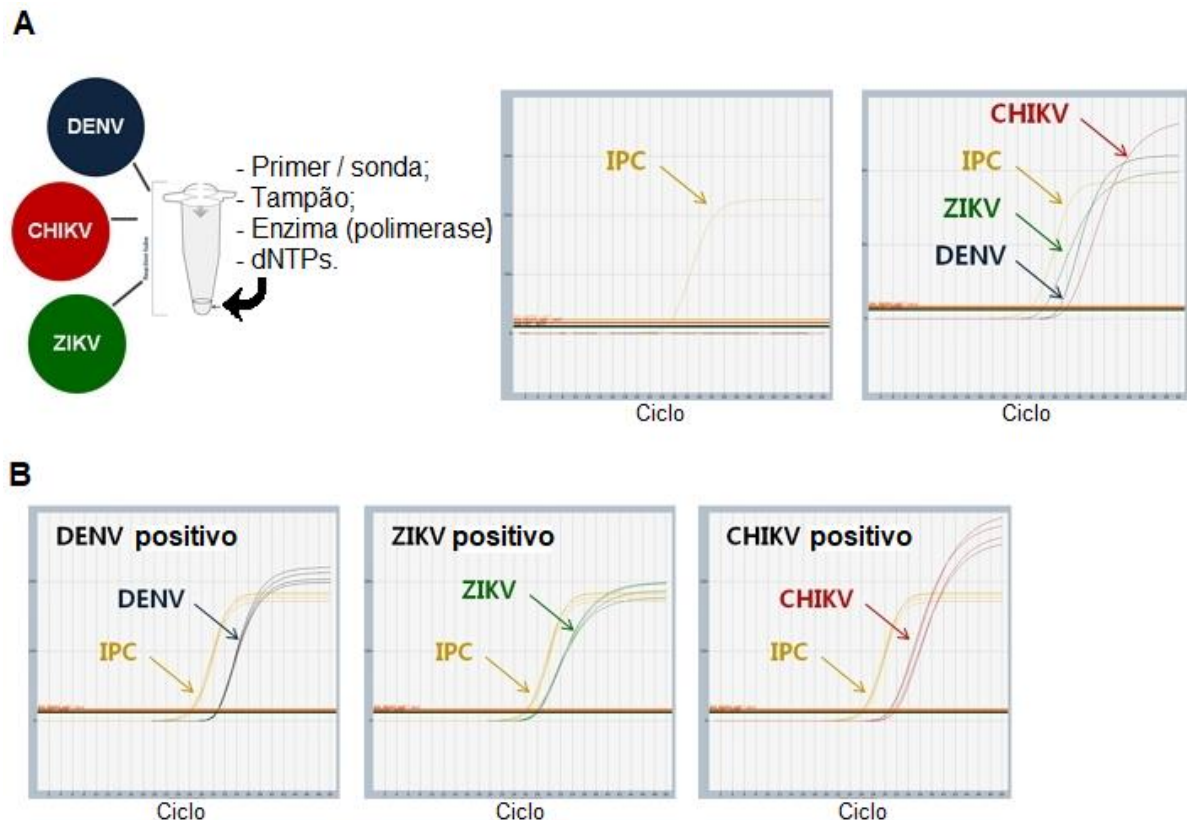
As infecções por ZIKV, DENV e CHIKV podem ser diagnosticadas por meio do isolamento viral, amplificação molecular ou imunoenaios para detecção de antígenos virais ou anticorpos IgM ou IgG específicos (LEON et al., 2019). Apesar da quantificação do material genético em soro ou plasma fornecer um diagnóstico definitivo, o curto período de viremia implica na realização do teste por até 10 dias após a infecção (LESSLER et al., 2016). Por outro lado, é comum observar reatividade cruzada na detecção de anticorpos específicos mediante o elevado grau de homologia estrutural entre as arboviroses (LESSLER et al., 2016).

O diagnóstico diferencial rápido nas fases iniciais de infecção por ZIKV, DENV e CHIKV seria uma ajuda considerável no manejo clínico da doença e vigilância epidemiológica (MANSUY et al., 2018). Em resposta a esse desafio, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) desenvolveram um ensaio *multiplex* de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real (RT-PCR) para o diagnóstico concomitante dessas arboviroses a partir da detecção de RNA viral em amostras de soro, sangue total e líquido cefalorraquidiano (LCR) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017; SANTIAGO et al., 2018).

Os ensaios *multiplex* para as arboviroses permitem a detecção simultânea de ácido nucléico de ZIKV, DENV e CHIKV. Trata-se de um diagnóstico rápido e sensível quando comparado a outras metodologias, podendo ser realizado utilizando diversos tipos de fluidos biológicos. Exibindo precisão, especificidade e alto desempenho, todos os reagentes são fornecidos em um único kit (MOBIUS, 2019). Por exemplo, o kit RT-PCR *Multiplex AccuPower®* ZIKV (DENV, CHIKV) possui todos os componentes necessários em uma mistura principal de RT-PCR (enzimas, tampão e dNTPs) alíquotada em cada tubo, tornando possível a detecção rápida e precisa de ZIKV, DENV e CHIKV (Figura 17) (BIONEER, 2016).

A partir disso, outros sistemas *multiplex* foram elaborados para analisar as co-infecções por DENV, CHIKV e ZIKV. LEON e colaboradores (2019) desenvolveram um novo ensaio que combina amplificações por RT-PCR e identificação de *amplicons* para as três arboviroses após hibridação com sondas tetratioladas em microplaca, com especificidade de 100% alcançada a partir da avaliação de 179 amostras biológicas previamente testadas por qPCR. Por outro lado, PABBARAJU e colaboradores (2016) desenvolveram e validaram um ensaio por RT-PCR para a detecção simultânea de DENV, CHIKV e ZIKV em um formato que pode ser facilmente implementado para testes de alto desempenho, utilizando um par de sonda e *primer* para cada vírus, obtendo resultados conclusivos em menos de uma hora de execução, tornando-o simples, rápido e econômico em comparação com outros ensaios disponíveis.

Figura 17 – Sistema *Multiplex* de detecção de RNA viral para DENV, CHIKV e ZIKV.



A) Detecção simultânea de DENV, CHIKV e ZIKV, sendo possível distinguir todos os vírus em um único tubo.
B) Resultados típicos em avaliações moleculares isoladas para cada um dos vírus. Fonte: adaptado de BIONEER (2016). dNTP = Desoxirribonucleotídeos Fosfatados; IPC = controle positivo interno (do inglês, *internal positive control*).

A doença causada pelo vírus da zika (ZIKV) surgiu como uma das maiores ameaças à saúde pública em todo o mundo, atraindo a atenção da mídia por ser um potencial fator ao desenvolvimento de microcefalia em recém-nascidos (BARBOSA et al., 2019). Trata-se de um vírus tropical pertencente à família dos flavivírus, geneticamente semelhante ao vírus da febre amarela, vírus da dengue (DENV) e vírus do Nilo Ocidental (BI et al., 2020; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). O ZIKV é transmitido principalmente por picadas de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, também podendo ser transmitido sexualmente na população humana (MUSSO et al., 2015).

A primeira ocorrência do ZIKV ocorreu no Uganda em 1947, seguida por epidemias relatadas na África Ocidental e na Ásia entre as décadas de 1960-80. Em seguida, o vírus foi transmitido para a ilha de Yap (2007), Polinésia Francesa (2013-2014), finalmente chegando ao Brasil entre 2015-2016 (KINDHAUSER et al., 2016). Até o momento, evidencia-se grande esforço na pesquisa e desenvolvimento de diagnóstico ao ZIKV, uma vez que inicialmente

essa infecção foi diagnosticada e tratada erroneamente como DENV e vírus chikungunya (CHIKV) devido à semelhança clínica e à reatividade cruzada causada pela sorologia (LI et al., 2020).

O diagnóstico de infecção por arboviroses é tipicamente realizado por métodos demorados e não apropriados para situações clínicas emergenciais (FAYE et al., 2013; ZHAO; FENG, 2018). Dentre eles se destaca o isolamento da carga viral, que requer mão de obra especializada, instalações e equipamentos onerosos e apresenta dificuldade de ser realizado em laboratórios com recursos limitados em países em desenvolvimento (XU et al., 2016).

Outra forma de detecção amplamente utilizado é por meio de ensaio imunológicos para investigação de IgM e IgG (ELISA). No entanto, esse método possui baixa especificidade devido à reação cruzada com outros arbovírus circulantes em uma mesma região (WANG et al., 2016). Ademais, o teste não é útil quando os títulos de anticorpos não são suficientemente altos (fase virêmica febril) (LOPEZ-JIMENA et al., 2018a; ZAMMARCHI et al., 2015)

As arboviroses, como o ZIKV, mostram um potencial de serem introduzidas em novas áreas e causar grandes epidemias. Como os testes de diagnósticos atuais são limitados (PARDEE et al., 2016), há uma necessidade crítica do desenvolvimento de outros métodos com elevada sensibilidade, rapidez, especificidade e de confiança para detecção desses vírus. Assim surge o diagnóstico molecular baseado na metodologia de amplificação isothermal LAMP-PCR, permitindo a realização da quantificação da carga genética das arboviroses sem a necessidade de um ambiente laboratorial de alto custo (WANG et al., 2016).

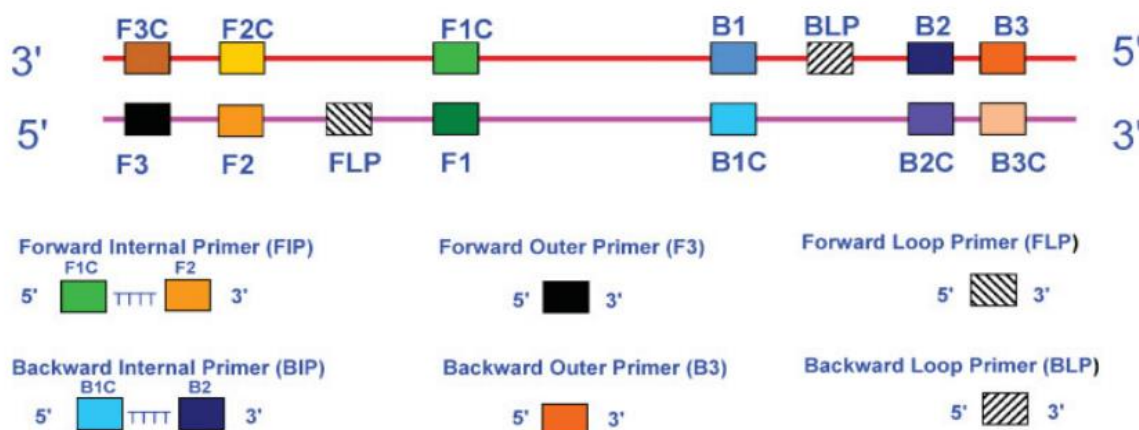
A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) tem o potencial de substituir métodos baseados em PCR devido a sua simplicidade, rapidez, especificidade, sensibilidade e custo-efetividade, já que nenhum equipamento especial é necessário (LOPEZ-JIMENA et al., 2018a). LAMP-PCR é uma técnica emergencial de detecção de ácido nucléico que foi relatada em 2000, conduzida por dois a três pares de *primers* que reconhecem seis regiões independentes no gene alvo. Esse método é realizado sem qualquer mudança de temperatura (isotérmico), o que normalmente exigia desnaturação, anelamento e extensão em protocolos convencionais de PCR (NEMOTO et al., 2010; ZHAO; FENG, 2018).

Quando o molde de amplificação é uma fita de RNA, além dos reagentes comuns a amplificação de DNA como *primers* iniciadores, polimerase Bst (oriundo do *Bacillus stearothermophilus*), substratos e tampão, se faz necessária a adição de uma etapa de transcrição reversa com auxílio da enzima transcriptase reversa. Após a mistura e a incubação

a uma temperatura constante entre 60 e 65 °C, a amplificação e a detecção podem ser realizadas em uma única etapa (MENDES et al., 2019; PARIDA et al., 2005).

A seleção de um conjunto de *primers* altamente sensível e específico é crucial para a amplificação da LAMP, sendo determinados a partir de ferramentas de bioinformática. O conjunto de *primers* para amplificação de LAMP reconhece oito regiões distintas na sequência alvo, sendo dois externos denominados *forward* (F3) e *background* (B3), responsáveis pelo deslocamento da fita durante a etapa não-cíclica; dois internos, classificados como *forward internal primer* (FIP) e *backward internal primer* (BIP), auxiliando a formação do loop; além de dois *primers* de loop (*forward loop primer* – FLP e *backward loop primer* – BLP) projetados para acelerar a reação de amplificação por ligação a locais adicionais que não são acessados por iniciadores internos (PARIDA et al., 2008). A representação esquemática do design de *primers* para LAMP-PCR pode ser observado na Figura 34.

Figura 18 – Representação esquemática do design do *primer* para LAMP-PCR, mostrando a posição dos seis *primers* abrangendo o gene alvo.



O projeto dos primers baseia-se nas oito regiões distintas do gene alvo: as regiões F3c, F2c, F1c e FLP no lado 3' e as regiões B1, B2, B3 e BLP no lado 5'. O FIP consiste na região F2 (na extremidade 3') que é complementar à região F2c e na mesma sequência como região F1c. O iniciador F3 é complementar à região F3c. Por outro lado, o BIP consiste na região B2 (na extremidade 3') complementar à região B2c e na mesma sequência que a região B1c na extremidade 5'. O iniciador B3 é complementar à região B3c. F3 = *forward*; B3 = *background*; FIP = *forward internal primer*; BIP = *backward internal primer*; FLP = *forward loop primer*; BLP = *backward loop primer*. Fonte: PARIDA et al., 2008.

A primeira etapa da LAMP-PCR, denominada não-cíclica, consiste na geração do DNA em loop com estrutura em forma de haltere em ambas as extremidades. Inicialmente, a polimerase Bst inicia a síntese de uma fita de DNA complementar a partir do FIP. F3 então desloca o cordão complementar vinculado ao FIP, que forma uma estrutura de loop em haste na extremidade 5'. Isto serve como um molde para a síntese de DNA iniciada por BIP e

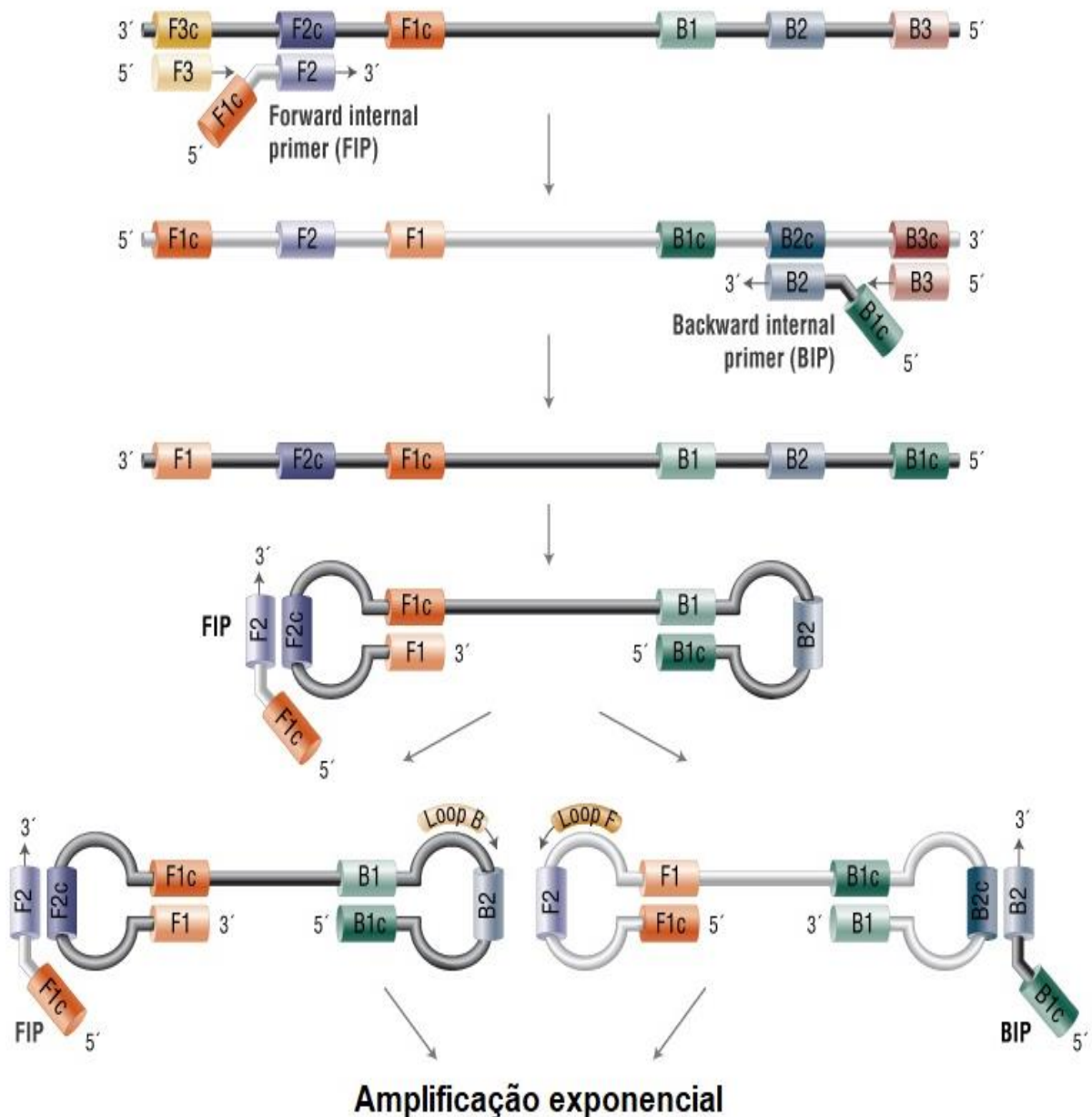
subsequente síntese de DNA a partir do deslocamento de fita iniciada em B3. A etapa cíclica promove a amplificação exponencial do DNA original em forma de haltere empregando os iniciadores internos. O produto são estruturas de tamanhos diferentes que consistem em repetições alternadas invertidas da sequência alvo na mesma fita (Figura 35) (PARIDA et al., 2008)

Como a LAMP-PCR pode prosseguir a temperatura constante com apenas um termostato como o único equipamento necessário, é um método ideal para uso no campo ou em situações sensíveis ao tempo (ZHAO; FENG, 2018). As reações podem ser visualizadas monitorando a turbidez em um fotômetro ou a fluorescência em um fluorímetro (LOPEZ-JIMENA et al., 2018a). Os ensaios LAMP-PCR podem ser realizados com modelos impuros, diminuindo os tempos de processamento da amostra. Devido ao seu baixo custo, simplicidade, conveniência, velocidade, sensibilidade e especificidade, tais ensaios têm sido amplamente utilizados para a detecção de DENV (LOPEZ-JIMENA et al., 2018a), CHIKV (LOPEZ-JIMENA et al., 2018b) e ZIKV (WANG et al., 2016; ZHAO; FENG, 2018).

A LAMP-PCR oferece uma alternativa para o diagnóstico convencional por PCR, desenvolvido com o intuito de poder detectar doenças em campo e locais de difícil acesso, principalmente em locais com epidemias emergenciais e de elevado impacto a saúde pública (COOK et al., 2015; HSIANG; GREENHOUSE; ROSENTHAL, 2014). Um exemplo foi o desenvolvimento do kit Loopamp™ MALARIA Pan / Pf para detecção da malária, desenvolvido na Europa e validado em um posto de saúde na Uganda (HOPKINS et al., 2013).

Destaca-se que a LAMP-PCR se tornou uma poderosa alternativa para detecção de diversos patógenos em amostras clínicas, como para *Bordetella pertussis*, cocobacilo gram-negativo causador da coqueluche; e matrizes alimentares, como o caso da *Salmonella* não tifoidal, patógeno zoonótico com grande preocupação em segurança de alimentos e rações em todo o mundo. Protocolos para detecção da *Bordetella pertussis* e *Salmonella* já foram padronizadas pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos – FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) (FDA, 2019).

Figura 19 – Designe do ensaio da LAMP-PCR.



A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP-PCR) utiliza 4-6 primers reconhecendo 6-8 regiões distintas de uma estrutura molecular, amplificada a uma temperatura constante de 60 a 65 °C. Uma DNA polimerase de deslocamento de cadeias inicia a síntese e 2 dos primers formam estruturas de loop para facilitar os ciclos subsequentes de amplificação. Devido à natureza específica da ação destes primers, a quantidade de DNA produzido em LAMP-PCR é consideravelmente maior do que a amplificação baseada em PCR. Adaptado de BIOLABS (2019).

Portanto, o desenvolvimento de tecnologias *point of care* para doenças emergentes é de extrema relevância no diagnóstico rápido de tais infecções, como o ZIKV, tornando possível garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes que residem em áreas de risco por iniciarem precocemente o tratamento específico a doença em questão. Dessa forma, foi

desenvolvido um novo teste rápido de diagnóstico à infecção causada pelo ZIKV por meio da tecnologia LAMP-PCR, tendo os dados publicados na revista *Scientific Reports*, volume sete, número 13.503, em 2017.

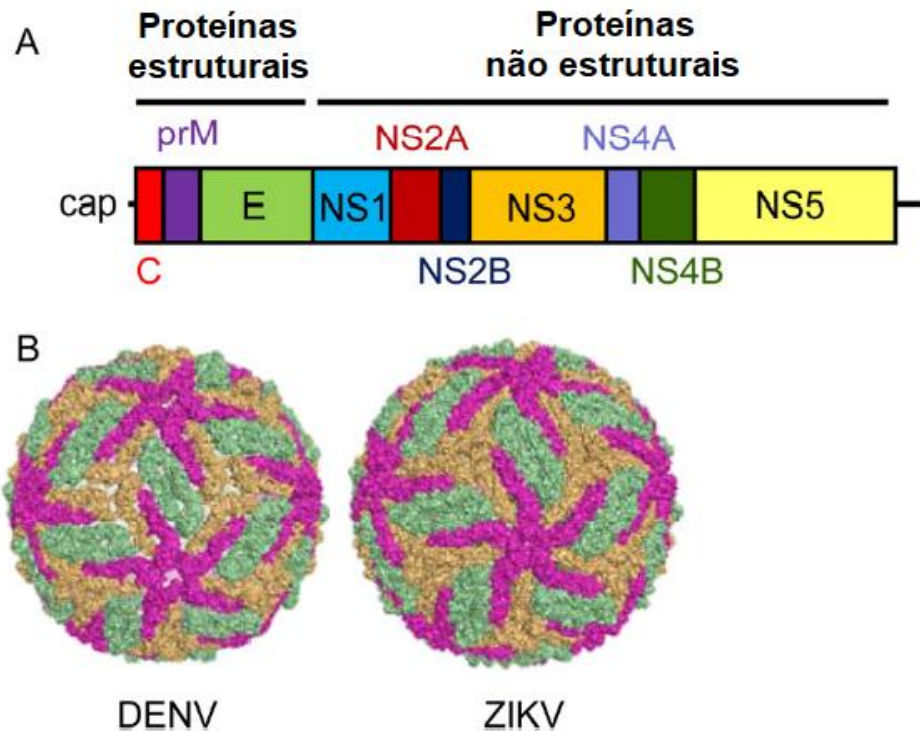
2.1.7 Infecções virais e alterações do metabolismo de lipídeos

A infecção viral é um processo complexo que inclui diversas etapas e interações de componentes virais com estruturas celulares do hospedeiro. A etapa de entrada celular é o primeiro evento do ciclo de infecção para os vírus envelopados, sendo um momento crítico devido à fusão do envelope viral com a membrana plasmática ou endossômica das células humanas. A composição lipídica das estruturas membranares parece desempenhar um papel importante no ciclo da infecção por arbovírus do gênero *Alphavirus* (SOUSA-JÚNIOR et al., 2017) e *Flavivirus* (OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018).

Para que haja sucesso no processo infeccioso, os flavivírus desenvolveram diferentes estratégias de replicação e evasão da resposta imune. Esses vírus são constituídos por uma variedade de proteínas não estruturais (NS2A, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 18) (MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016), que apresentam como alvo molecular proteínas da família de Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição (STATs). Como resultado dessa interação, ocorre a inibição de mediadores moleculares que visam suprimir a replicação viral, como o interferon (IFN) (MORRISON; AGUIRRE; FERNANDEZ-SESMA, 2012; OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018).

As proteínas virais não estruturais também permitem a inibição da resposta imune pela modificação das membranas do retículo endoplasmático para gerar compartimentos parcialmente isolados, conhecidos como complexos de replicação, onde as novas partículas virais são formadas e replicadas. Tais complexos são formados por moléculas que auxiliam no desenvolvimento de uma barreira que minimiza a detecção de RNA viral no citoplasma, como ácidos graxos, colesterol, glicerofosfolipídios, fosfolipídios e esfingolipídios (NEUFELDT et al., 2018). Esse mecanismo de evasão do sistema imune é comum para muitos vírus constituídos por RNA (OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018).

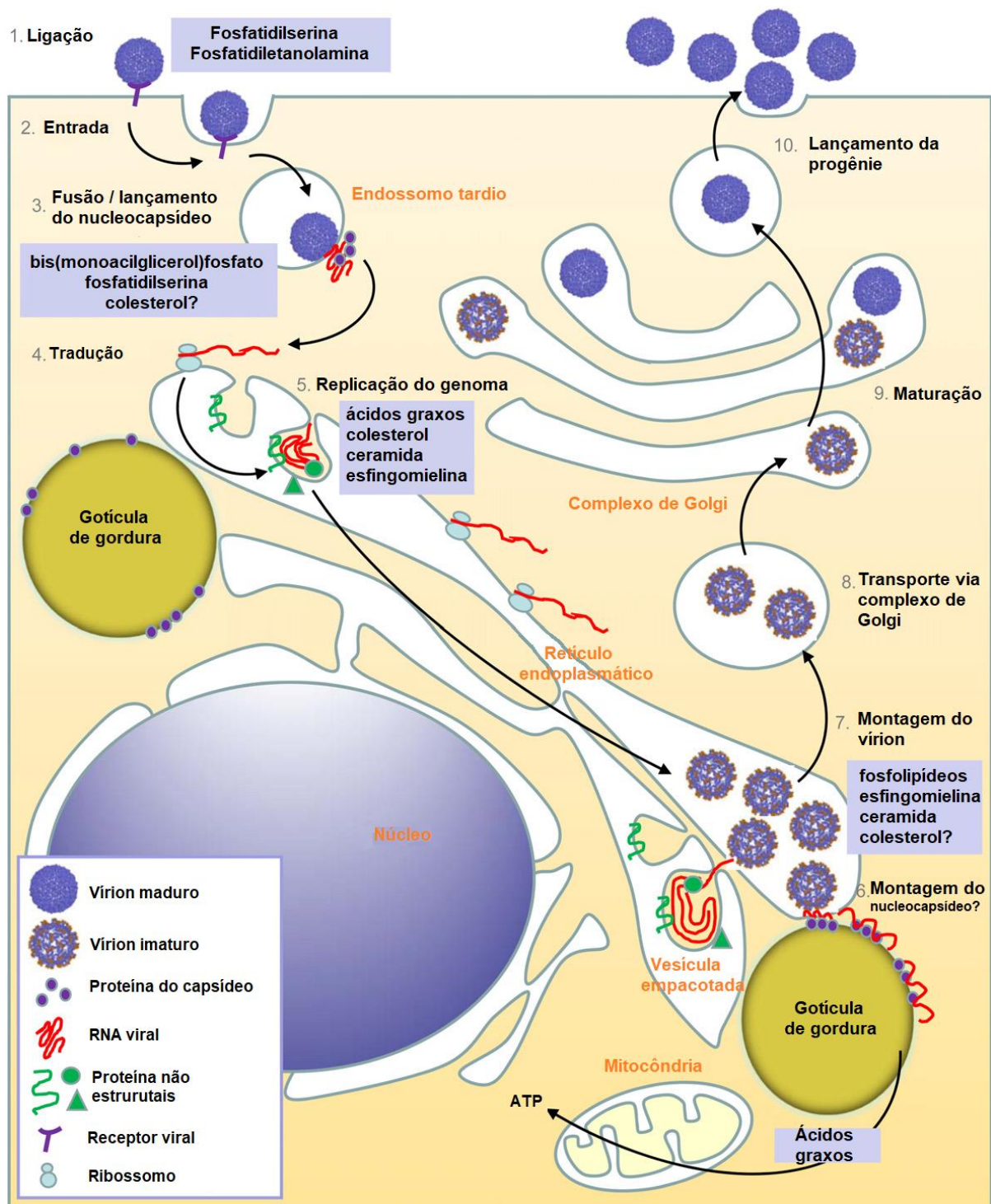
Figura 20 – Organização genômica dos flavivírus e estrutura do vírion.



A) Vista esquemática da molécula de RNA genômico de *Flavivirus*. Além das proteínas estruturais, o genoma também codifica sete proteínas não-estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que realizam diferentes funções dentro de células infectadas, permitindo a replicação adequada e montagem dos vírions. B) Representação de superfície de partículas maduras de DENV e ZIKV. C: capsídeo. prM: precursor da membrana. E: envelope viral. Fonte: Adaptado de MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ (2016).

Para iniciar o ciclo infeccioso, os vírus envelopados devem se ligar à superfície de suas células-alvo por meio de seus receptores específicos, o que induz a internalização da partícula viral na célula infectada via endocitose. Neste ponto, ocorre a fusão do envelope lipídico da partícula viral com a membrana dos endossomos celulares, permitindo sua posterior tradução e replicação. Aproximadamente 48 horas pós-infecção, ocorre um aumento dos níveis de colesterol em células de mamíferos infectadas por flavivírus (Figura 19) (MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ, 2016). O colesterol também auxilia na ligação dos alfavírus à membrana-alvo do hospedeiro (SOUSA-JÚNIOR et al., 2017).

Figura 21 – Desenho esquemático do ciclo de vida de um flavivírus.



Esquema representando a interação dos flavivírus durante a entrada da partícula viral na célula do hospedeiro, o processo de tradução e replicação, ciclo intracelular e egressão dos vírions da progênie através da via secretória. Fonte: Adaptado de MARTÍN-ACEBES; VÁZQUEZ-CALVO; SAIZ (2016).

O colesterol é um lipídio abundante em biomembranas de células eucariotas e é essencial para o funcionamento celular adequado (YANG et al., 2017). No caso do DENV, a elevação de colesterol durante o processo infeccioso ocorre por meio da proteína NS3, que induz a síntese de ácidos graxos no complexo de replicação. Dessa forma, ocorre o aumento

da captação dessa molécula via elevação do número de receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDLr) na superfície das células infectadas (SOTO-ACOSTA et al., 2013). Portanto, torna-se perceptível que o colesterol é essencial para o ciclo de replicação viral durante as primeiras horas de infecção, tanto para flavivírus (OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018) como alfavírus (SOUSA-JÚNIOR et al., 2017).

Por outro lado, existe uma estreita correlação entre os níveis de colesterol e a resposta do IFN tipo 1. Estudos indicam que altas concentrações de colesterol induzem uma resposta reduzida dos níveis de IFN (LIU et al., 2013). Assim, a redução dos níveis de colesterol durante a infecção por flavivírus pode conferir um aumento de IFN, e o uso de drogas que empobrecem o colesterol, como as estatinas, seria uma forma de oferecer tratamento aos pacientes infectados por flavivírus (OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018).

A apolipoproteína A-1 (Apo A-1), principal componente da lipoproteína de alta densidade (HDL), interage com partículas de DENV e facilita a entrada desse vírus em células do hospedeiro através dos receptores *scavenger* da classe B tipo I (SR-BI) (LI et al., 2013). Estas observações fornecem evidências sobre a importância funcional das lipoproteínas e da captação de colesterol através dos receptores de colesterol durante a infecção por DENV. Apesar do quanto se sabe sobre o papel do colesterol durante a infecção por DENV, sua importância durante a infecção por ZIKV ainda é pouco estudada (OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018) e em relação a chikungunya, não há relato evidenciados na literatura.

As últimas décadas foram marcadas pela necessidade da validação de moléculas e substâncias endógenas que contribuam para um melhor prognóstico das infecções em áreas tropicais (BARRIENTOS-ARENAS et al., 2018), garantindo o diagnóstico diferencial entre DENV, CHIKV e ZIKV nas regiões onde ocorre co-circulação dessas arboviroses. Destaca-se o papel do HDL dentre os biomarcadores por estar associado à progressão da infecção por DENV, influenciando a gravidade da doença mediante níveis reduzidos dessa lipoproteína (SUVARNA; RANE, 2009).

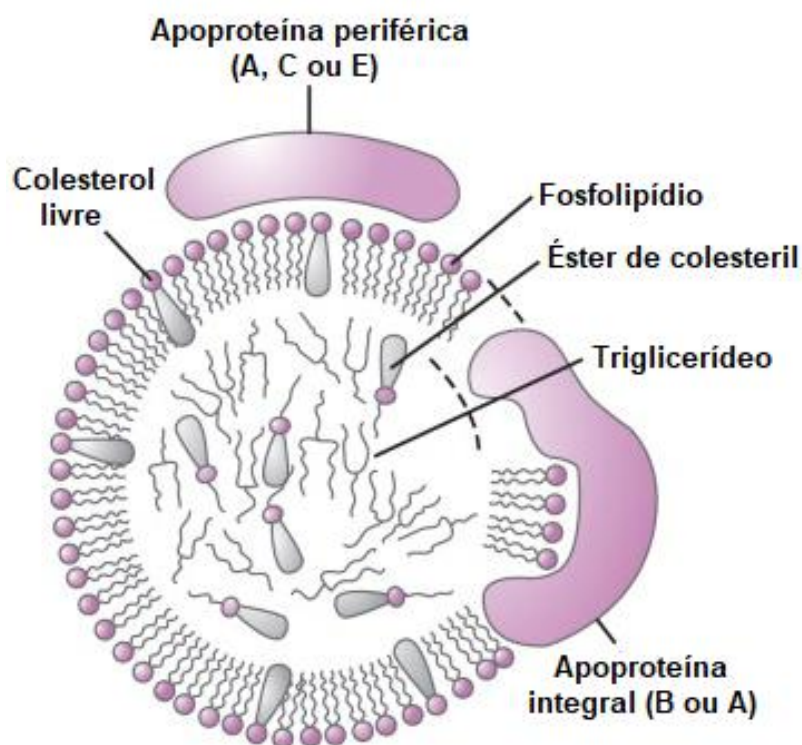
2.1.8 HDL e Lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT)

O metabolismo lipídico é fundamental para garantir a homeostase do corpo humano, sendo os ácidos graxos essenciais para geração de energia quando oxidados nos tecidos musculares ou reesterificados para armazenamento de triacilgliceróis (TG) nos tecidos adiposos (TRAJKOVSKA; TOPUZOVSKA, 2017). Por sua vez, o colesterol é responsável

pela manutenção da estrutura e fluidez da membrana celular, síntese de hormônios esteróides, conversão de ácidos biliares para auxiliar a digestão, além de permitir o tráfego de membranas intracelular (KRÁLOVÁ; KRÁL, 2019).

As lipoproteínas são partículas complexas responsáveis pelo transporte sistêmico de uma ampla variedade de lipídios no plasma. Apresentam estrutura básica formada por uma monocamada de fosfolipídios, colesterol livre e proteínas anfipáticas ao redor de um núcleo de ésteres de colesterol e triglicerídeos (Figura 20) (AFONSO; SPICKETT, 2019). Essas proteínas são denominadas apolipoproteínas (apo), sendo encarregadas pelo transporte de ésteres de TG, fosfolipídios, colesterol e colesterol entre os órgãos (FRANCESCHINI, 1996).

Figura 22 – Estrutura das lipoproteínas.



Fonte: Adaptado de AFONSO; SPICKETT, 2019.

As lipoproteínas são classificadas de acordo com seu tamanho e densidade, determinada pela proporção de proteína para lipídio em sua constituição. Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte de lipídios exógenos do intestino para os tecidos metabolizadores, como o fígado (AFONSO; SPICKETT, 2019). Já as lipoproteínas de baixa densidade (VLDL e LDL, contendo apoB) estão envolvidas na via de liberação lipídica do tecido hepático às demais células e tecidos do organismo (TRAJKOVSKA; TOPUZOVSKA, 2017). Por fim, as lipoproteínas HDL (contendo apoA-I) realizam o transporte reverso de

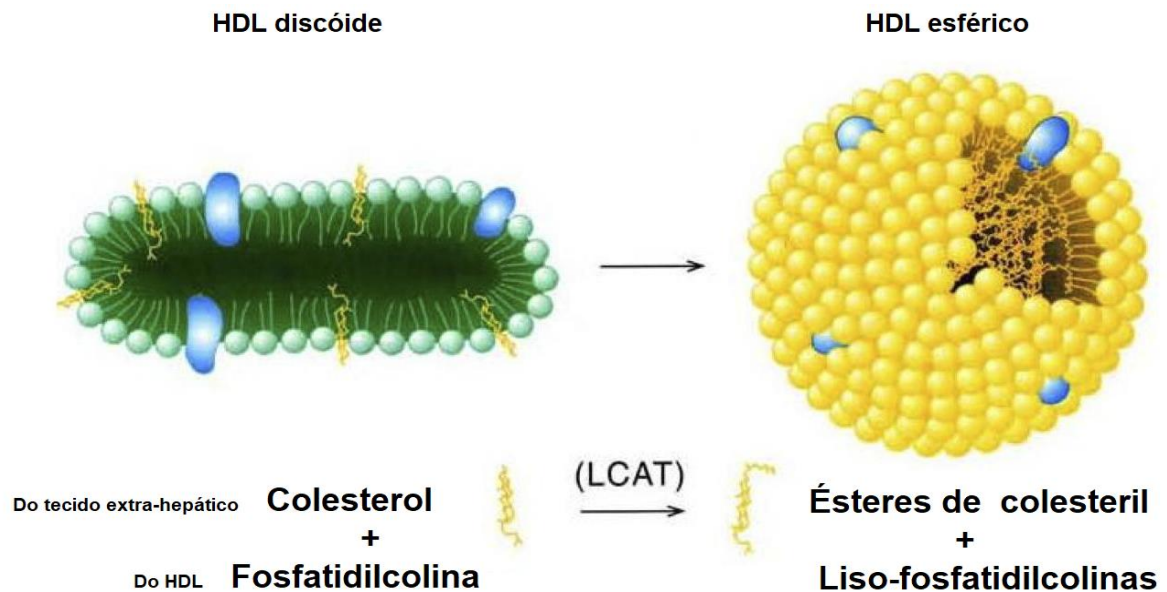
colesterol, processo de movimentação do colesterol dos tecidos extra-hepáticos de volta ao fígado para sua metabolização ou eliminação (VAN DER VELDE, 2010).

Sendo o HDL a única lipoproteína responsável pelo transporte reverso do colesterol, essa molécula é submetida a uma intensa regulação. Dentre os processos de regulação, observa-se o papel das proteínas transportadoras de cassetes de ligação ao ATP-G1(ABCA-1); a transferência de ésteres de colesterol entre as lipoproteínas; a depuração hepática via receptores SR-B1; além da influência da enzima lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) (MARÍN-PALMA et al., 2017).

Destaca-se o papel da LCAT como reguladora do HDL. Trata-se de uma enzima solúvel que converte colesterol e fosfatidilcolinas (lecitinas) em ésteres de colesterol e lisofosfatidilcolinas na superfície das lipoproteínas HDL no plasma, desempenhando um papel fundamental em sua maturação e remodelação (Figura 21). Após as modificações bioquímicas influenciadas pela LCAT, o colesterol apresenta uma forma mais eficiente para ser transportado e, quando direcionado ao fígado, pode ser redistribuído para outros tecidos ou removido do corpo (OSSOLI et al., 2019).

A enzima LCAT foi descoberta há quase um século a partir da investigação de diversos pesquisadores. Apesar dos experimentos realizados por Sperry em 1935 comprovarem que ocorria uma acentuada esterificação do colesterol livre quando o plasma humano era incubado a 37 °C (SPERRY; HOSPITAL, 1935), somente em 1962 Glomset identificou a enzima LCAT, responsável pela síntese da maioria dos ésteres de colesterol no plasma (GLOMSET, 1962). Quatro anos após a descoberta, foi confirmado o papel central da LCAT como força motriz da via de transporte reverso de colesterol (KUNNEN; VAN ECK, 2012).

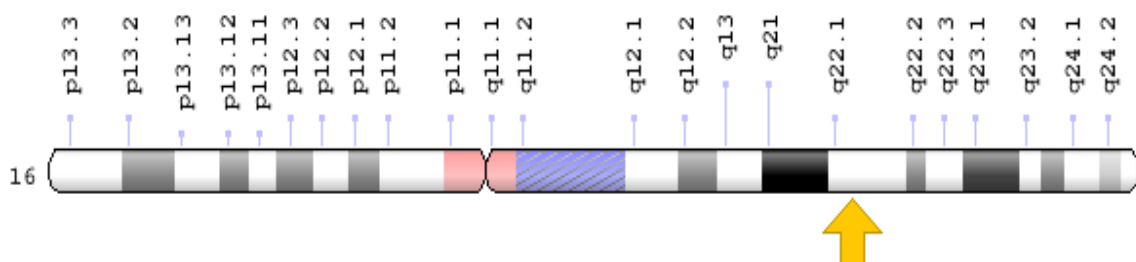
Figura 23 – Mecanismo de ação da enzima LCAT na esterificação do colesterol livre e maturação do HDL.



Fonte: Adaptado de UNIVERSITY OF ALBERTA, 2018.

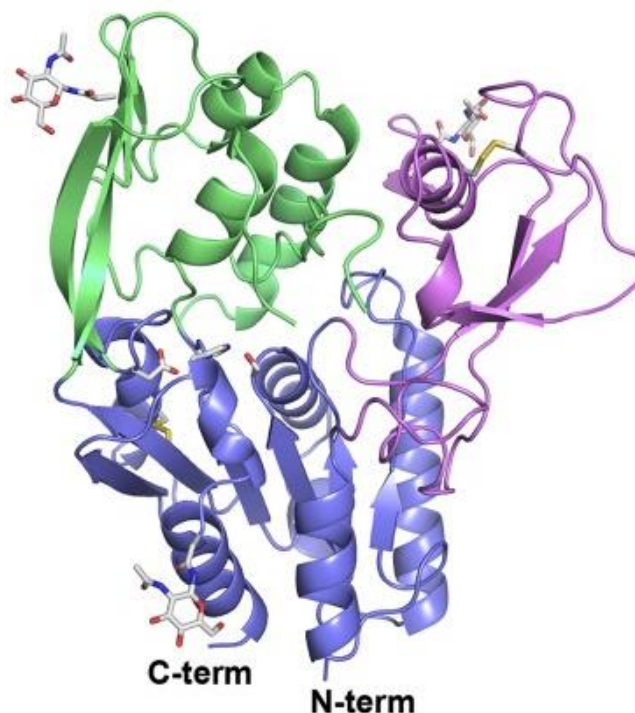
O gene LCAT humano está localizado na região q22.1 do cromossomo 16 (Figura 22), constituído por seis éxons e cinco íntrons com um total de 4,2 kb de extensão, sendo sequenciado e clonado pela primeira vez em 1986 (JONAS, 2000). O gene codifica uma cadeia polipeptídica com 416 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular aparente de aproximadamente 60 kDa (Figura 23), dos quais a maioria é constituída por nitrogênio (N) e somente 25% composta por carboidratos (KUNNEN; VAN ECK, 2012).

Figura 24 – Localização citogenética do gene LCAT.



Na seta em amarelo, a localização do gene LCAT na região 16q22.1 (braço longo (q) do cromossomo 16 na posição 22.1). Fonte: NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020.

Figura 25 – Estrutura da enzima LCAT.

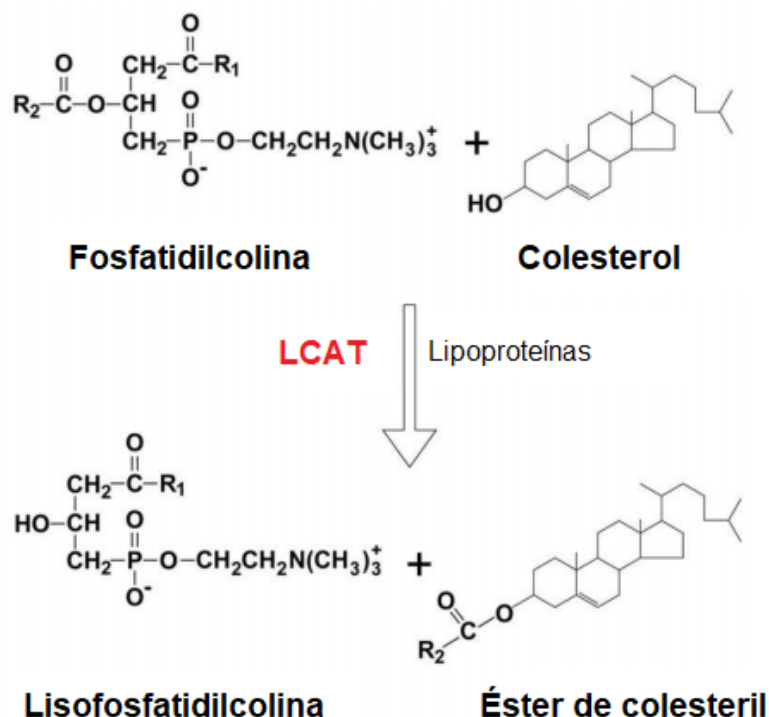


O domínio α/β hidrolase é demonstrado em azul, enquanto o subdomínio 1 é representado em violeta e o subdomínio 2 por verde. Os resíduos da tríade catalítica, os locais de carboidratos ligados ao N e as ligações dissulfeto da LCAT são destacados na representação. C-term = carboxi-terminal; N-term = amino-terminal. Fonte: Adaptado de PIPER et al., 2015.

Análises posteriores demonstraram que a enzima LCAT exibe uma massa molecular em torno de 47 kDa, apresentando uma massa adicional resultante da ligação de carboidratos a átomos nitrogênio dos aminoácidos Asn20, Asn84, Asn272 e Asn384 (PIPER et al., 2015). Tal glicosilação é essencial para promoção da atividade enzimática da LCAT, que apresenta duas funções principais, chamadas atividade α e β -LCAT. A atividade α -LCAT auxilia adicionar o colesterol ao HDL; no entanto, a β -LCAT anexa o colesterol a outras lipoproteínas não-HDL (VLDL e LDL) (NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2020).

A reação da enzima LCAT com o colesterol ocorre em duas etapas: após a ligação a uma lipoproteína, a LCAT cliva o ácido graxo na posição sn-2 da fosfatidilcolina e o transfere para um resíduo de serina. Em seguida, o ácido graxo é transesterificado no grupo 3- β -hidroxil no anel A do colesterol, produzindo lisofosfatidilcolina (lisolecitina) e, por conseqüente, éster de colesterol (Figura 24). Por ser mais hidrofóbico do que o colesterol livre, essas moléculas migram facilmente para o núcleo hidrofóbico das partículas de lipoproteínas (SAVEL et al., 2012; SOUPENE et al., 2016). Aproximadamente 75% da atividade plasmática da LCAT está associada ao HDL (SAVEL et al., 2012).

Figura 26 – Conversão do colesterol livre para colesterol esterificado por meio da enzima LCAT.

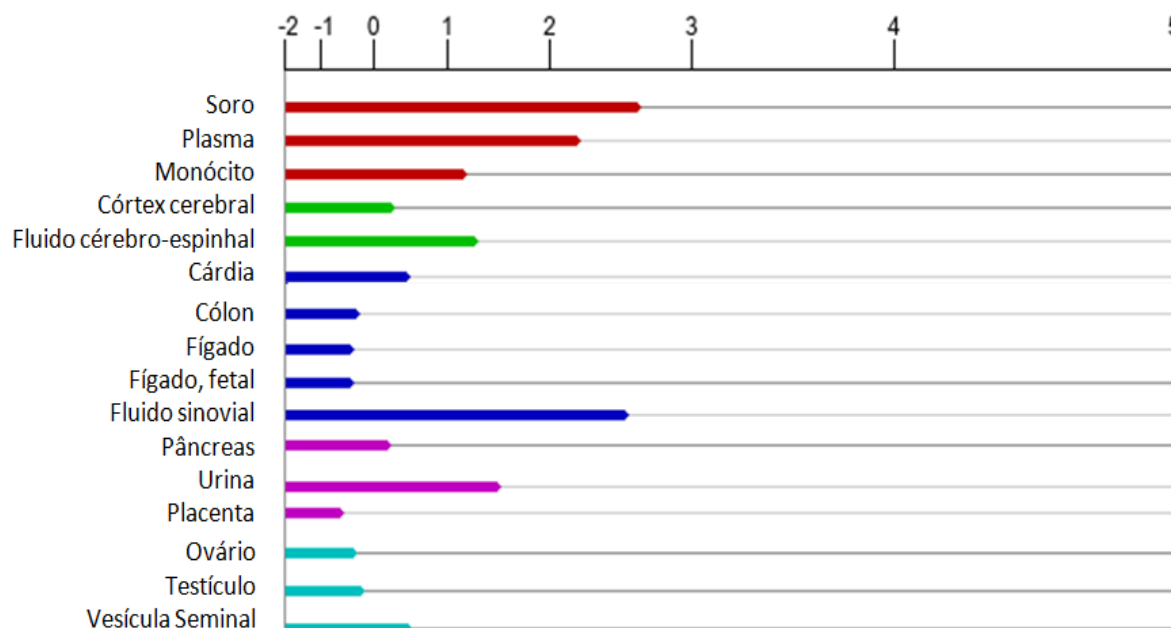


Fonte: Adaptado de CELL BIOLABS, 2016.

A enzima LCAT humana é sintetizada principalmente pelo fígado, embora também seja expressa em pequenas quantidades nos testículos e em astrócitos (Figura 25) (KUNNEN; VAN ECK, 2012). Apresenta concentração plasmática de aproximadamente seis $\mu\text{g/ml}$ com tempo de meia-vida estimada entre quatro a cinco dias (ALBERS et al., 1982; STOKKE et al., 1974). Ressalta-se que há uma significativa redução laboratorial de sua concentração após 48 horas da coleta ($-0,49 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) (OSSOLI et al., 2019); no entanto, exibe pouca variação entre humanos adultos quando analisados fatores como idade, sexo e tabagismo (ALBERS et al., 1982).

Apesar da importância na maturação do pré-HDL discoidal para esférico, mutações ou disfunção da enzima LCAT podem acarretar no desenvolvimento de algumas doenças, como deficiência familiar de LCAT (FLD, do inglês *familial LCAT deficiency*) e doença do olho de peixe (FED, do inglês *fish eye disease*). Na FLD, há perda completa da atividade enzimática α e β , promovendo o desenvolvimento de opacidade da córnea, presença de anemia hemolítica e doença renal crônica, enquanto a FED é caracterizada somente pela perda da atividade α , resultando na opacificação da córnea (FOUNTOULAKIS et al., 2019).

Figura 27 – Expressão proteica estimada da LCAT no corpo humano ($\log_{10}$).



Vermelho = Sangue e Sistema imune; Verde = Sistema nervoso; Azul = Órgãos internos; Lilás = Secreção; Azul claro = Sistema reprodutivo. Fonte: Adaptado de GENECARDS, 2020.

Vale ressaltar que indivíduos que apresentam deficiência na produção da LCAT apresentam susceptibilidade ao desenvolvimento de algumas doenças metabólicas devido ao acúmulo do colesterol não esterificado em alguns tecidos. Dentre as patologias, destacam-se o risco de doença cardiovascular aterosclerótica (YOKOYAMA et al., 2018), insuficiência renal crônica progressiva (MORALES et al., 2018), morte súbita na população em geral e aumento significativo do risco de diabetes *mellitus* na população masculina (TANAKA et al., 2018). MOYA e colaboradores (2012) observaram que atividade diminuída da LCAT reduz o transporte reverso de colesterol em pacientes com HIV diagnosticados recentemente, o que pode levar à aterosclerose futura.

Além de ser responsável pelo transporte reverso de colesterol, o HDL apresenta função antiinflamatória. Por consequência, a deficiência da enzima LCAT pode desencadear efeitos pró-inflamatórios mediante alteração qualitativa dessa lipoproteína (PETROPOULOU et al., 2015). Salienta-se que a própria resposta inflamatória durante a fase aguda nos seres humanos pode induzir remodelação seletiva do HDL com indução de lipases HDL específicas, supressão da atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e LCAT, resultando em alterações do metabolismo lipídico e homeostase do colesterol (MOYA et al., 2012).

Sabendo que as arboviroses podem provocar doenças que resultam na alteração do perfil das lipoproteínas, observa-se que a modulação de HDL na fisiopatologia das infecções

virais está principalmente correlacionada à ação da resposta imune inata (NAINGGOLAN et al., 2017). Alteração do nível de HDL durante os processos infecciosos está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e IFN. Níveis aumentados de TNF- α levam a redução dos níveis de HDL, afetando a enzima HMG-CoA redutase, com conseqüente redução da LCAT (LY et al., 1995; VYROUBAL et al., 2008).

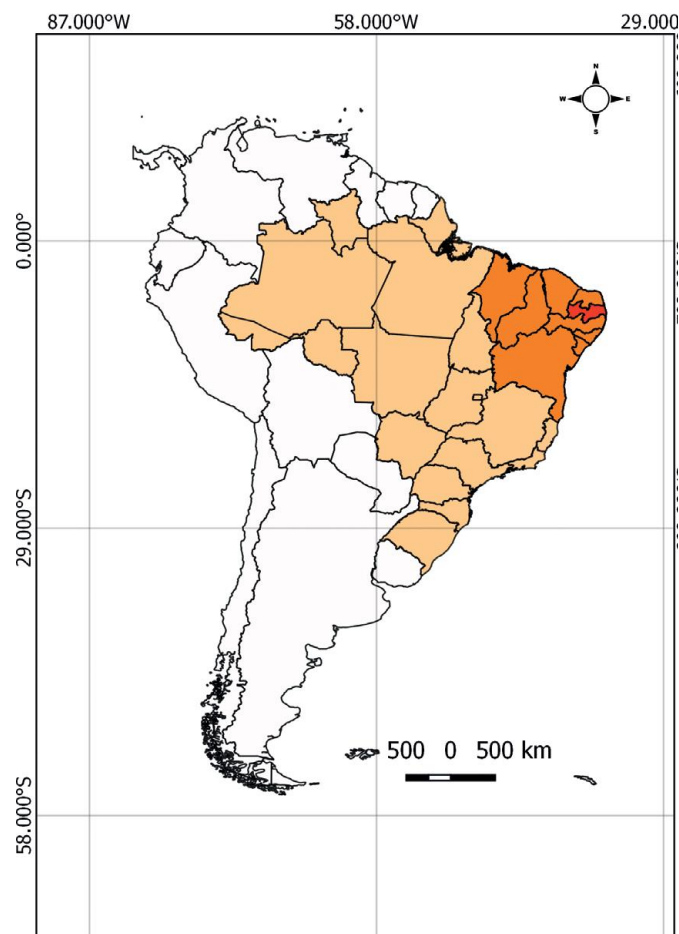
Portanto, a resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelas doenças arbovirais, como DENV, CHIKV e ZIKV, pode modular negativamente o metabolismo lipídico, desencadeando redução dos níveis de HDL e LCAT. Esse processo envolvendo dislipidemia pode ser crucial na piora da evolução clínica do paciente. Dessa forma, a compreensão do mecanismo de ação do sistema imunológico e do metabolismo lipídico frente às arboviroses é fundamental para o entendimento do metabolismo viral e seu impacto na qualidade de vida, evolução e possíveis efeitos de cronicidade sintomatológica ao paciente infectado.

3 METODOLOGIA

3.1 ÁREA DE ESTUDO

O Estado da Paraíba é uma das 27 unidades federativas do Brasil, localizada na Região Nordeste e composto por 223 municípios. Em relação aos limites geográficos, apresenta uma área territorial próxima a 56.467 km², sendo um dos menores estados do Brasil, com fronteiras ao norte com o Estado de Rio Grande do Norte; Pernambuco ao sul; Oceano Atlântico ao oeste; e Estado do Ceará ao Leste (MONTEIRO; PASTORE; MELO, 2018) (Figura 26). Com aproximadamente 4.018.127 pessoas, ocupa a oitava colocação em termos de densidade demográfica brasileira e apresenta uma das piores taxas de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) (0,658) (IBGE, 2019).

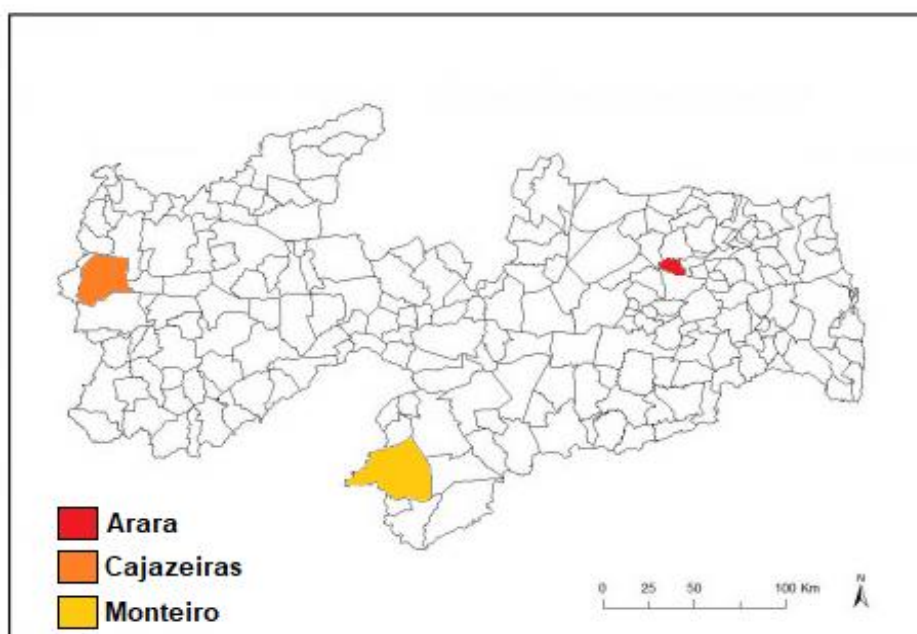
Figura 28 – Localização geográfica do Estado da Paraíba na região Nordeste do Brasil.



Fonte: Adaptado de MONTEIRO; PASTORE; DE MELO, 2018.

As amostras foram obtidas de três mesorregiões distintas do Estado da Paraíba: Arara (Agreste Paraibano), Cajazeiras (Sertão Paraibano) e Monteiro (Borborema), entre Março a Julho de 2016 (Figura 27). Segundo o Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* (LIRAA) (BRASIL, 2017b), Arara e Cajazeiras se encontravam em situação de risco para o *Aedes aegypti* em novembro de 2015, enquanto Monteiro apresentava situação de alerta para o mosquito no mesmo período. Salienta-se que as três cidades apresentavam situação de risco para o surto de dengue, chikungunya e zika em 2016, com casos de óbito por dengue em Monteiro e Cajazeiras e por chikungunya somente em Monteiro (BRASIL, 2016c)

Figura 29 – Localização dos municípios de Arara, Cajazeiras e Monteiro no Estado da Paraíba.



Fonte: Elaboração do autor (2020).

3.2 TIPO DE ESTUDO E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Trata-se de um estudo observacional transversal, no qual foram avaliados 141 indivíduos que viviam em áreas de risco para infecção por dengue, zika e chikungunya. Destes, foram incluídos somente 93 pacientes que apresentaram doença febril aguda com início dos primeiros sintomas apresentados no máximo 15 dias antes do atendimento clínico, independente do gênero, entre um e 88 anos de idade, contemplando gestantes. Os pacientes ou seus responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário sintomatológico desenvolvido pelo Laboratório de

Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Anexo A), aplicado por uma equipe multidisciplinar em saúde composta por médicos, enfermeiros, biólogos e biomédicos. A presente pesquisa apresenta aprovação do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde/UFPE (nº 1.815.581) (Anexo B).

Dentre as manifestações sintomatológicas auto-referido pelos pacientes e confirmado pela equipe multidisciplinar de saúde, foram registrados o acometimento dos principais sintomas comuns à fase aguda das arboviroses (Quadro 7). Posteriormente, foram avaliadas as variáveis biológicas (sexo e idade) e os principais sintomas desenvolvidos por pacientes com ZIKV, DENV e CHIKV, relacionando a intensidade das variáveis clínicas com a presença de co-infecções (DENV/ZIKV, DENV/ZIKV, ZIKV/CHIKV e DENV/ZIKV/CHIKV).

Quadro 7 – Variáveis clínicas e sintomatológicos avaliados nos pacientes que apresentaram doença febril aguda.

Variável	Definição	Categorização
Estomatite aftosa	Afta – pequena úlcera rasa na cavidade oral	Presente / Ausente
Rash cutâneo	Exantema – erupções cutâneas vermelhas em forma de placa em um região específica ou por todo o corpo	Presente / Ausente
Pirexia	Febre – elevação da temperatura corporal, sendo categorizada em dois tipos: febre alta (acima de 40°C) e febre constante (dias consecutivos)	Presente / Ausente
Mialgia	Dores e/ou desconforto muscular – variando de leve a intenso	Presente / Ausente
Cefaléia	Dor de cabeça – sensação dolorosa em qualquer parte da cabeça, desde aguda até incômoda	Presente / Ausente
Alterações visuais	Inflamação nos olhos, sendo contemplados pacientes com conjuntivite ou vermelhidão nos olhos	Presente / Ausente
Artralgia	Dor nas articulações – desconforto físico nas juntas, variando de leve a incapacitante.	Presente / Ausente

Edema	Inchaço – causado por excesso de líquido retido nos tecidos do corpo, em qualquer área	Presente / Ausente
Astenia	Fraqueza – perda ou diminuição da força física.	Presente / Ausente
Distúrbios gastrointestinais	Alterações do sistemas digestivo – contemplados tanto manifestações como êmese (vômito) e diarreia (acima de 3 evacuações/dia com fezes em estado aquoso)	Presente / Ausente
Eritemas	Vermelhidão da pele – independente se em uma área limitada ou por todo o corpo	Presente / Ausente
Parestesia	Sensação de formigamento – independente se temporária ou constante, em qualquer região corporal	Presente / Ausente
Hemorragia	Sangramento – Escape de sangue por um vaso sanguíneo rompido, para dentro ou fora do corpo	Presente / Ausente
Paralisia	Imobilidade – perda total ou parcial da função muscular, independente se temporária ou permanente	Presente / Ausente

3.3 AMOSTRAS CLÍNICAS

Amostra de sangue total foi coletada por punção venosa periférica, acondicionando 4 mL em tubo Vacuette® Z Serum Separator Clot Activator (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) para avaliação sorológica, enquanto 2 mL foram adicionados em um tubo Vacuette® EDTA (Greiner Bio-One), suplementado com 2 mL de RNA *later* (Thermo Fisher Scientific) para preservação da degradação do RNA durante o transporte para posterior avaliação molecular. Ambos os tubos foram submetidos à centrifugação por 3.500 rpm durante 10 minutos, sendo respectivamente soro e plasma fracionados em microtubos de 1,5 mL (Greiner Bio-One). As amostras foram processadas no Laboratório de

Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, sendo armazenadas a -80°.

3.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA viral foi extraído das amostras de plasma suplementado com RNA *later* (Thermo Fisher Scientific) por meio do Kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), seguindo as instruções informadas pelo fornecedor. Em seguida, 140 µL do plasma foi adicionado a um tubo de microcentrifuga contendo 560 µL do tampão AVL e 5,6 µL de *carrier RNA* visando, respectivamente, a lise da amostra por meio de uma elevada condição desnaturante e inibição de uma possível degradação do RNA viral devido a qualquer atividade residual de RNase, além de melhorar a ligação do RNA viral à membrana QIAamp, especialmente no caso de amostras de baixa titulação do material genético. As amostras foram misturadas por inversão por 15 segundos e então incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente.

Após o período de incubação, o tubo foi centrifugado brevemente por 10 segundos para posterior adição de 560 µL de etanol absoluto (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), sendo novamente misturadas por inversão por 15 segundos. Em seguida, 630 µL da solução foi transferida à coluna QIAamp fornecido pelo kit, submetido a uma centrifugação de 8.000 rpm por 1 min. Após descarte do tubo coletor contendo o filtrado, repetiu-se o procedimento com a solução remanescente. Por fim, a amostra foi submetida a duas etapas de lavagem para garantir a pureza do RNA viral, centrifugada por 14.000 rpm e, em um novo tubo de microcentrifuga, adicionou-se 60 µL do tampão de eluição. Após 1 min de incubação, as colunas QIAamp foram novamente centrifugadas à 8.000 rpm para obtenção das amostras eluídas, sendo então estocadas a -80°.

3.5 DETECÇÃO DE ANTICORPOS E RNA VIRAL

A detecção dos anticorpos monoespecíficos anti-IgG e anti-IgM para DENV, CHIKV e ZIKV foi realizado por meio de kits comerciais (Euroimmun, Germany) baseados em reações imunoenzimáticas (ELISA), utilizando as amostras de soro dos pacientes. Os kits Dengue IgG (EI 266b-9601 G) e Dengue IgM (EI 266b-9601 M) foram usados para determinação da DENV; para CHIKV, os kits Chikungunya IgG (EI 293a G) e Chikungunya IgM (EI 293a M); enquanto Zika vírus IgG (EI 2668 G) e Zika vírus IgM (EI 2668 M) para

detecção do ZIKV. Todos os kits apresentam registros aprovados pelo Ministério da Saúde (MS)/ANVISA (EUROIMMUN, 2019). A placa foi processada no Setor de Virologia – LIKA/UFPE, usando o sistema *Microplate Reader* (PR 3100 TSC, Bio Rad), com faixa de detecção de 450 nm.

O teste molecular para avaliação simultânea da infecção pelo vírus da dengue, zika e chikungunya foi realizado com o kit *multiplex Applied Biosystems™ TaqMan™ Arbovirus Triplex Assay* (ZIKV/DENV/CHIKV) (Thermo Fisher Scientific). O kit contém os *primers* e sondas TaqMan® dos respectivos arbovírus em um ambiente liofilizado, além de um gene controle endógeno humano PPIA (Ciclofilina A), responsável por monitorar a recuperação de ácidos nucleicos, servindo como controle para o RT-PCR. A reconstituição dos reagentes foi realizada após a adição de 25 µL da amostra de RNA. A detecção da amplificação foi realizada através do sistema ViiA 7 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific), utilizando os espectros de emissão de fluorescência dos corantes FAM, VIC, ABY e JUN para determinação de ZIKV, DENV, CHIKV e PPIA, respectivamente.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE LCAT

A concentração da lecitina colesterol acil-transferase (LCAT) foi mensurada por meio do kit LCAT ELISA (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, STA-616), utilizando as amostras plasmáticas dos pacientes. O kit se baseia em um método colorimétrico enzimático competitivo (ELISA), desenvolvido para a detecção e quantificação da proteína LCAT de fluidos biológicos. Antes de executar o ensaio, as amostras foram diluídas 10 vezes em PBS contendo 0,1% de soro fetal bovino e a placa foi revestida com anticorpo LCAT e incubada a 37°C por 2 horas.

Em seguida, 55 µL da amostra foi adicionada em 55 µL do Conjugado biotina-LCAT diluído com o diluente de ensaio (1:1000), para posterior transferência de 100 µL da mistura para cada poço da placa. Após consecutivas etapas de lavagens, os poços foram esvaziados e secados com papel absorvente visando remover o excesso de tampão de lavagem. 100 µL do conjugado de enzima Estreptavidina diluído foram adicionados a cada poço para posterior incubação a temperatura ambiente por 1 hora em agitação orbital. Prosseguiram-se mais etapas de lavagem para finalmente serem adicionados 100 µL de Solução de Substrato a cada poço, incubando a placa a temperatura ambiente em agitação orbital por 30 minutos.

A reação enzimática foi interrompida adicionando 100 µL de Solução de Parada em cada poço. A placa foi processada usando o sistema *Microplate Reader* (PR 3100 TSC, Bio

Rad), com faixa de detecção de 450 nm. Após a determinação dos níveis de LCAT dos pacientes, avaliou-se a correção da atividade enzimática com a intensidade das variáveis clínicas e sintomatológicas dos pacientes que apresentaram doença febril aguda com suspeita de infecção por ZIKV, DENV e/ou CHIKV.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, CA). O teste-t de Student foi utilizado para comparações dos parâmetros com distribuição normalizada em amostras independentes, visando à avaliação dos níveis plasmáticos da enzima LCAT em indivíduos com sorologia positiva a DENV, CHIKV e ZIKV em comparação aos pacientes com sorologia negativa. O teste não-paramétrico Mann–Whitney foi utilizado para avaliação das variáveis sintomatológicas e sua correlação com os níveis de LCAT devido à reduzida amostragem e pela variável numérica não se apresentar em normalidade. O teste exato de Fisher foi selecionado para avaliação da significância estatística utilizando tabelas de contingência e o teste ANOVA One-Way foi executado para comparação de dados contendo três ou mais variáveis. A avaliação da hipótese foi determinada considerando o valor de $p < 0,05$ para significância estatística.

4 RESULTADOS

Dentre os 141 indivíduos que viviam em áreas de risco para dengue, zika e chikungunya, 93 apresentaram estado febril agudo ou desenvolveram algum dos sintomas característicos de infecção por arboviroses quinze dias antes do atendimento clínico, sendo avaliados 81 mulheres e 12 homens, com idade variando entre um e 88 anos. Por meio da detecção de anticorpos IgM e/ou IgG, estes pacientes foram diagnosticados por pelo menos uma das três infecções (Tabela 2).

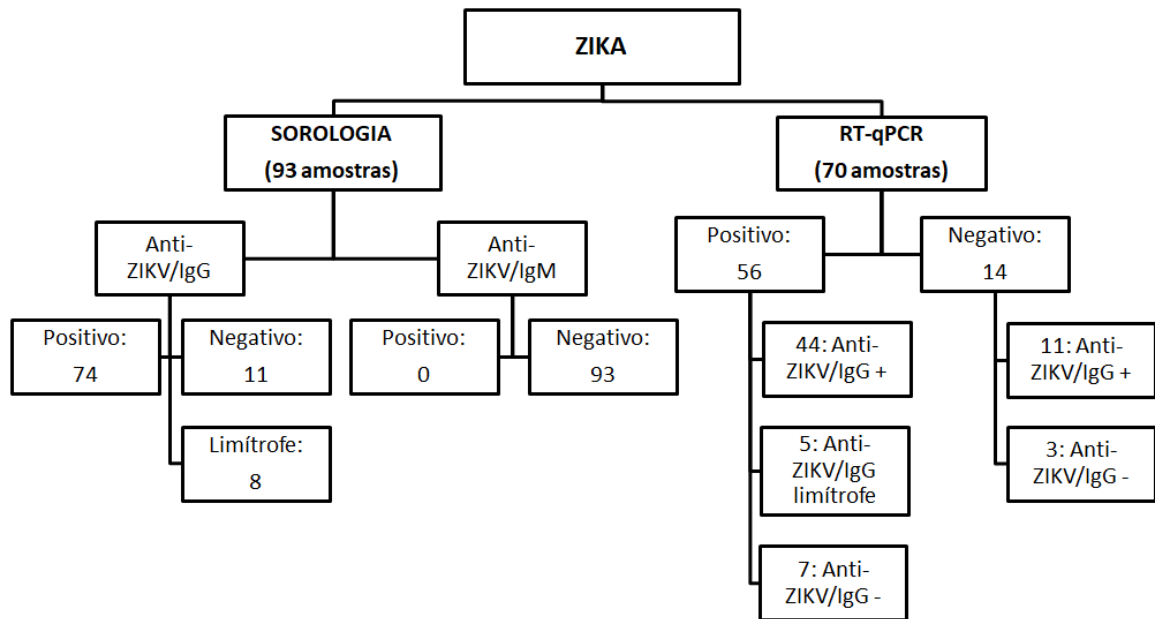
Tabela 2 – Dados biológicos dos pacientes diagnosticados ao ZIKV, DENV e CHIKV por meio da detecção de anticorpos IgM e IgG (sorologia).

	Mulheres				Homens			
	Total	Idade		Med	Total	Idade		Med
		Mín	Máx			Mín	Máx	
Anti-ZIKV/IgM	0	-	-	-	0	-	-	-
Anti-ZIKV/IgG	66	13	88	45	8	1	74	32
Anti-DENV/IgM	1	NI	NI	-	0	-	-	-
Anti-DENV/IgG	77	6	88	42,5	10	1	74	35
Anti-CHIKV/IgM	69	6	88	45	12	1	74	32
Anti-CHIKV/IgG	0	-	-	-	0	-	-	-

Mín = Idade mínima; Máx = Idade máxima; Med = mediana; NI = não informado.

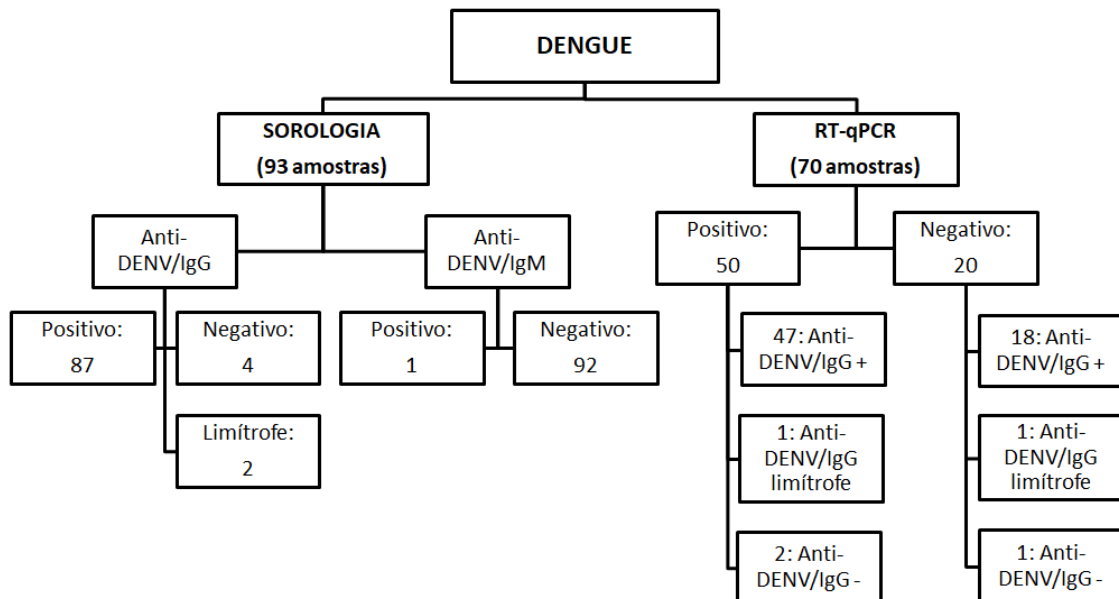
Por meio da detecção da carga viral após RT-PCR foi possível observar que, dos 93 indivíduos incluídos na pesquisa, 70 pacientes apresentaram qualidade suficiente para análise molecular por apresentarem amplificação ao gene de referência PPIA. Destes, 56 apresentaram detecção de RNA viral para ZIKV, sendo 52 mulheres e quatro homens com idade mediana entre 42 e 27 anos, respectivamente; 50 exibiram detecção de RNA viral ao DENV, sendo 46 indivíduos do sexo feminino e quatro do masculino, com idade mediana de 39 e 35 anos, respectivamente; enquanto para CHIKV somente 13 amostras exibiram carga viral detectável, das quais 11 mulheres (idade mediana = 38) e dois homens (idade mediana = 45). O algoritmo de avaliação do diagnóstico convencional a partir de ELISA e RT-PCR para os vírus da zika, dengue e chikungunya podem ser observados nos quadros 8, 9 e 10, respectivamente.

Quadro 8 – Algoritmo de avaliação da determinação de anticorpos e detecção de RNA viral para o ZIKV.



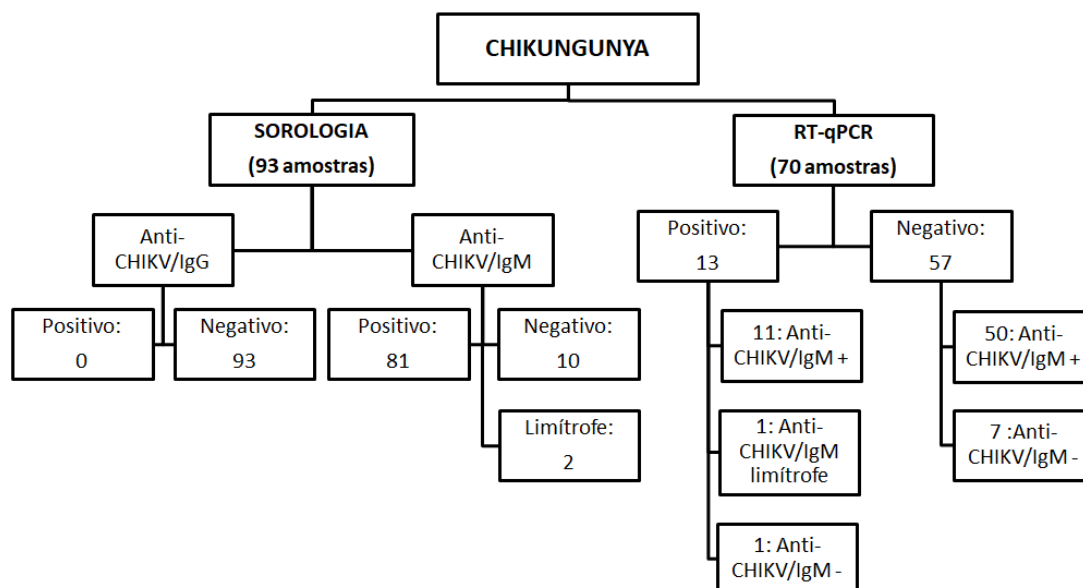
IgG: Imunoglobulina-G; IgM: Imunoglobulina-M; +: positivo; -: negativo.

Quadro 9 – Algoritmo de avaliação da determinação de anticorpos e detecção de RNA viral para o DENV.



IgG: Imunoglobulina-G; IgM: Imunoglobulina-M; +: positivo; -: negativo.

Quadro 10 – Algoritmo de avaliação da determinação de anticorpos e detecção de RNA viral para o CHIKV.



IgG: Imunoglobulina-G; IgM: Imunoglobulina-M; +: positivo; -: negativo.

Após a observação da detecção dos anticorpos anti-IgG e anti-IgM e quantificação do RNA viral, foram avaliadas as variáveis sintomatológicas desenvolvidos pelos pacientes. Os sintomas apresentados pelos pacientes positivos foram comparados com os sintomas dos indivíduos negativos para a mesma arbovirose em questão, levando em consideração a presença ou ausência do sinal ou sintoma.

A principal manifestação dos pacientes com ZIKV a partir da detecção do material genético por RT-PCR foi febre alta ($p=0,015$), enquanto pacientes com DENV exibiram maiores taxas de cefaléia ($p=0,047$). Ambos os grupos apresentaram em comum incidência do desenvolvimento de artralgia ($p=0,04$ e $p=0,021$ para ZIKV e DENV, respectivamente), o que não foi evidenciado nos pacientes com CHIKV. As variáveis sintomatológicas das arboviroses não divergiram quando avaliadas pelas metodologias padrão de diagnóstico a partir da detecção de anticorpos e quantificação da carga viral. Os resultados podem ser observados nas tabelas 2, 3 e 4 para o vírus da zika, dengue e chikungunya, respectivamente.

A avaliação do processo de co-infecção por DENV, ZIKV e CHIKV a partir da detecção do RNA viral em detrimento às variáveis sintomatológicas podem ser observados na tabela 5. Foram diagnosticados 42 pacientes com co-infecção ao DENV e ZIKV, apresentando como sintomas predominantes febre alta, cefaléia, alterações visuais e artralgia. A associação de DENV com CHIKV foi detectado em 11 indivíduos, exibindo a mialgia

como o principal sintoma decorrente à co-infecção; 11 indivíduos também demonstraram dupla infecção por ZIKV e CHIKV, evoluindo como sintoma a febre constante. Finalmente, nove amostras foram confirmadas para a tríplice infecção (dengue, zika e chikungunya), evidenciando a artralgia como principal variável sintomatológica.

Tabela 3 – Avaliação das variáveis sintomatológicas características de infecções por arboviroses em pacientes diagnosticados para o ZIKV por meio da detecção de anticorpos IgG e quantificação do RNA viral.

		Detecção de IgG		Valor de <i>p</i>	OR (95% IC)	Detecção de RNA viral		Valor de <i>p</i>	OR (95% IC)
		Pos. (%)	Neg. (%)			Pos. (%)	Neg. (%)		
Afta	Presente	17 (22,97)	6 (31,58)	0,551	0,646 (0,213 - 1,959)	16 (28,57)	2 (14,29)	0,494	2,400 (0,481 - 11,96)
	Ausente	57 (77,03)	13 (68,42)			40 (71,43)	12 (85,71)		
Rash cutâneo	Presente	35 (47,30)	11 (57,89)	0,450	0,652 (0,235 - 1,808)	26 (46,43)	7 (50,00)	1,00	0,866 (0,268 - 2,799)
	Ausente	39 (52,70)	8 (42,11)			30 (53,57)	7 (50,00)		
Febre alta	Presente	55 (74,32)	15 (78,95)	0,773	0,771 (0,227 - 2,616)	39 (69,64)	14 (100,0)	0,015	0,077 (0,004 - 1,380)
	Ausente	19 (25,68)	4 (21,05)			17 (30,56)	0 (0,00)		
Febre constante	Presente	19 (26,68)	7 (36,84)	0,393	0,592 (0,203 - 1,724)	15 (26,79)	3 (21,43)	1,00	1,341 (0,328- 5,480)
	Ausente	55 (74,32)	12 (63,16)			41 (73,21)	11 (78,57)		
Mialgia	Presente	58 (78,38)	16 (84,21)	0,754	0,679 (0,175 - 2,627)	43 (76,78)	13 (92,86)	0,272	0,254 (0,030 – 2,135)
	Ausente	16 (21,62)	3 (15,79)			13 (23,21)	1 (7,14)		
Cefaléia	Presente	47 (63,51)	17 (89,47)	0,049	0,204 (0,043 - 0,955)	40 (71,43)	8 (57,14)	0,343	1,875 (0,560 – 6,270)
	Ausente	27 (36,49)	2 (10,53)			16 (28,57)	6 (42,86)		
Alterações visuais	Presente	33 (44,59)	8 (42,11)	1,00	1,107 (0,399 - 3,069)	23 (41,07)	7 (50,00)	0,562	0,697 (0,245 - 2,258)
	Ausente	41 (55,41)	11 (57,89)			33 (58,92)	7 (50,00)		
Artralgia	Presente	69 (93,24)	17 (89,47)	0,628	1,624 (0,289 - 9,103)	55 (98,21)	10 (71,43)	0,004	22,00 (2,221 - 217,9)
	Ausente	5 (6,76)	2 (10,53)			1 (1,79)	4 (28,57)		
Edema	Presente	42 (56,76)	10 (52,63)	0,799	1,181 (0,429 - 3,248)	34 (60,71)	7 (50,00)	0,549	1,545 (0,476 – 5,016)
	Ausente	32 (43,24)	9 (47,37)			22 (39,29)	7 (50,00)		

Astenia	Presente	46 (62,16)	12 (63,16)	1,00	0,958	34 (60,71)	8 (57,14)	1,00	1,159
	Ausente	28 (37,84)	7 (36,84)		(0,337 - 2,722)	22 (39,29)	6 (42,86)		(0,353 - 3,798)
Distúrbios Gastrointestinais	Presente	32 (43,24)	12 (63,16)	0,132	0,444	24 (42,88)	8 (57,14)	0,381	0,562
	Ausente	42 (56,76)	7 (36,84)		(0,157 - 1,257)	32 (57,14)	6 (42,86)		(0,172 - 1,937)
Eritemas	Presente	27 (36,49)	5 (26,32)	0,589	1,609	21 (37,50)	4 (28,57)	0,756	1,500
	Ausente	47 (63,51)	14 (73,68)		(0,521 - 4,958)	35 (62,50)	10 (71,43)		(0,417 - 5,394)
Parestesia	Presente	27 (36,49)	8 (42,11)	0,791	0,789	21 (37,50)	6 (42,86)	0,764	0,800
	Ausente	47 (63,51)	11 (57,89)		(0,283 - 2,205)	35 (62,50)	8 (57,14)		(0,243 - 2,627)
Sangramento	Presente	5 (6,76)	1 (5,26)	1,00	1,304	4 (7,14)	1 (7,14)	1,00	1,00
	Ausente	69 (93,24)	18 (94,74)		(0,143 - 11,88)	52 (92,86)	13 (92,86)		(0,102 - 9,724)
Paralisia	Presente	4 (5,41)	0 (0,00)	0,582	2,362	3 (5,36)	0 (0,00)	1,00	1,897
	Ausente	70 (94,59)	18 (100,0)		(0,121 - 45,90)	53 (94,64)	14 (100,0)		(0,092 - 38,88)

Tabela 4 – Avaliação das variáveis sintomatológicas características de infecções por arboviroses em pacientes diagnosticados para o DENV por meio da detecção de anticorpos IgG e quantificação do RNA viral.

		Detecção de IgG		Valor de p	OR (95% IC)	Detecção de RNA viral		Valor de p	OR (95% IC)
		Pos. (%)	Neg. (%)			Pos. (%)	Neg. (%)		
Afta	Presente	22 (25,29)	1 (16,67)	1,00	1,692	12 (24,00)	6 (30,00)	0,762	0,7368
	Ausente	65 (74,71)	5 (83,33)		(0,187 - 15,29)	38 (76,00)	14 (70,00)		(0,231 - 2,341)
Rash cutâneo	Presente	42 (48,28)	4 (66,67)	0,434	0,466	25 (50,00)	8 (40,00)	0,597	1,500
	Ausente	45 (51,72)	2 (33,33)		(0,081 - 2,683)	25 (50,00)	12 (60,00)		(0,523 - 4,298)

Febre alta	Presente	66 (75,86)	4 (66,67)	0,634	1,571	41 (82,00)	12 (60,00)	0,068	3,037
	Ausente	21 (24,14)	2 (33,33)		(0,268 - 9,202)	9 (18,00)	8 (40,00)		(0,962 - 9,587)
Febre constante	Presente	24 (27,58)	2 (33,33)	1,00	1,143	12 (24,00)	6 (30,00)	0,762	0,7368
	Ausente	63 (72,41)	4 (66,67)		(0,215 - 6,061)	38 (76,00)	14 (70,00)		(0,231 - 2,341)
Mialgia	Presente	70 (80,46)	4 (66,67)	0,598	2,059	41 (82,00)	15 (75,00)	0,522	1,519
	Ausente	17 (19,54)	2 (33,33)		(0,347 - 12,19)	9 (18,00)	5 (25,00)		(0,438 - 5,265)
Cefaléia	Presente	59 (67,82)	5 (83,33)	0,209	0,2034	38 (76,00)	10 (50,00)	0,047	3,167
	Ausente	28 (32,18)	1 (16,67)		(0,023 - 1,796)	12 (24,00)	10 (50,00)		(1,064 - 9,427)
Alterações visuais	Presente	40 (45,98)	1 (16,67)	0,223	4,255	23 (46,00)	7 (35,00)	0,436	1,582
	Ausente	47 (54,02)	5 (83,33)		(0,476 - 37,97)	27 (54,00)	13 (65,00)		(0,540 - 4,632)
Artralgia	Presente	82 (94,25)	4 (66,67)	0,063	8,200	49 (98,00)	16 (80,00)	0,021	12,25
	Ausente	5 (5,75)	2 (33,33)		(1,199 - 56,10)	1 (2,00)	4 (20,00)		(1,274 - 117,8)
Edema	Presente	50 (57,47)	2 (33,33)	0,399	2,703	29 (58,00)	12 (60,00)	1,00	0,9206
	Ausente	37 (42,63)	4 (66,67)		(0,469 - 15,56)	21 (42,00)	8 (40,00)		(0,320 - 2,648)
Astenia	Presente	54 (62,07)	4 (66,67)	1,00	0,8182	31 (62,00)	11 (55,00)	0,601	1,335
	Ausente	33 (37,93)	2 (33,33)		(0,141 - 4,719)	19 (38,00)	9 (45,00)		(0,467 - 3,815)
Distúrbios Gastrointestinais	Presente	41 (47,13)	3 (50,00)	1,00	0,8913	24 (48,00)	8 (40,00)	0,603	1,385
	Ausente	46 (52,87)	3 (50,00)		(0,170 - 4,665)	26 (52,00)	12 (60,00)		(0,483 - 3,968)
Eritemas	Presente	29 (33,33)	3 (50,00)	0,410	0,5000	20 (40,00)	4 (30,00)	0,164	2,667
	Ausente	58 (66,67)	3 (50,00)		(0,094 - 2,634)	30 (60,00)	16 (70,00)		(0,776 - 9,155)
Parestesia	Presente	32 (36,78)	3 (50,00)	0,668	0,5818	21 (42,00)	5 (25,00)	0,274	2,172
	Ausente	55 (63,22)	3 (50,00)		(0,110 - 3,057)	29 (58,00)	15 (75,00)		(0,682 - 6,914)

Sangramento	Presente	6 (6,90)	0 (0,00)	1,00	1,037	4 (8,00)	1 (5,00)	1,00	1,652
	Ausente	81 (93,10)	6 (100,0)		(0,052 - 20,54)	46 (92,00)	19 (95,00)		(0,173 - 15,77)
Paralisia	Presente	4 (4,60)	0 (0,00)	1,00	0,7006	3 (6,00)	0 (0,00)	0,552	3,021
	Ausente	83 (95,40)	6 (100,0)		(0,033 - 14,49)	47 (94,00)	20 (100,0)		(0,149 - 61,22)

Tabela 5 – Avaliação das variáveis sintomatológicas características de infecções por arboviroses em pacientes diagnosticados para o CHIKV por meio da detecção de anticorpos IgM e quantificação do RNA viral.

		Detecção de IgM		Valor de <i>p</i>	OR (95% IC)	Detecção de RNA viral		Valor de <i>p</i>	OR (95% IC)
		Pos. (%)	Neg. (%)			Pos. (%)	Neg. (%)		
Afta	Presente	21 (25,93)	2 (16,67)	0,723	1,750 (0,354 - 8,649)	3 (23,08)	15 (26,32)	1,00	0,8400 (0,203 - 3,471)
	Ausente	60 (74,07)	10 (83,33)			10 (76,92)	42 (73,68)		
Rash cutâneo	Presente	38 (46,91)	8 (66,67)	0,231	0,4419 (0,123 - 1,585)	8 (61,54)	25 (43,86)	0,357	2,048 (0,596 - 7,035)
	Ausente	43 (53,09)	4 (33,33)			5 (38,46)	32 (56,14)		
Febre alta	Presente	60 (74,07)	10 (83,33)	0,723	0,5714 (0,115 - 2,824)	9 (69,23)	44 (77,19)	0,720	0,6648 (0,175 - 2,515)
	Ausente	21 (25,93)	2 (16,67)			4 (30,77)	13 (22,81)		
Febre constante	Presente	24 (29,63)	2 (16,67)	0,499	2,105 (0,428 - 10,34)	4 (30,77)	14 (24,56)	0,728	1,365 (0,363 - 5,128)
	Ausente	57 (70,37)	10 (83,33)			9 (69,23)	43 (75,44)		
Mialgia	Presente	65 (80,25)	9 (75,00)	0,705	1,354 (0,328 - 5,585)	11 (84,62)	45 (78,95)	1,00	1,467 (0,285 - 7,531)
	Ausente	16 (19,75)	3 (25,00)			2 (15,38)	12 (21,05)		
Cefaléia	Presente	55 (67,90)	9 (75,00)	0,747	0,7051	9 (69,23)	39 (68,42)	1,00	1,038

Alterações visuais	Ausente	26 (32,10)	3 (25,00)		(0,176 - 2,825)	4 (30,77)	18 (31,58)		(0,281 - 3,825)
	Presente	38 (46,91)	3 (25,00)	0,216	2,651	5 (38,46)	25 (43,86)	0,766	0,8000
Artralgia	Ausente	43 (53,09)	9 (75,00)		(0,668 - 10,52)	8 (61,54)	32 (56,14)		(0,232 - 2,748)
	Presente	74 (91,36)	12 (100,0)	0,588	0,3973	11 (84,62)	54 (94,74)	0,229	0,3056
Edema	Ausente	7 (8,64)	0 (0,00)		(0,021 - 7,407)	2 (15,38)	3 (5,62)		(0,045 - 2,050)
	Presente	44 (54,32)	8 (66,67)	0,539	0,5946	8 (61,54)	33 (57,89)	1,00	1,164
Astenia	Ausente	37 (45,68)	4 (33,33)		(0,165 - 2,134)	5 (38,46)	24 (42,11)		(0,338 - 4,002)
	Presente	50 (61,73)	8 (66,67)	1,00	0,8065	7 (53,85)	35 (61,40)	0,755	0,7333
Distúrbios Gastrointestinais	Ausente	31 (38,27)	4 (33,33)		(0,223 - 2,905)	6 (46,15)	22 (38,60)		(0,217 - 2,469)
	Presente	39 (48,15)	5 (41,67)	0,763	1,300	6 (46,15)	26 (45,61)	1,00	1,022
Eritemas	Ausente	42 (51,85)	7 (58,33)		(0,380 - 4,438)	7 (53,85)	31 (54,39)		(0,305 - 3,423)
	Presente	28 (34,57)	4 (33,33)	1,00	1,057	8 (61,54)	17 (29,82)	0,052	3,765
Parestesia	Ausente	53 (65,43)	8 (66,67)		(0,292 - 3,819)	5 (38,46)	40 (70,19)		(1,075 - 13,19)
	Presente	32 (39,51)	3 (25,00)	0,524	1,959	6 (46,15)	21 (36,84)	0,544	1,469
Sangramento	Ausente	49 (60,49)	9 (75,00)		(0,492 - 7,794)	7 (53,85)	36 (63,16)		(0,435 - 4,959)
	Presente	6 (7,41)	0 (0,00)	1,0	2,152	1(7,69)	4 (7,02)	1,00	1,104
Paralisia	Ausente	75 (92,59)	12 (100,0)		(0,113 - 40,66)	12 (92,31)	53 (92,98)		(0,113 - 10,79)
	Presente	3 (3,70)	1 (8,33)	0,430	0,4231	0 (0,00)	3 (5,62)	1,00	0,5767
	Ausente	78 (96,30)	11 (91,67)		(0,040 - 4,437)	13 (100,0)	54 (94,74)		(0,028 - 11,86)

Tabela 6 – Avaliação do processo de co-infecção entre DENV, ZIKV e CHIKV por meio de detecção do RNA viral associado com as variáveis sintomatológicas comuns às arboviroses.

		Co-infecção por DENV e ZIKV	Co-infecção por DENV e CHIKV	Co-infecção por ZIKV e CHIKV	Co-infecção por DENV, ZIKV e CHIKV
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Total de pacientes		42	11	11	9
Afta					
	Presente	12 (28,57)	3 (27,27)	3 (27,27)	3 (33,33)
	Ausente	30 (71,43)	8 (72,73)	8 (72,73)	6 (66,67)
Rash cutâneo					
	Presente	20 (47,62)	6 (54,55)	3 (27,27)	5 (55,56)
	Ausente	22 (52,38)	5 (45,45)	8 (72,73)	4 (44,44)
Febre alta					
	Presente	33 (78,57)	8 (72,73)	7 (63,64)	6 (66,67)
	Ausente	9 (21,43)	3 (27,27)	4 (36,36)	3 (33,33)
Febre constante					
	Presente	10 (23,81)	4 (36,36)	7 (63,64)	3 (33,33)
	Ausente	32 (76,19)	7 (63,64)	4 (36,36)	6 (66,67)
Mialgia					
	Presente	34 (80,95)	10 (90,91)	9 (81,82)	8 (88,89)
	Ausente	8 (19,05)	1 (9,09)	2 (18,18)	1 (11,11)
Cefaléia					
	Presente	33 (78,57)	8 (72,73)	7 (63,64)	6 (66,67)
	Ausente	9 (21,43)	3 (27,27)	4 (36,36)	3 (33,33)
Alterações visuais					
	Presente	21 (50,00)	5 (45,45)	4 (36,36)	4 (44,44)
	Ausente	21 (50,00)	6 (54,55)	7 (63,64)	5 (55,56)
Artralgia					
	Presente	42 (100,0)	10 (90,91)	10 (90,91)	9 (100,0)
	Ausente	0 (0,00)	1 (9,09)	1 (9,09)	0 (0,00)
Edema					
	Presente	25 (59,52)	7 (63,64)	7 (63,64)	6 (66,67)
	Ausente	17 (40,48)	4 (36,36)	4 (36,36)	3 (33,33)

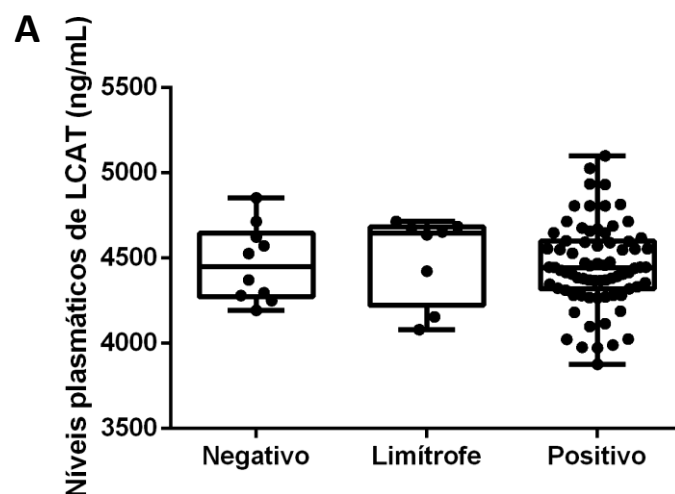
Astenia	Presente	28 (66,67)	6 (54,55)	7 (63,64)	6 (66,67)
	Ausente	14 (33,33)	5 (45,45)	4 (36,36)	3 (33,33)
Distúrbios Gastrointestinais					
	Presente	20 (47,62)	6 (54,55)	4 (36,36)	4 (44,44)
	Ausente	22 (52,38)	5 (45,45)	7 (63,64)	5 (55,56)
Eritemas					
	Presente	17 (40,48)	7 (63,64)	7 (63,64)	6 (66,67)
	Ausente	25 (59,52)	4 (36,36)	4 (36,36)	3 (33,33)
Parestesia					
	Presente	18 (42,86)	5 (45,45)	5 (45,45)	4 (44,44)
	Ausente	24 (57,14)	6 (54,55)	6 (54,55)	5 (55,56)
Sangramento					
	Presente	4 (9,52)	1 (9,09)	1 (9,09)	1 (11,11)
	Ausente	38 (90,48)	10 (90,91)	10 (90,91)	8 (88,89)
Paralisia					
	Presente	3 (7,14)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
	Ausente	39 (92,86)	11 (100,0)	11 (100,0)	9 (100,0)

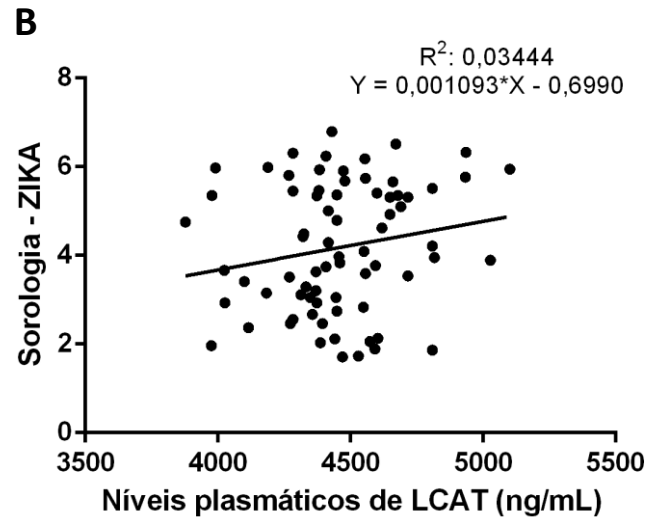
Uma vez que a detecção do anticorpo monoclonal IgM para pacientes com ZIKV e DENV foi negativo, utilizou-se a determinação do anticorpo IgG como critério de diagnóstico às arboviroses, indicando cronicidade e/ou histórico de infecção, para avaliação dos níveis plasmáticos da enzima LCAT. Para CHIKV, uma vez que todos os pacientes exibiram reação anti-IgG negativo, a detecção de IgM foi o método de diagnóstico utilizado, indicando infecção de fase aguda. Em seguida, foram analisados os níveis plasmáticos da LCAT em detrimento às variáveis sintomatológicas observadas pelos pacientes com infecção por arbovírus, evidenciando um possível envolvimento na severidade dos sintomas mediante a concentração da enzima.

Constatou-se que não houve diferença entre os indivíduos positivos (média = 4.454 ng/mL; $\pm$ 246,1), limítrofe (média = 4.504 ng/mL; $\pm$ 255,2) e negativo (média = 4.469 ng/mL; $\pm$ 222,4) ao anticorpo anti-ZIKV IgG+ em relação aos níveis plasmáticos de LCAT (em ng/mL) ($p= 0,853$) (Figura 28A). Não foi possível verificar a existência de uma correlação funcional entre os níveis de LCAT e anti-ZIKV IgG+ ($p=0,113$) (Figura 28B).

Dentre as variáveis sintomatológicas, evidenciou-se que dor de cabeça, artralgia, febre alta, edema, mialgia, alterações oftalmológicas e gastrointestinais (êmeto e diarreia) não apresentam variações mediante as concentrações da enzima LCAT. No entanto, pacientes com rash cutâneo apresentaram maiores níveis de LCAT em relação aos pacientes sem os sintomas ($p=0,002$); enquanto indivíduos prostrados e com alterações oftalmológicas obtiveram valores reduzidos de LCAT ($p=0,001$ e $p=0,087$, respectivamente) (Figura 28).

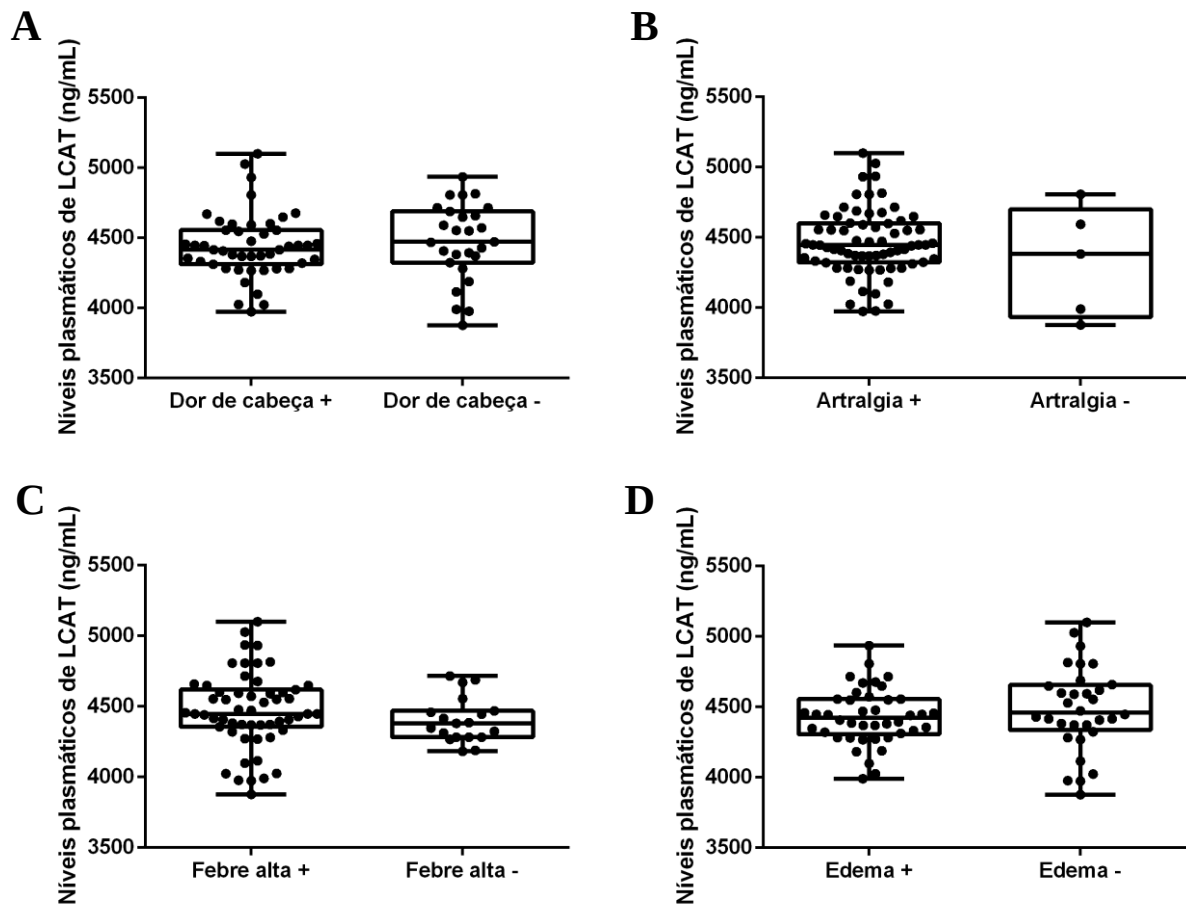
Figura 30 – Avaliação dos níveis plasmáticos de LCAT (ng/mL) em pacientes com detecção ao anticorpo anti-ZIKV IgG.

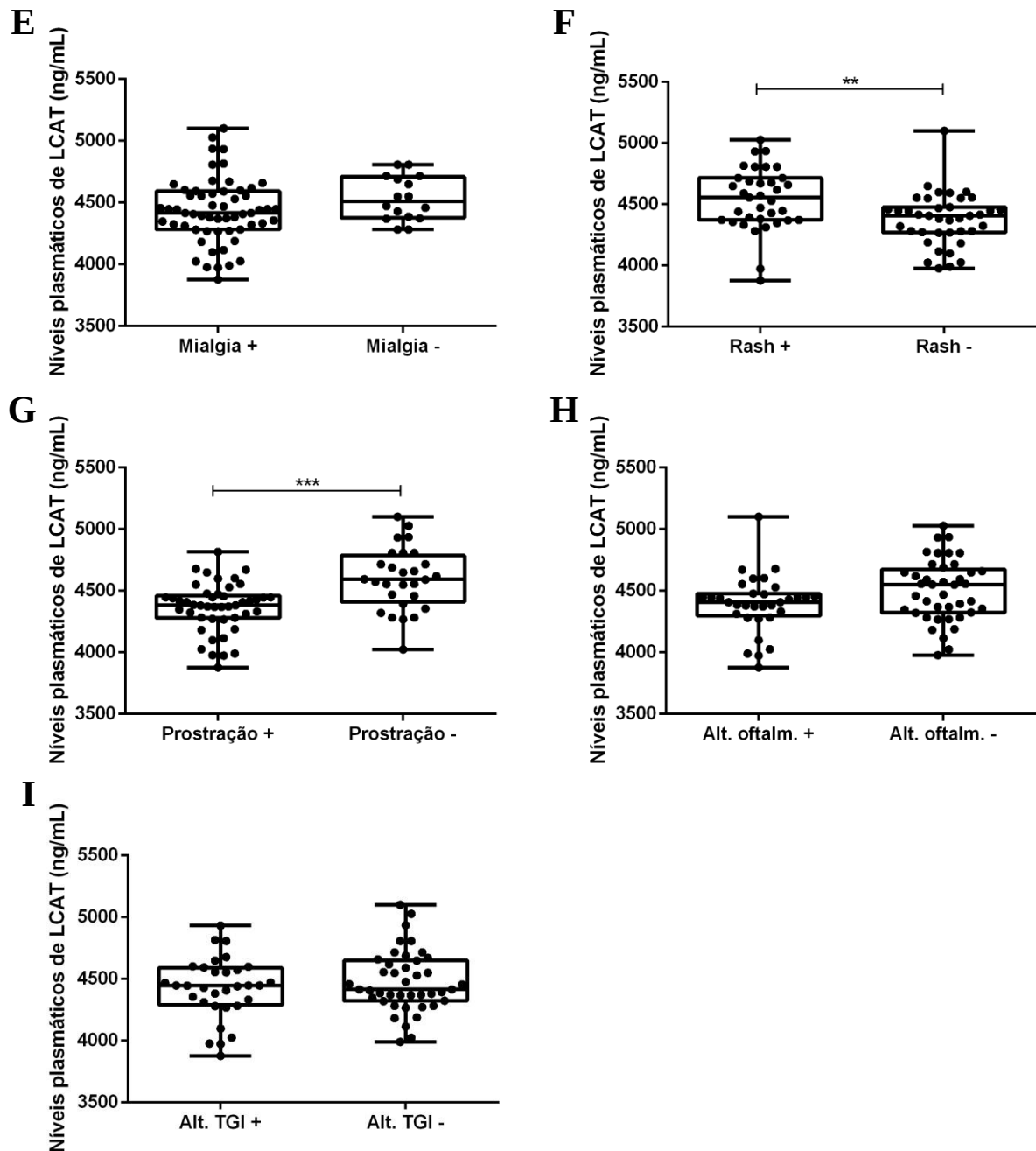




A) Pacientes com detecção do anticorpo anti-ZIKV IgG- (negativo), limítrofe e anti-ZIKV IgG+ (positivo). B) Regressão linear para anti-ZIKV IgG+ em relação aos níveis plasmático de LCAT (ng/mL).

Figura 31 – Avaliação das variáveis sintomatológicas apresentados pelos pacientes anti-ZIKV IgG+ em relação aos níveis plasmáticos de LCAT (em ng/mL).

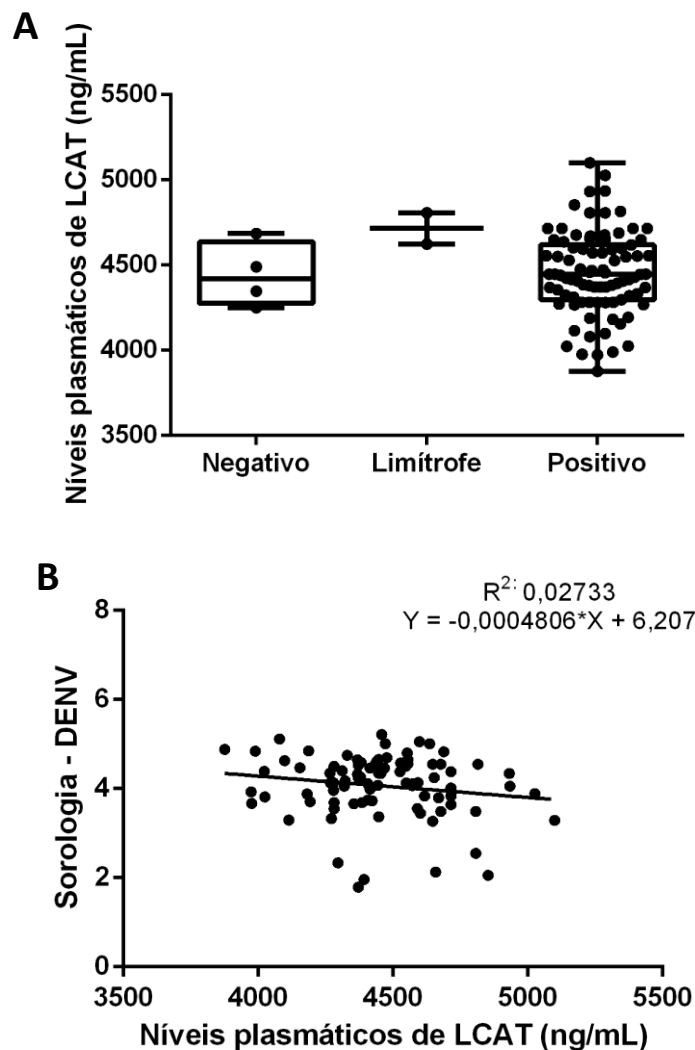




Variáveis sintomatológicas avaliadas em 74 pacientes com anti-ZIKV/IgG+: A) dor de cabeça. B) artralgia. C) febre alta. D) edema. E) mialgia. F) rash cutâneo. G) Prostração. H) Alt. oftalm. = alterações oftalmológicas. I) Alt. TGI = alterações do trato gastrointestinal (êmetose e diarreia).

Os níveis plasmáticos de LCAT (em ng/mL) em detrimento à infecção por DENV após a determinação do anticorpo anti-DENV IgG também não apresentou correlação ($p=0,318$) entre os grupos negativo (média = 4.444 ng/mL; $\pm 189,3$), limítrofe (média = 4.716 ng/mL; $\pm 130,1$) e positivo (média = 4.403 ng/mL; $\pm 243,1$) (Figura 30A). Não foi possível verificar a existência de uma correlação funcional entre os níveis de LCAT e anti-DENV IgG+ ($p=0,126$) (Figura 30B).

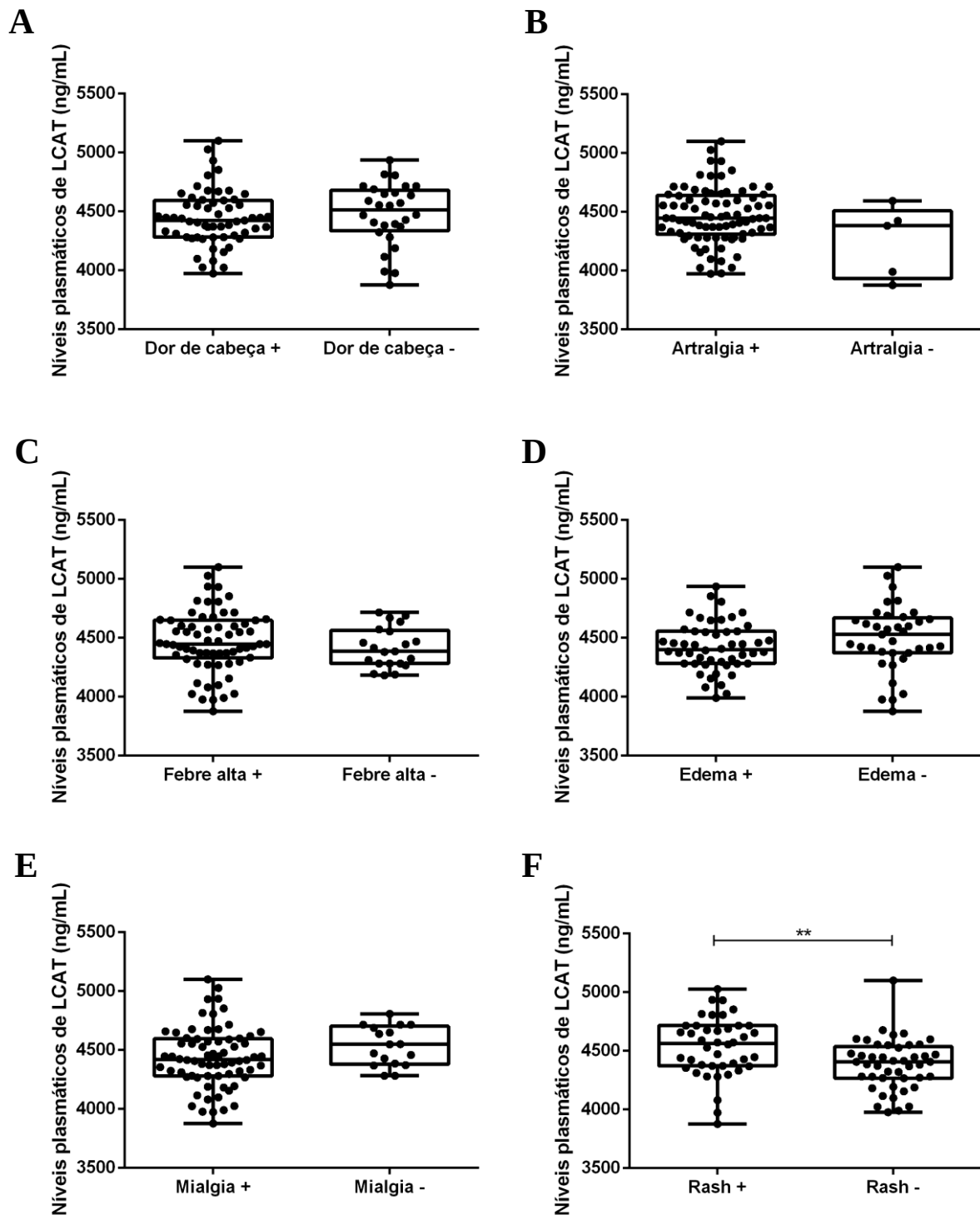
Figura 32 – Avaliação dos níveis plasmáticos de LCAT (ng/mL) em pacientes com detecção ao anticorpo anti-DENV IgG.

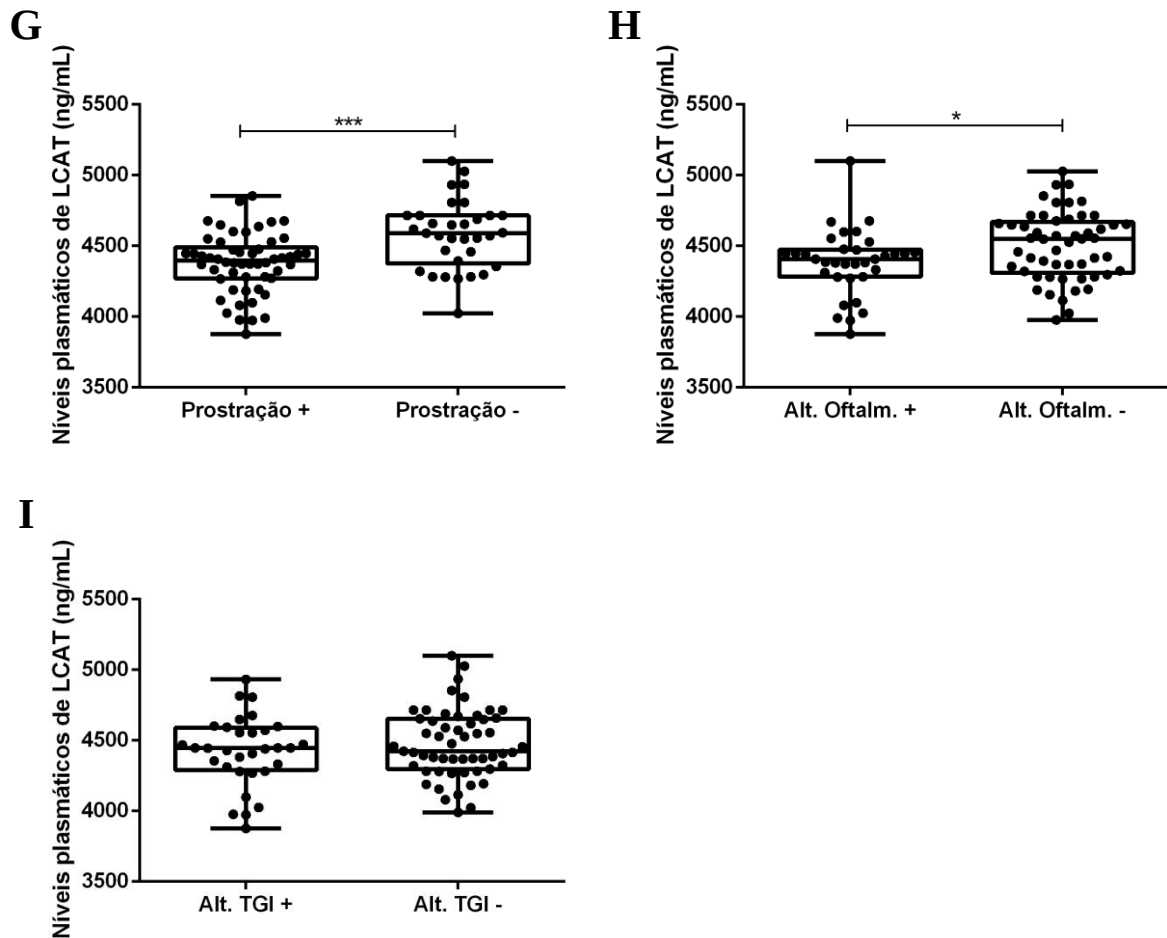


A) Pacientes com detecção do anticorpo anti-DENV IgG- (negativo), limítrofe e anti-DENV IgG+ (positivo). B) Regressão linear para anti-DENV IgG+ em relação aos níveis plasmático de LCAT (ng/mL).

Após avaliação da sintomatologia arboviral em pacientes confirmados para dengue por meio da detecção do anticorpo anti-DENV IgG e a possível correlação da intensidade dessas manifestações decorrente à concentração de LCAT, observou-se que dor de cabeça, febre alta, artralgia e alterações do trato gastrointestinal não apresentaram diferença estatística entre os pacientes com e sem sintomas ($p=0,276$; $p=0,301$; $p=0,167$; e $p=0,579$, respectivamente). No entanto, foi constatada uma elevação dos níveis de LCAT em pacientes com rash cutâneo ($p=0,001$). Além disso, pacientes sem sintomas aparentes para alterações oftalmológicas e prostração apresentaram valores maiores de LCAT quando comparados aos pacientes com os respectivos sintomas ($p=0,003$ e $p=0,002$, respectivamente) (Figura 31).

Figura 33 – Avaliação das variáveis sintomatológicas apresentados pelos pacientes anti-DENV IgG+ em relação aos níveis plasmáticos de LCAT (em ng/mL).

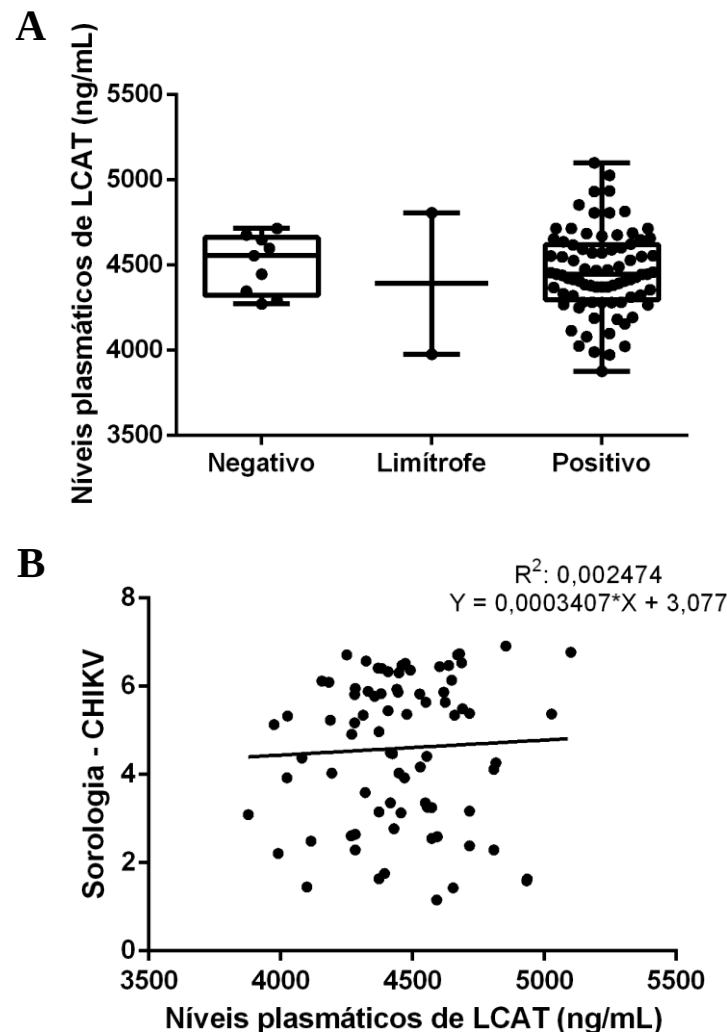




Variáveis sintomatológicas avaliadas em 87 pacientes com anti-DENV/IgG+: A) dor de cabeça. B) artralgia. C) febre alta. D) edema. E) mialgia. F) rash cutâneo. G) Prostração. H) Alt. oftalm. = alterações oftalmológicas. I) Alt. TGI = alterações do trato gastrointestinal (êmetese e diarreia).

Em relação a concentração plasmática de LCAT (em $\eta\text{g/mL}$) em detrimento ao diagnóstico de CHIKV por meio da detecção de anticorpo anti-CHIKV IgM, também foi constatado a ausência de correlação entre os grupos negativo (média = $4.507 \eta\text{g/mL}$; $\pm 170,3$), limítrofe (média = $4.393 \eta\text{g/mL}$; $\pm 587,3$) e negativo (média = $4.458 \eta\text{g/mL}$; $\pm 243,1$) ($p=0,782$) (Figura 32A). Por fim, não foi possível observar a existência de uma correlação funcional entre os níveis de LCAT e Anti-ZIKV IgG+ ($p=0,659$) (Figura 32C).

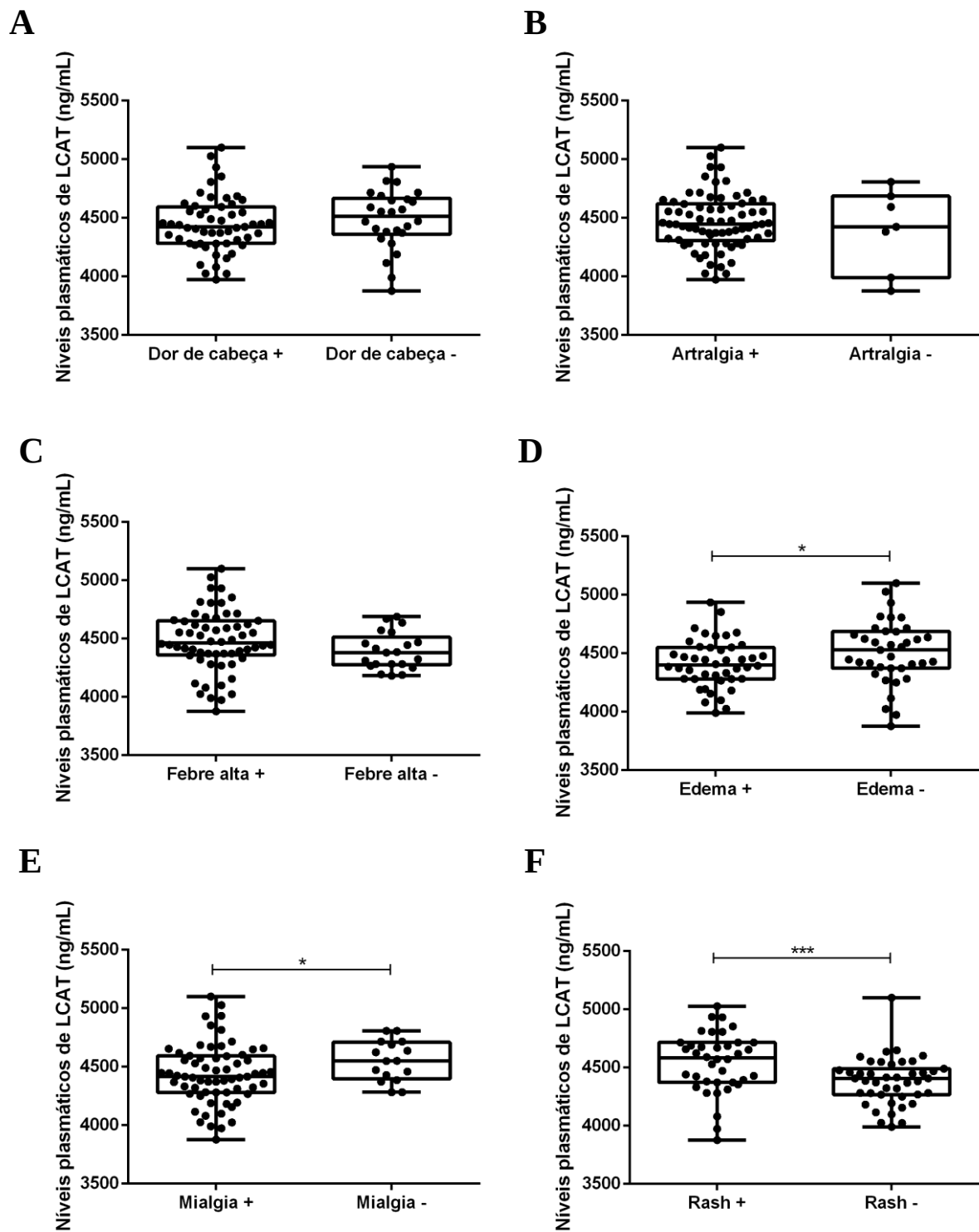
Figura 34 – Avaliação dos níveis plasmáticos de LCAT (ng/mL) em pacientes com detecção ao anticorpo anti-CHIKV IgM.

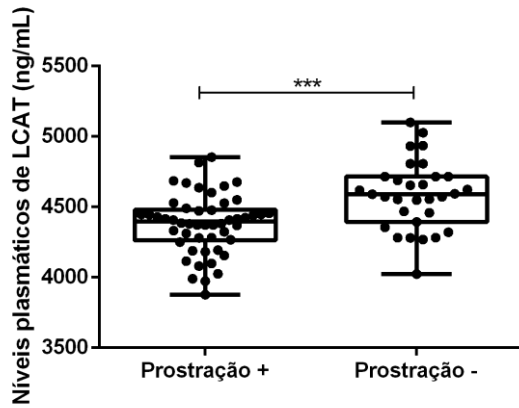
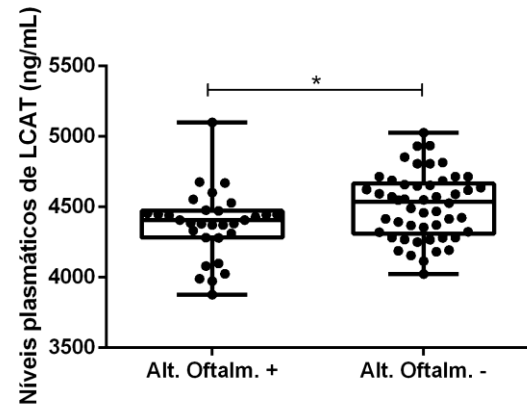
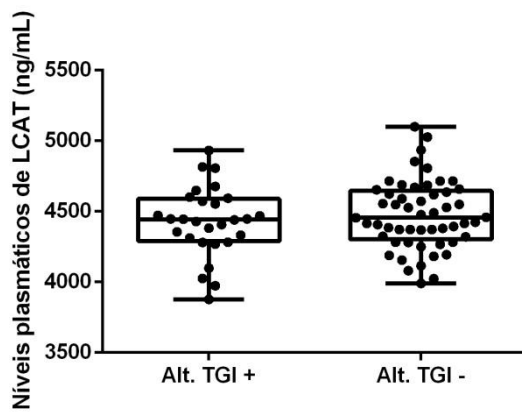


A) Pacientes com detecção ao anticorpo anti-CHIKV IgM- (negativo), limítrofe e anti-CHIKV IgM+ (positivo).
 B) Regressão linear para anti-CHIKV IgG+ em relação aos níveis plasmático de LCAT (ng/mL).

Em relação à variação da intensidade das manifestações sintomatológicas mediante os níveis da enzima LCAT em pacientes com confirmação laboratorial ao CIKV por detecção do anticorpo anti-CHIKV IgM, não foi observado correlação para dor de cabeça, artralgia e alterações gastrointestinais, enquanto febre alta apresentou uma tendência de apresentar elevação da LCAT ($p=0,08$). No entanto, observa-se que pacientes com rash cutâneo exibiram valores elevados de LCAT em detrimento aos pacientes assintomáticos ($p=0,001$); enquanto pacientes com mialgia, alterações oftalmológicas, edema e prostrados obtiveram valores reduzidos da enzima em relação aos indivíduos sem os respectivos sintomas ($p=0,048$, $p=0,029$; $p=0,050$; e $p=0,001$) (Figura 33).

Figura 35 – Avaliação das variáveis sintomatológicas apresentados pelos pacientes anti-CHIKV IgM+ em relação aos níveis plasmáticos de LCAT (em ng/mL).



G**H****I**

Variáveis sintomatológicas avaliadas em 81 pacientes com anti-CHIKV/IgM+: A) dor de cabeça. B) artralgia. C) febre alta. D) edema. E) mialgia. F) rash cutâneo. G) Prostração. H) Alt. oftalm. = alterações oftalmológicas. I) Alt. TGI = alterações do trato gastrointestinal (êmetese e diarreia).

5 DISCUSSÃO

As infecções causadas por arboviroses transmitidas por mosquitos, como o vírus da dengue (DENV), zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV), ganharam destaque nos últimos anos por promoverem elevada morbimortalidade a nível mundial (OLIVEIRA; BAHIA; VALE, 2020). Os arbovírus usam vetores de artrópodes como sua principal via de transmissão e animais vertebrados como reservatórios de amplificação viral (CLETON et al., 2012).

No entanto, os seres humanos representam o principal reservatório para a replicação das arboviroses, promovendo risco de surtos subseqüentes sem a necessidade de um reservatório animal (SIGFRID et al., 2018). A elevada incidência de histórico imunológico à dengue e zika na população paraibana em 2016, em adição ao surto de febre chikungunya no mesmo período corrobora com a suscetibilidade da replicação viral na espécie humana, podendo ser evidenciado uma tríplice epidemia no nordeste brasileiro.

A incidência de vírus transmitidos por artrópodes aumentou substancialmente nas últimas quatro décadas devido ao crescente comércio internacional, globalização do trabalho e turismo (MUSSO et al., 2018; PEZZIN et al., 2016). As arboviroses representam 30% dos casos de doenças infecciosas em seres humanos, constituindo um grande problema em áreas úmidas tropicais e equatoriais. Enquanto DENV se apresenta como uma endemia global que afeta aproximadamente 400 milhões de pessoas anualmente, as epidemias do CHIKV (2004–14) e ZIKV (2007–17) são difíceis de prever, exibindo elevado impacto na população afetada com substanciais efeitos econômicos e de saúde pública (BAUD et al., 2017; MUSSO et al., 2018; WEAVER; LECUIT, 2015).

No Brasil, os quatro sorotipos do DENV circulam desde 2008, enquanto CHIKV e ZIKV foram introduzidos entre 2013 e 2014 e provocaram surtos maciços de doenças febris associadas à artralgia grave e distúrbios congênitos, respectivamente (MUSSO et al., 2018). De fato, tais arboviroses apresentaram co-circulação no nordeste do Brasil na última década (EDER et al., 2016) e, de acordo com o Ministério da Saúde (2017), 282.019 pessoas foram diagnosticadas com ZIKV e CHIKV entre 2015 e 2016, enquanto outras 1.500.535 apresentaram quadro clínico provável de dengue.

A região brasileira que apresentou o maior número de casos confirmados e em investigação às doenças arbovirais foi o Nordeste; dos 1.794 municípios, 569 registraram casos de ZIKV, DENV e CHIKV desde 2015. A disseminação dessas infecções pode estar relacionada com um conjunto de condicionamentos sociais, no qual a população com as

piores condições socioeconômicas apresentam maior vulnerabilidade (OLIVEIRA; MARQUES; BARRETO, 2017)

As arboviroses são caracterizadas por causarem uma doença febril associada a manifestações sistêmicas, que inclui cefaléia, erupção cutânea maculopapular, alterações visuais e artralgia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). Segundo BAGNO et al., (2019), as semelhanças clínicas e a co-circulação de DENV, CHIKV e ZIKV implicam na dificuldade em realizar a diferenciação das três infecções em áreas endêmicas, tornando o diagnóstico baseado em dados clínicos e epidemiológicos não confiáveis. Dessa forma, métodos de identificação laboratorial do agente etiológico são fundamentais para a determinação do DENV, ZIKV e CHIKV.

Os testes moleculares são ferramentas de diagnóstico mais específico e sensíveis para o ZIKV, o DENV e o CHIKV nas fases iniciais das infecções agudas, uma vez que a detecção de RNA é mais rápido do que a avaliação sorológica de anticorpos (MANSUY et al., 2018). No entanto, um período de baixa viremia em alguns casos também complica a detecção de RNA viral e isolamento viral (KELSER, 2016). O diagnóstico incorreto ou incompleto nesse cenário afeta o desenvolvimento de estratégias de prevenção e adequado tratamento aos arbovírus (DONALISIO; FREITAS; ZUBENI, 2017).

A confirmação laboratorial por testes imunológicos e moleculares é importante para o diagnóstico diferencial preciso dos arbovírus (CABRAL-CASTRO et al., 2016). No entanto, ambos os testes podem fornecer informações controversas quando analisadas mutuamente. Dos pacientes com ZIKV avaliados nesse estudo, nenhum apresentou sorologia para fase aguda da infecção (IgM) enquanto 56/70 (80,0%) exibiram positividade por biologia molecular. Em relação ao DENV, 1/93 (1,07%) e 87/93 (93,54%) pacientes exibiram positividade sorológica para IgM e IgG, respectivamente, em detrimento a 52/70 (74,28) pacientes com carga viral detectável. Por fim, 81/93 (87,09%) pacientes apresentaram sorologia anti-IgM ao CHIKV, enquanto apenas 13/70 (18,57%) mostraram detecção do RNA viral por RT-PCR, o que sugere que o kit *multiplex* avaliado nesse estudo não está totalmente eficiente ao diagnóstico de pacientes com febre chikungunya na fase aguda.

A partir da avaliação da sintomatologia desenvolvida pelos pacientes infectados pelo ZIKV em detrimento aos indivíduos sem infecção aparente, por meio da quantificação do RNA viral, foi possível registrar um maior acometimento à estomatite, cefaléia e artralgia, sendo este último o mais prevalente ($p=0,004$). A partir da determinação do DENV, nota-se que indivíduos diagnosticados por biologia molecular apresentaram maior desenvolvimento de cefaléia ($p=0,047$) em comparação aos pacientes com os sintomas, mas sem infecção. O

perfil sintomatológico dos pacientes diagnosticados com febre chikungunya por RT-PCR demonstrou que rash cutâneo e eritema são os sintomas mais frequentes em indivíduos infectados.

Segundo BARZON (2018), países que apresentarem condições climáticas, ambientais, geográficas e socioeconômicas favoráveis podem apresentar a co-circulação intensa das arboviroses. A Colômbia, por exemplo, é um país hiperendêmico para transmissão de DENV, apresentando complicações devido à circulação do CHIKV e ZIKV entre 2014 e 2015, respectivamente. Duas ou todas as três doenças arbovirais co-circulam na Colômbia desde 2015 (RICO-MENDOZA et al., 2019). Esse mesmo perfil pode ser observado no território brasileiro, principalmente na Região Nordeste, que além dos arbovírus endêmicos, como o vírus DENV, há a presença de epidemias de outros arbovírus negligenciados (MOTA et al., 2016).

A co-circulação das arboviroses em diversas regiões do mundo evidenciou a necessidade do aprimoramento de métodos de diagnóstico rápido e de precisão. Segundo WAGGONER et al., (2016), a biologia molecular por meio da RT-PCR pode ser utilizada para detectar e diferenciar ZIKV, CHIKV e DENV na fase aguda, fornecendo dados quantitativos e qualitativos das infecções. Seguindo essa metodologia, foi possível evidenciar que a co-infecção mais frequente na região paraibana, entre março a junho de 2016 foi DENV e CHIKV, com 45,16% dos pacientes positivos para ambas as infecções.

SUWANMANEE et al., (2018), avaliando 182 indivíduos na Tailândia com suspeita clínica de infecção por arbovírus entre maio a outubro de 2016, revelou que seis casos (3,29%) apresentaram co-infecção para DENV/CHIKV e apenas um paciente (0,61%) foi positivo para DENV/ZIKV através de exames sorológicos. Ainda nesse estudo, o diagnóstico por RT-PCR permitiu a detecção de 70,9% pacientes para DENV, sendo ausente a presença de carga viral a ZIKV e CHIKV. Em comparação com a população paraibana, é possível confirmar que os casos de co-circulação das arboviroses foram mais frequentes na população que reside no Nordeste brasileiro.

Através do estudo realizado por WAGGONER et al., (2016) para avaliação da viremia de 346 pacientes infectados por ZIKV, DENV e CHIKV oriundos da Nicarágua por RT-PCR entre outubro/2015 e março/2016, foi observado que 12,4%, 4,6% e 1,7% dos casos apresentaram positividade para DENV/CHIKV, ZIKV/CHIKV e DENV/ZIKV, respectivamente, sendo apenas 1,7% positivos para tríplice-infecção arboviral. Analisando a população paraibana, 45,16% apresentaram co-infecção para DENV/ZIKV, 11,82% exibiram co-infecção para DENV/CHIKV e ZIKV/CHIKV, e 9,67% foram diagnosticados com

DENV/ZIKV/CHIKV. Dessa forma, ressalta-se que enquanto infecções por DENV/CHIKV são semelhantes para ambas as populações estudadas, a incidência das demais co-infecções e tríplice-infecção na Paraíba é mais elevada em comparação com a população da Nicarágua.

A co-infecção de hospedeiros por diferentes arbovírus provavelmente será uma tendência emergente em diferentes partes do mundo (SUWANMANEE et al., 2018). Apesar da transmissão de ZIKV, CHIKV e DENV em muitas regiões, os relatos de co-infecções das arboviroses têm sido raros, principalmente pelo fato dos testes moleculares não serem realizados na rotina como método de diagnóstico diferencial. Apesar das apresentações clínicas dos pacientes serem semelhantes em outros estudos, WAGGONER et al., (2016) observou uma tendência na hospitalização de pacientes com co-infecções em detrimento aos com monoinfecções.

De forma geral, os aspectos clínicos das co-infecções por arboviroses não diferem das monoinfecções causadas por ZIKV, CHIKV e DENV (ZAMBRANO et al., 2016). Particularmente, nosso estudo demonstra que pacientes com DENV/ZIKV, diagnosticados a partir da quantificação do material genético viral, apresentam tendência ao desenvolvimento de febre alta, cefaléia, alterações visuais e paralisia, enquanto pacientes com ZIKV/CHIKV exibem maior incidência à febre constante e menor taxa do desenvolvimento de rash cutâneo.

Em relação à avaliação dos sintomas desenvolvidos pelos pacientes a partir da determinação de anticorpos IgG ou IgM, a depender da janela biológica da infecção, foi possível registrar que pacientes anti-ZIKV/IgG+ exibiram maior incidência à febre alta e constante quando comparados aos ensaios que visam quantificação da carga viral. Alguns aspectos clínicos como a cefaléia foram mais freqüente em indivíduos não-reagentes por sorologia, o que pode sustentar a informação que os sintomas podem estar sobrepostos ou então que eles apresentam outra doença infecciosa provocada por arbovírus, como DENV e CHIKV (PABBARAJU et al., 2016).

Não foram observadas diferenças entre os sintomas desenvolvidos pelos pacientes diagnosticados com dengue por meio de ensaios sorológicos em detrimentos aos pacientes sem infecção. Tal achado corrobora com o estudo de SUWANMANEE et al., (2018), que justifica dificuldades na avaliação do diagnóstico clínico dessa virose por sorologia devido à sobreposição de sintomas com as demais arboviroses em áreas endêmicas que apresentam co-circulação da DENV com CHIKV e/ ou ZIKV. Por fim, pacientes diagnosticados com anti-CHIKV/IgM+ apresentaram maior freqüência de alterações visuais, como dor retro-orbitária, o que não está totalmente de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, que informa como

diagnóstico diferencial uma menor intensidade das complicações oculares do paciente suspeito a febre chikungunya em relação a DENV e ZIKV (BRASIL, 2016b).

A investigação do processo infeccioso das arboviroses em seres humanos se tornou fundamental e de caráter emergencial para avaliação do prognóstico dos pacientes doentes. Alterações no perfil lipídico podem ser observadas na progressão do curso da infecção pelo DENV, impactando significativamente a gravidade da doença quando os níveis de HDL e LDL encontram-se reduzidas (DURÁN et al., 2015; VAN GORP et al., 2002). Apesar desses achados, BARRIENTOS-ARENAS et al., (2018) justifica que o papel do HDL na patogênese da infecção por DENV e o mecanismo de interação viral com essa lipoproteína não está totalmente esclarecido.

A lipoproteína HDL é controlada por proteínas ABCA-1, mediada pela enzima LCAT e pelo receptor SR-BI (receptor *scavenger* classe B tipo I). Essa modulação está associada na capacidade das partículas virais em promover infecção por facilitarem a entrada de vírus na célula alvo (LI et al., 2013), o que poderia ser fundamental na observação dos agravos sintomatológicos provocados pela dengue durante o processo infeccioso. PETROPOULOU et al., (2015) avaliou que os níveis de LCAT podem estar reduzidos em processo pró-inflamatórios que estimulam a produção de TNF α , condição que pode ser observado em infecções por arboviroses. No entanto, a avaliação dos níveis de colesterol e da LCAT em outras doenças provocadas por flavivírus além da DENV não está bem elucidado (OSUNARAMOS; REYES-RUIZ; ÁNGEL, 2018), bem como às infecções causadas por alfavírus.

Em nosso estudo não foi possível constatar a redução dos níveis de LCAT em pacientes infectados por ZIKV, DENV e CHIKV, por meio do diagnóstico sorológico, uma vez que os resultados de IgG e IgM se confundem devido ao metabolismo viral distinto e uma possível sobreposição de infecções. Destaca-se que a grande maioria dos pacientes com ZIKV e DENV apresentavam apenas IgG presente, o que indicaria infecção antiga e denotaria a avaliação da cronicidade dos sintomas. Apesar disso, a avaliação dos sinais clínicos mediante a modulação da concentração plasmática de LCAT corrobora com achados de BARRIENTOS-ARENAS et al. (2018), uma vez que níveis reduzidos dessa enzima e, por consequência, diminuição do HDL podem contribuir com a piora dos sintomas apresentados em infecção arboviral.

Pacientes com ZIKV e DENV apresentaram maior incidência de desenvolver prostração quando os níveis de LCAT encontram-se reduzidos em comparação ao grupo controle, condição clínica representada por um estado de abatimento extremo, físico e psíquico. Essa informação vai de encontro com QUEIROZ et al. (2019) que, ao avaliar o

perfil lipídico sérico entre pacientes com ZIKV do grupo controle sintomático à doença arboviral, mas não infectado, constatou que dor retro-orbital e febre foram os únicos sintomas clínicos que podem ser distinguidos significativamente entre os grupos analisados. Em nosso estudo, manifestações visuais que incluem dor retro-orbitária, conjuntivite e olhos vermelhos foram visualizados somente em pacientes com DENV e CHIKV com níveis reduzidos de LCAT.

A grande diversidade das manifestações sintomatológicas mediante os níveis reduzidos da enzima LCAT foi observada entre os pacientes com infecção aguda pelo CHIKV. Além de alterações visuais e prostração, esse grupo apresentou maior suscetibilidade a desenvolver edema e mialgia, o que promoveria uma piora clínica ao paciente com maior tendência a necessidade de cuidados médicos e internação. TRIANTAPHYLLIDOU et al., (2013) demonstrou que a deficiência de LCAT pode implicar em dano hepático e inflamação sistêmica, predispondo a uma maior da destruição do tecido cartilaginoso. Apesar do nosso estudo não demonstrar a relação da LCAT com artralgia, é importante salientar que essa enzima se encontra em abundância no líquido sinovial (GENECARDS, 2020), o que poderia implicar em uma severidade das manifestações sintomatológicas na fase crônica da infecção.

Estudos indicam que a identificação de características metabólicas que distinguem CHIKV de outras doenças tropicais pode melhorar substancialmente o diagnóstico de populações vulnerável em contraste a outras doenças clinicamente semelhantes. Alguns biomarcadores como sorbitol, ácido 2-cetobutírico e sarcosina podem ser utilizados para diagnóstico diferencial de CHIKV e DENV (BYERS et al., 2019; SHRINET et al., 2016), porém não foi evidenciado como o lipidoma pode influenciar na condição clínica dos pacientes com febre chikungunya.

Segundo FEINGOLD (2007), o colesterol promove a diferenciação e homeostase dos queratinócitos, auxiliando sua função protetora. A depleção de colesterol e dos níveis de SR-B1 no extrato cutâneo pode comprometer a integridade desse tecido, causando suscetibilidade da pele sofrer danos causados por agentes infecciosos (MURESAN et al., 2019). No entanto, foi possível constatar em nosso estudo que os pacientes sintomáticos as três arboviroses desenvolveram rash cutâneo em contraste aos níveis de LCAT estar maior quando comparado ao grupo infectado sem o sintoma aparente.

Tal processo pode ser justificado porque alguns arbovírus apresentam a capacidade de acelerada replicação viral no interior de fibroblastos e queratinócitos, estimulando a liberação de citocinas inflamatórias, apoptose e, conseqüentemente, resposta imune inata (HAMEL et al., 2015). Dessa forma ocorre o desenvolvimento das manifestações cutâneas clássicas

observadas nas infecções por arboviroses, gerando lesões inespecíficas e muitas vezes de difícil distinção a outros vírus, como CHIKV (COSANO-QUERO et al., 2018).

6 CONCLUSÃO

Apesar do diagnóstico clínico da infecção aguda por arboviroses variarem mediante o método laboratorial utilizado, a avaliação das variáveis sintomatológicas apresentados pelos indivíduos com co-infecções não diferem dos com monoinfecções por ZIKV, DENV e CHIKV. Níveis alterados da enzima LCAT foram diretamente relacionados ao desenvolvimento de rash e prostração às três infecções arbovirais estudadas. Pacientes com histórico de infecção por DENV e CHIKV apresentaram maior frequência a alterações oftalmológicas, enquanto mialgia e edema foram relatados apenas em pacientes com CHIKV. Estudos adicionais de associação com citocinas pró-inflamatórias podem auxiliar na determinação do papel da enzima LCAT na resposta imunológica aguda e crônica mediante infecção arboviral.

A enzima LCAT surge como um potencial marcador da avaliação da progressão das doenças arbovirais por influenciar de forma inversamente proporcional às manifestações sintomatológicas. Medicamentos que visam o controle das dislipidemias poderiam ser úteis no tratamento das arboviroses, amenizando sua progressão sintomatológica.

O diagnóstico precoce e diferencial entre DENV, ZIKV e CHIKV é de fundamental importância para a adequada avaliação clínica e acompanhamento dos pacientes infectados, uma vez que cada patologia pode cursar com um tratamento específico e personalizado. Métodos de detecção de anticorpos IgM e IgG por sorologia são bastante utilizados na rotina laboratorial, mas apresentam como desvantagem a possibilidade de reação cruzada. A determinação da carga viral via diagnóstico molecular visa corrigir as lacunas apresentadas pela sorologia, viabilizada somente quando as amostras foram obtidas próximo ao período da manifestação dos primeiros sintomas e a extração do material genético viral foi realizado com elevada qualidade.

Dessa forma, novos métodos de diagnóstico são fundamentais para confirmação rápida e específica às arboviroses. Métodos baseados na metodologia LAMP-PCR apresentam como vantagem serem de baixo custo e fácil manipulação, podendo ser executados em áreas de risco por não exigir uma infra-estrutura sofisticada para realização do diagnóstico de doenças emergentes, como o ZIKV. Apesar de não substituir a PCR para validação do diagnóstico laboratorial, pode ser facilmente utilizado para avaliação de pacientes em locais de difícil acesso ou em áreas de vulnerabilidade que não dispõe de mão de obra qualificada o suficiente para suprir as demandas necessárias para diagnóstico confirmatório das infecções.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, C. B.; SPICKETT, C. M. Lipoproteins as targets and markers of lipoxidation. **Redox Biology**, v. 23, n. November 2018, p. 101066, 2019.
- AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: A Review of Literature. **Cureus**, v. 10, n. 7, p. 1–5, 2018.
- AL-DAHSHAN, A. et al. Knowledge, Attitude, and Practice Regarding Zika Among Travelers to Brazil: Qatar’s Airport Study 2017. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.
- ALBERS, J. J. et al. Population-based reference values for lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT). **Atherosclerosis**, v. 43, n. 2–3, p. 369–379, 1982.
- ALBUQUERQUE, D. et al. Relationship between local presence and density of *Aedes aegypti* eggs with dengue cases: a spatial analysis approach. **Tropical Medicine and International Health**, v. 23, n. 11, p. 1269–1279, 2018.
- ANVISA. **Anvisa registra kits que ampliam acesso ao diagnóstico de Zika, Dengue e Chikungunya**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/anvisa-registra-kits-que-ampliam-acesso-ao-diagnostico-de-zika-dengue-e-chikungunya/219201/pop_up?inheritRedirect=false>. Acesso em: 5 dez. 2019.
- ATKINSON, B.; HEWSON, R. Emerging arboviruses of clinical importance in Central Asia. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 9, p. 1172–1184, 2018.
- AULT, S. et al. The Decline of Dengue in the Americas in 2017: Discussion of Multiple Hypotheses. **Trop Med Int Health**, 2019.
- AZEREDO, E. L. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients : Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue , Zika and Chikungunya in Brazil. **PLOS Currents Outbreaks**, v. 1, 2019.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. Zika Virus Epidemic in Brazil . II . Post-Mortem Analyses of Neonates with Microcephaly , Stillbirths , and Miscarriage. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, 2018.
- BAGNO, F. F. et al. Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of Dengue and Zika. **Journal of Clinical Virology**, v. 113, p. 27–30, 2019.
- BALL, J. D. et al. Clinical and Epidemiologic Patterns of Chikungunya Virus Infection and Coincident Arboviral Disease in a School Cohort in Haiti , 2014 – 2015. **Clinical Infectious Diseases**, 2018.
- BARBOSA, M. H. DE M. et al. Auditory findings associated with Zika virus infection: an integrative review. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 85, n. 5, p. 642–663, 2019.

BARRERA, R. et al. A comparison of mosquito densities , weather and infection rates of *Aedes aegypti* during the first epidemics of Chikungunya (2014) and Zika (2016) in areas with and without vector control in Puerto Rico. **Medical and Veterinary Entomology**, 2018.

BARRIENTOS-ARENAS, E. et al. Modulación de los niveles de lipoproteínas de alta densidad y las citoquinas IL-1 β e IL-6 en pacientes con dengue. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 35, n. 1, p. 15, 2018.

BARZON, L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. **Journal of Clinical Virology**, v. 107, p. 38–47, 2018.

BAUD, D. et al. Review An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BI, K. et al. A memetic algorithm for solving optimal control problems of Zika virus epidemic with equilibriums and backward bifurcation analysis. **Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation**, v. 84, 2020.

BIOLABS. **Isothermal Amplification**. Disponível em: <<https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/isothermal-amplification>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

BIONEER. **AccuPower® ZIKV(DENV,CHIKV) Multiplex Real-Time RT-PCR Kit**. Disponível em: <<http://eng.bioneer.com/diagnostic/HumanMDxkits/Accupower-ZIKV-Multiplex-technical.aspx>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

BRAACK, L. et al. Mosquito-borne arboviruses of African origin : review of key viruses and vectors. **Parasites & Vectors**, v. 11, p. 1–28, 2018.

BRASIL. DENGUE. Diagnóstico e manejo clínico adulto e criança. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.**, v. 4, p. 1–82, 2013.

_____. Informe Técnico: Chikungunya. **Prefeitura do Município de São Paulo. Secretaria Municipal da Saúde**, p. 1–13, 2014.

_____. Febre de Chikungunya: manejo clínico. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.**, 2015.

_____. Boletim da Dengue, Chikungunya e Zika vírus. Estado do Acre. **Secretaria do Estado de Saúde do Acre**, v. 15, 2016a.

_____. Protocolo de investigação de óbitos por arbovírus urbanos no Brasil – Dengue, Chikungunya e Zika. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.**, p. 1–35, 2016b.

_____. Dengue, Chikungunya e Zika: Situação Epidemiológica das arboviroses na Paraíba 2016. **Secretaria do Estado de Saúde da Paraíba**, v. 13, p. 4, 2016c.

_____. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**, v. 48, n. 3, p. 1–11, 2017a.

_____. Plano permanente de combate ao mosquito *Aedes aegypti* no IFPB. **Secretaria de educação profissional e tecnológica**, p. 1–32, 2017b.

_____, P. et al. HHS Public Access. **The new england journal of medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2017.

BRITO, C. A. A. et al. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly – a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, p. 1–9, 2018.

_____. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585–589, 2017.

BRUYCKER-NOGUEIRA, F. DE et al. DENV-1 Genotype V in Brazil : Spatiotemporal dispersion pattern reveals continuous co-circulation of distinct lineages until 2016. **Scientific reports**, v. 8, p. 1–8, 2018a.

_____. First detection and molecular characterization of a DENV- 1/DENV- 4 co-infection during an epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Case Reports**, v. 6, n. 11, p. 2075–2080, 2018b.

BYERS, N. M. et al. Metabolomic insights into human arboviral infections: Dengue, chikungunya, and zika viruses. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 1–30, 2019.

CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV , ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, n. December 2015, p. 108–111, 2016.

CALVO, E. P. et al. Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. **Acta Tropica**, v. 163, p. 32–37, 1 nov. 2016.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CELL BIOLABS. **Lecithin Cholesterol Acyltransferase (LCAT) ELISA Kit**. Disponível em: <<http://www.meditecno.pt/Upload/Product/Archive/STA-616-lcat-elisa-kit.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories**. [s.l: s.n.].
CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Trioplex Real-time RT-PCR Assay**. [s.l: s.n.].

_____. **Countries and territories where chikungunya cases have been reported**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso em: 20 jan. 2019a.

_____. **Areas with Risk of Zika**. Disponível em: <<https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information>>. Acesso em: 20 jan. 2019b.

CHARLIER, C. et al. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. **The Lancet Child and Adolescent Health**, v. 1, n. 2, p. 134–146, 2017.

CHIBUEZE, E. C. et al. Zika virus infection in pregnancy : a systematic review of disease course and complications. **Reproductive Health**, v. 14, n. 28, p. 1–14, 2017.

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

COELHO, K. E. F. A. et al. Congenital Zika syndrome phenotype in a child born in Brazil in December 2011. **Clinical Case Reports**, v. 6, n. 11, p. 2053–2056, 2018.

COOK, J. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2015.

COSANO-QUERO, A. et al. Zika Virus: Cutaneous Manifestations in 3 Patients. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 109, n. 3, p. e13–e16, 2018.

COSTA, C. F. et al. Evidence of vertical transmission of Zika virus in field-collected eggs of *Aedes aegypti* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 7, p. 1–12, 2018a.

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

COSTA, S. S. B. et al. Spatial analysis of probable cases of dengue fever, chikungunya fever and Zika virus infections in Maranhão State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, p. 1–11, 2018c.

DIAZ-QUIJANO, F. A. et al. Comparison of clinical tools for dengue diagnosis in a pediatric population-based cohort. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1–9, 2018.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, 1952.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBENI, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil : challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 10–15, 2017.

DURÁN, A. et al. Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. **Archives of Virology**, v. 160, n. 7, p. 1687–1692, 2015.

ECKERLE, I. et al. Emerging souvenirs - clinical presentation of the returning traveller with imported arbovirus infections in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p.

240–245, 2018.

EDER, M. et al. Arbovirus epidemiology in pregnant women in Pernambuco state, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 53, p. 14, 2016.

ESTOFOLETE, C. F. et al. Co-infection between Zika and different Dengue serotypes during. **Journal of Infection and Public Health**, 2018.

EUROIMMUN. **Sorologia infecciosa: Doenças Tropicais**. Disponível em: <<https://www.euroimmun.com.br/produtos/13/doena%A7as-tropicais#conteudo>>. Acesso em: 16 jan. 2020.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2013.

FDA. **U.S. Food and Drug Administration**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

FEINGOLD, K. R. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 12, p. 2531–2546, 2007.

FOUNTOULAKIS, N. et al. The P274S Mutation of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase (LCAT) and Its Clinical Manifestations in a Large Kindred. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 74, n. 4, p. 510–522, 2019.

FRANCESCHINI, G. Apolipoprotein function in health and disease: Insights from natural mutations. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 26, n. 9, p. 733–746, 1996.

FROLOV, I.; FROLOVA, E. I. Molecular Virology of Chikungunya Virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 2019.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Rede Dengue, Zika e Chikungunya**. Disponível em: <<https://rededengue.fiocruz.br/>>. Acesso em: 20 jan. 2019a.

_____. ZIKA: Abordagem clínica na atenção básica. **UNA-SUS**, 2016b.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 269–273, 2016.

GENECARDS. **LCAT Gene (Protein Coding)**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LCAT>>. Acesso em: 10 jan. 2020.

GLOMSET, J. A. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: Plasma fatty acid transferase. **BBA - Biochimica et Biophysica Acta**, v. 65, n. 1, p. 128–135, 1962.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses : transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 58–77, 2014.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, J. A.; RAMÍREZ-ARROYO, G. F. Chikungunya Virus: History, Geographic Distribution, Clinical Picture, and Treatment. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 37, n. 4, p. 187–194, 2018.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. July, p. 1–13, 2017.

GUEDES, D. R. D. et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, n. June, 2017.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, 2015.

GYAWALI, N. et al. Neglected Australian arboviruses: quam gravis? **Microbes and Infection**, v. 19, n. 7–8, p. 388–401, 2017.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HIGUERA, A.; RAMÍREZ, J. D. Molecular epidemiology of Dengue, Yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An Update. **Acta Tropica**, 2018.

HOPKINS, H. et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: Performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 4, p. 645–652, 2013.

HSIANG, M. S.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P. J. Point of care testing for malaria using lamp, loop mediated isothermal amplification. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 8, p. 1167–1169, 2014.

HSU, C. H. et al. Risk factors for hospitalization of patients with chikungunya virus infection at sentinel hospitals in Puerto Rico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2019.

HUA, C.; COMBE, B. Chikungunya Virus-Associated Disease. **Current Rheumatology Reports**, v. 19, n. 11, p. 1–7, 2017.

HUBÁLEK, Z.; RUDOLF, I.; NOWOTNY, N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. **Advances in Virus Research**, v. 89, p. 201–275, 2014.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10 out. 2019.

JOHNSON, N. et al. Emerging Mosquito-Borne Threats and the Response from European and Eastern Mediterranean Countries. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 1–17, 2018.

JONAS, A. Lecithin cholesterol acyltransferase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1529, n. 1–3, p. 245–256, 2000.

KARWOWSKI, M. P. et al. Zika Virus Disease: A CDC Update for Pediatric Health Care Providers. **Pediatrics**, v. 137, n. 5, 2016.

KELSER, E. A. Meet dengue' s cousin , Zika. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 3, p. 163–166, 2016.

KINDHAUSER, M. K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bull World Health Organ**, v. 94, p. 675–686, 2016.

KRÁLOVÁ, J.; KRÁL, V. Fluorescent probes for monitoring cholesterol trafficking in cells. **Folia Biologica (Czech Republic)**, v. 65, n. 1, p. 1–10, 2019.

KUNNEN, S.; VAN ECK, M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: Old friend or foe in atherosclerosis? **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1783–1799, 2012.

LEON, F. et al. An Innovative Multiplexed And Flexible Molecular Approach For The Differential Detection Of Arboviruses. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2019.

LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 6300, 2016.

LETA, S. et al. International Journal of Infectious Diseases Global risk mapping for major diseases transmitted by Aedes aegypti and Aedes albopictus. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, 2018.

LI, F. et al. Design, synthesis and discovery of andrographolide derivatives against Zika virus infection. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 187, p. 111925, 2020.

LI, Y. et al. Human Apolipoprotein A-I Is Associated with Dengue Virus and Enhances Virus Infection through SR-BI. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses ; strategies , challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, n. 18, p. 1–5, 2015.

LIU, S. et al. Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 92–105, 2013.

LOPEZ-JIMENA, B. et al. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. 1–22, 2018a.

_____. Development of a single-tube one-step RT- LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. 1–14, 2018b.

LOWE, R. et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil : From Discovery to Future Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 96, 2018.

- LY, H. et al. Endotoxin and TNF lead to reduced plasma LCAT activity and decreased hepatic LCAT mRNA levels in Syrian hamsters. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n. 6, p. 1254–1263, 1995.
- MANSUY, J. et al. Detection of Zika, dengue and chikungunya viruses using single-reaction multiplex real-time RT-PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, p. 284–287, 2018.
- MARIE, J. et al. Exploring Mosquito Fauna of Majuro Atoll (Republic of Marshall Islands) in the Context of Zika Outbreak. **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 5, p. 1299–1306, 2018.
- MARÍN-LOPEZ, A. et al. Modeling Arboviral Infection in Mice Lacking the Interferon Alpha / Beta Receptor. **Viruses**, v. 11, n. 35, p. 1–25, 2019.
- MARÍN-PALMA, D. et al. Inflamação e resposta imune inata: Partici-pação das lipoproteínas de altadensidade. **Iatreia**, v. 30, n. 4, p. 423–435, 2017.
- MARQUES-TOLEDO, C. A. et al. Probability of dengue transmission and propagation in a non-endemic temperate area: conceptual model and decision risk levels for early alert, prevention and control. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 38, p. 1–15, 2019.
- MARTÍN-ACEBES, M. A.; VÁZQUEZ-CALVO, Á.; SAIZ, J.-C. Progress in Lipid Research Lipids and fl aviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses. **Progress in Lipid Research**, v. 64, p. 123–137, 2016.
- MARTINEZ, J. D. et al. G o i n g V i r a l 2 0 1 9. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p. 95–105, 2019.
- MASCARENHAS, M. et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–40, 2018.
- MAVIAN, C. et al. Islands as Hotspots for Emerging Mosquito-Borne Viruses : A One-Health Perspective. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 1–28, 2019.
- MENDES, G. et al. Molecular Diagnostics of Dengue by Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) in Disposable Polyester-Toner Microdevices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 9, p. 1841–1849, 2019.
- MERLE, H. et al. Manifestations oculaires des arboviroses émergentes: dengue, chikungunya, infection à virus Zika, fièvre du Nil occidental et fièvre jaune. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, v. 41, n. 7, p. 659–668, 2018.
- MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types : mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.
- MICHAUD, V.; RANDRIAMPARANY, T.; ALBINA, E. Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus : Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

- MOBIUS. **Infectologia multiplex ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA**. Disponível em: <<https://mobiuslife.com.br/wp-content/uploads/2018/04/ZDC.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2020.
- MONTEIRO, F. K. DA S.; PASTORE, J. F. B.; MELO, J. I. M. DE. The flora of paraíba state, brazil: Subfamilies ajugoideae and viticoideae (lamiaceae). **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3, 2018.
- MORALES, E. et al. LCAT deficiency as a cause of proteinuria and corneal opacification. **BMJ Case Reports**, v. 2018, p. 2017–2018, 2018.
- MORRISON, J.; AGUIRRE, S.; FERNANDEZ-SESMA, A. Innate Immunity Evasion by Dengue Virus. **Viruses**, v. 4, n. 3, p. 397–413, 2012.
- MOTA, M. T. DE O. et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38–50, 2016.
- MOYA, M. DE LA L. et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. **Atherosclerosis**, v. 222, n. 2, p. 390–394, 2012.
- MUÑOZ-MEDINA, J. E. et al. Evolutionary analysis of the Chikungunya virus epidemic in Mexico reveals intra-host mutational hotspots in the E1 protein. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–18, 2018.
- MURESAN, X. M. et al. Involvement of cutaneous SR-B1 in skin lipid homeostasis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 666, n. March, p. 1–7, 2019.
- MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- _____. Personal View Unexpected outbreaks of arbovirus infections : lessons learned from the Pacific and tropical America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, p. 355–361, 2018.
- NAINGGOLAN, L. et al. The Association of Lipoprotein Changes and the Development of Plasma Leakage in Dengue Infection. **eJournal Kedokteran Indonesia**, v. 5, n. 1, p. 50–56, 2017.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **LCAT gene: lecithin-cholesterol acyltransferase**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/LCAT#location>>. Acesso em: 10 jan. 2020.
- NEMOTO, M. et al. Detection of Equine Rotavirus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). **Virology**, v. 72, n. 6, p. 823–826, 2010.
- NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.
- NIEDRIG, M. et al. Find the right sample : A study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 707, p. 1–14, 2018.

NOUVELLE-AQUITAINE, C. Surveillance des arboviroses (dengue, chikungunya, Zika). **Bulletin de veille sanitaire**, v. 12, p. 1–10, 2017.

ÖHLUND, P.; LUNDÉN, H.; LIE, A. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. **Virus Genes**, 2019.

OLIVEIRA, R. L. DE; MARQUES, A. D.; BARRETO, F. S. **Saúde e desigualdade regional: a questão das arboviroses no Nordeste brasileiro**. II Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido. **Anais...**2017

OLIVEIRA, J. H.; BAHIA, A. C.; VALE, P. F. How are arbovirus vectors able to tolerate infection ? **Developmental and Comparative Immunology**, v. 103, n. August 2019, p. 1–7, 2020.

OLIVER, G. F.; CARR, J. M.; SMITH, J. R. Emerging infectious uveitis: Chikungunya , dengue , Zika and Ebola — A review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, p. 1–9, 2018.

OSSOLI, A. et al. Recombinant LCAT (Lecithin:Cholesterol Acyltransferase) Rescues Defective HDL (High-Density Lipoprotein)-Mediated Endothelial Protection in Acute Coronary Syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 39, n. 5, p. 915–924, 2019.

OSUNA-RAMOS, J. F.; REYES-RUIZ, J. M.; ÁNGEL, R. M. DEL. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2018.

PABBARAJU, K. et al. Simultaneous detection of Zika , Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, p. 66–71, 2016.

PAIXÃO, E. S. et al. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1–9, 2016.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika , chikungunya and dengue : the causes and threats of new and re- emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, p. 1–6, 2017.

PARDEE, K. et al. Rapid , Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components Rapid , Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255–1266, 2016.

PARIDA, M. et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2895–2903, 2005.

_____. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, v. 18, p. 407–421, 2008.

PEREIRA, J. P. et al. Association of Prenatal Ultrasonographic Findings With Adverse Neonatal Outcomes Among Pregnant Women With Zika Virus Infection in Brazil. **JAMA Network Open**, v. 1, n. 8, p. 1–12, 2018.

PESSÔA, R. et al. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. 1–9, 2016.

PETERS, R.; STEVENSON, M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018.

PETROPOULOU, P. I. et al. Lack of LCAT reduces the LPS-neutralizing capacity of HDL and enhances LPS-induced inflammation in mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 10, p. 2106–2115, 2015.

PEZZIN, A. et al. Acta Tropica Comparative study on the effectiveness of different mosquito traps in arbovirus surveillance with a focus on WNV detection. **Acta Tropica**, v. 153, p. 93–100, 2016.

PIPER, D. E. et al. The high-resolution crystal structure of human LCAT1. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 9, p. 1711–1719, 2015.

PRATA-BARBOSA, A. et al. International Journal of Infectious Diseases Co-infection with Zika and Chikungunya viruses associated with fetal death — A case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 25–27, 2018.

QUEIROZ, A. et al. Lipidomic analysis reveals serum alteration of plasmalogens in patients infected with ZIKA virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–10, 2019.

RAMALHO, I. L. C. et al. Dengue 4 in Ceará, Brazil: characterisation of epidemiological and laboratorial aspects and causes of death during the first epidemic in the state. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. 1–7, 2018.

RICO-MENDOZA, A. et al. Co-circulation of dengue, chikungunya, and Zika viruses in Colombia from 2008 to 2018. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 43, p. 1, 2019.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROCHA, R. F. et al. Host target-based approaches against arboviral diseases. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 203–217, 2017.

ROMANO, A. P. M. et al. Yellow Fever Outbreaks in Unvaccinated Populations, Brazil, 2008–2009. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 3, p. 18–21, 2014.

ROSENBERG, E. S. et al. Prevalence and Incidence of Zika Virus Infection Among Household Contacts of Patients With Zika Virus Disease , Puerto Rico , 2016 – 2017. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1–8, 2018.

SACCHETTO, L. et al. Screening for Zika virus RNA in sera of suspected cases : a retrospective cross- sectional study. **Virology Journal**, v. 15, p. 1–8, 2018.

SANTIAGO, G. A. et al. chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

SAVEL, J. et al. Very low levels of HDL cholesterol and atherosclerosis, a variable relationship - A review of LCAT deficiency. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, n. 1, p. 357–361, 2012.

SHEPARD, D. S. et al. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 200–207, 2011.

SHRINET, J. et al. Serum metabolomics analysis of patients with chikungunya and dengue mono/co-infections reveals distinct metabolite signatures in the three disease conditions. **Scientific Reports**, v. 6, n. November, p. 1–12, 2016.

SIGFRID, L. et al. Preparing clinicians for (re-) emerging arbovirus infectious diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 3, p. 229–239, 2018.

SILVA, M. M. O. et al. Concomitant transmission of dengue, chikungunya and Zika viruses in Brazil: Clinical and epidemiological findings from surveillance for acute febrile illness. **Clinical Infectious Diseases**, 2018.

SIMÓN, D. et al. An Evolutionary Insight into Zika Virus Strains Isolated in the Latin American Region. **Viruses**, v. 10, n. 12, 2018.

SLAVOV, S. N. et al. Hematology , Transfusion and Cell Therapy Original article Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 4, p. 358–362, 2018.

SOGHAIER, M. A. et al. Evidence of pre-existing active Zika virus circulation in Sudan prior to 2012. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 906, p. 1–6, 2018.

SOTO-ACOSTA, R. et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. **Virology**, v. 442, n. 2, p. 132–147, 2013.

SOUPENE, E. et al. Featured Article: Alterations of lecithin cholesterol acyltransferase activity and apolipoprotein A-I functionality in human sickle blood. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 17, p. 1933–1942, 2016.

SOUSA-JÚNIOR, I. P. et al. Fusion of a New World Alphavirus with Membrane Microdomains Involving Partially Reversible Conformational Changes in the Viral Spike Proteins. **Biochemistry**, v. 56, n. 43, p. 5823–5830, 2017.

SOUSA, C. A. DE et al. Zikavírus: knowledge, perceptions, and care practices of infected pregnant women. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 39, 2018.

SOUZA, T. M. A. DE et al. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil : The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 1–17, 2018.

SPERRY, W.; HOSPITAL, B. Cholesterol Esterase in Blood. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 111, n. 2, p. 467–478, 1935.

SPOTO, S. et al. Diffuse maculopapular rash: A family cluster during the last Chikungunya virus epidemic in Italy. **Clinical Case Reports**, v. 6, p. 2322–2325, 2018.

STOKKE, K. T. et al. Familial Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.**, v. 137, p. 93–100., 1974.

SUMAYE, R. et al. Rift Valley fever : An open-source transmission dynamics simulation model. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–27, 2019.

SUVARNA, J. C.; RANE, P. P. Serum lipid profile: A predictor of clinical outcome in dengue infection. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 5, p. 576–585, 2009.

SUWANMANEE, S. et al. Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections. **Acta Tropica**, v. 188, n. April, p. 244–250, 2018.

TANAKA, S. I. et al. Impact of serum cholesterol esterification rates on the development of diabetes mellitus in a general population. **Lipids in Health and Disease**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2018.

THOMAS, S. J. et al. Dengue illness index — A tool to characterize the subjective dengue illness experience. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1–13, 2018.

TORRES, J. R. et al. International Journal of Infectious Diseases Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 85–88, 2016.

TRAJKOVSKA, K. T.; TOPUZOVSKA, S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: Strategies for raising HDL cholesterol. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 18, n. 2, p. 149–154, 2017.

TRIANAPHYLLIDOU, I. E. et al. Perturbations in the HDL metabolic pathway predispose to the development of osteoarthritis in mice following long-term exposure to western-type diet. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 2, p. 322–330, 2013.

UNIVERSITY OF ALBERTA. **Cholesterol synthesis**. Disponível em: <<https://www.studyblue.com/notes/n/cholesterol-synthesis/deck/1769150>>. Acesso em: 5 dez. 2019.

VAN DER VELDE, A. E. Reverse cholesterol transport: From classical view to new insights. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 47, p. 5908–5915, 2010.

- VAN GORP, E. C. M. et al. Changes in the Plasma Lipid Profile as a Potential Predictor of Clinical Outcome in Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 8, p. 1150–1153, 2002.
- VASCONCELOS, V.; MOUTINHO, C.; PINHO, D. DE. Multivariate Geovisualization of Dengue, Zika and Chikungunya cases in Brazil: a didactic experience. **Hygeia**, v. 13, n. 25, p. 91–106, 2017.
- VEGA, F. L. R. et al. Emergence of chikungunya and Zika in a municipality endemic to dengue , Santa Luzia, MG, Brazil, 2015-2017. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–9, 2019.
- VICTORA, C. G. et al. Microcephaly in Brazil : how to interpret reported numbers ? **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621–624, 2016.
- VYROUBAL, P. et al. Hypocholesterolemia in clinically serious conditions--review. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 152, n. 2, p. 181–189, 2008.
- WAGGONER, J. J. et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus , Chikungunya Virus , and Dengue Virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, 2016.
- WANG, X. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Virological Methods**, v. 238, p. 86–93, 2016.
- WATSON-BROWN, P. et al. Original research. **Transfusion**, p. 1–11, 2019.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **The new england journal o f medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, p. 328–345, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on vector-borne diseases. **World Health Organization (WHO)**, p. 1–56, 2014.
- WU, W. et al. Development of multiplex real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Zika, dengue, yellow fever, and chikungunya viruses in a single tube. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 11, p. 1681–1686, 2018.
- XU, M. et al. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 236, p. 93–97, 2016.
- YANG, S. et al. The Role of Cholesterol in Membrane Fusion. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 199, p. 136–143, 2017.
- YARRINGTON, C. D. et al. Congenital Zika syndrome arising from sexual transmission of Zika virus , a case report. **Fertility Research and Practice**, v. 5, n. 1, p. 1–4, 2019.

YOKOYAMA, K. et al. Association of lecithin-cholesterol acyltransferase activity and low-density lipoprotein heterogeneity with atherosclerotic cardiovascular disease risk: A longitudinal pilot study. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 18, n. 1, p. 1–6, 2018.

ZAMBRANO, H. et al. Case report: Zika virus and chikungunya virus coinfections: A series of three cases from a single center in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 894–896, 2016.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy : Clinical , immunological and virological findings , and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 32–35, 2015.

ZHAO, J.; FENG, R. Sensitive and rapid detection of Zika virus by loop-mediated isothermal amplification. **Virus Genes**, 2018.

**APÊNDICE A – DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A RAPID MOLECULAR
DIAGNOSTIC TEST FOR ZIKA VIRUS INFECTION BY REVERSE
TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION**

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA SCIENTIFIC REPORTS

SCIENTIFIC REPORTS 

OPEN

**Development and evaluation of
a rapid molecular diagnostic test
for Zika virus infection by reverse
transcription loop-mediated
isothermal amplification**

Scientific Reports, v. 7, n. 13503, 2017.

Received: 9 May 2017.

Accepted: 2 October 2017.

Published: 18 October 2017

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13836-9>

Concerning SCIENTIFIC REPORTS:

Impact factor: 4.122

ISSN: 2045-2322

Concerning QUALIS CAPES:

Evaluation area: Ciências Biológicas 1.

Classification: A1.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A RAPID MOLECULAR DIAGNOSTIC TEST FOR ZIKA VIRUS INFECTION BY REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION

Yohei Kurosaki¹, Danyelly Bruneska Gondim Martins², Mayuko Kimura¹, Andriu dos Santos Catena², Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba², Sandra da Silva Mattos², Haruka Abe¹, Rokusuke Yoshikawa¹, José Luiz de Lima Filho² and Jiro Yasuda^{1,3}.

1- Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan.

2- Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-901, Brazil.

3- Graduate School of Biomedical Sciences and Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.Y.
(email: j-yasuda@nagasaki-u.ac.jp)

3.3.1 Abstract

The recent outbreak of Zika virus (ZIKV) disease caused an enormous number of infections in Central and South America, and the unusual increase in the number of infants born with microcephaly associated with ZIKV infection aroused global concern. Here, we developed a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay using a portable device for the detection of ZIKV. The assay specifically detected ZIKV strains of both Asian and African genotypes without cross-reactivity with other arboviruses, including Dengue and Chikungunya viruses. The assay detected viral RNA at 14.5 TCID₅₀/mL in virus-spiked serum or urine samples within 15 min, although it was slightly less sensitive than reference real time RT-PCR assay. We then evaluated the utility of this assay as a molecular diagnostic test using 90 plasma or serum samples and 99 urine samples collected from 120 suspected cases of arbovirus infection in the states of Paraíba and Pernambuco, Brazil in 2016. The results of this assay were consistent with those of the reference RT-PCR test. This portable RT-LAMP assay was highly specific for ZIKV, and enable rapid diagnosis of the virus infection. Our results provide new insights into ZIKV molecular diagnostics and may improve preparedness for future outbreaks.

3.3.2 Introduction

Zika virus (ZIKV) was first identified in Uganda in 1947. Since then, human infections were found across Africa and Southeast Asia^{1,2}. In May 2015, the first case of infection with ZIKV on the South American continent was reported in Brazil^{2,3}. By early 2016, the number of ZIKV infections in Brazil increased dramatically, and an unusual number of cases of fetal and newborn microcephaly associated with ZIKV infection in pregnant women were reported^{4,5}. To control ZIKV disease outbreaks and the spread of ZIKV infections, the World Health Organization declared a Public Health Emergency of International Concern in February 2016. ZIKV infections have also been reported in other American countries and continue to expand.

A particular concern with respect to ZIKV infection is the increased risk of congenital central nerve system malformations, including microcephaly as well as arthrogryposis and spontaneous abortion caused by maternal infection during the first or second trimester of pregnancy^{6,7}. In addition, sexual transmission and the probable transmission through blood transfusions have been reported^{8,9,10}. ZIKV infection usually causes a mild and self-limiting illness, e.g., fever, rash, arthralgia, and conjunctivitis. Since these clinical symptoms are commonly observed in infections with other arboviruses, such as Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) viruses, it is difficult to diagnose ZIKV infection by clinical symptoms alone^{1,2}. Therefore, accurate laboratory diagnosis to identify ZIKV infections is urgently required, especially for pregnant women who are at risk of bearing children with microcephaly.

ZIKV is a positive-stranded RNA virus belonging to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*. ZIKV shares its vector, the *Aedes* mosquito, with other flaviviruses, including DENV, Yellow fever virus (YFV), and CHIKV1. ZIKV has been isolated from humans in East and West Africa and in Southeast Asia and Polynesian countries where the host mosquitoes, *A. aegypti* and *A. albopictus*, are found^{1,11}. Based on phylogenetic analyses, these isolates can be categorized into two genotypes, African and Asian. Epidemiological studies have revealed that the recent outbreak of ZIKV in Brazil occurred via the introduction of a virus from French Polynesia, where an outbreak of the disease occurred in 2013¹². All of the viruses isolated in Brazil and other countries on the American continent belong to the Asian genotype¹³.

In patients with ZIKV infection, the virus can be detected in several sample types, including blood, urine, saliva, and other body fluids^{14,15,16,17,18}. The viral load in blood reaches

a peak at 2 to 5 days after the onset of illness, but decreases rapidly thereafter. Therefore, it is difficult to detect ZIKV in blood samples from patients after the acute phase of infection, even with sensitive molecular diagnostic methods, such as reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)^{14,18,19}. The virus can be detected in urine samples for longer durations (>7–14 days after the onset of symptoms) than in those for blood samples¹⁴. Currently, blood and urine samples are typically used for the molecular diagnosis of ZIKV.

ZIKV infection is diagnosed in the laboratory by nucleic acid amplification tests (NAATs) to detect viral RNA^{20,21,22,23,24} or by ELISA to detect IgM or IgG antibodies^{21,25}. The NAATs such as RT-PCR and other technologies (e.g. recombinase polymerase amplification) are highly accurate, and RT-PCR is considered the gold standard to confirm ZIKV infection^{21,24}. RT-PCR, however, requires a step for viral RNA extraction prior to the assay and the use of expensive equipment, such as thermal cycler, to conduct the test. Moreover, there is a risk of reduced sample quality due to RNA degradation during transportation to the laboratory. For ELISA, serological cross-reaction between ZIKV and other circulating flaviviruses like DENV makes accurate diagnosis with serology difficult^{21,26}. Therefore, novel diagnostic technologies that can be conducted at the point-of-care or in regional laboratories are greatly needed to control ZIKV infections.

Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) is a rapid, sensitive RNA detection method performed under isothermal conditions using four or six unique oligonucleotide primers^{27,28}. Since LAMP reactions can be performed with simple inexpensive equipment, RT-LAMP assays can be conducted in the field and by under-funded laboratories²⁹. We previously developed a RT-LAMP assay using a portable isothermal amplification and detection device for Ebola virus in response to the recent outbreak of Ebola virus disease in West Africa, and the assay has been deployed for field surveillance in Guinea^{30,31}. Here, we developed a RT-LAMP assay for the detection of ZIKV with a portable battery-powered device. Then, we evaluated the utility of this assay for molecular diagnosis using clinical specimens collected from the recent ZIKV outbreak in Brazil.

3.3.3 Methods

3.3.3.1 Cells and viruses

Vero 76 cells were obtained from the Health Science Research Resources Bank (JCRB9007) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS). ZIKV strain 976Uganda was kindly provided by Dr. Shigeru Tajima (National Institute of Infectious Diseases; NIID). The virus was propagated in Vero 76 cells grown in DMEM supplemented with 2% FBS. Two days after infection, culture supernatants were harvested, clarified by low-speed centrifugation, and then stored as virus stock at -80°C until use. The infectious titre of the virus stock was determined by the 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀) using Vero 76 cells; titres are expressed as TCID₅₀/mL. Viral RNA was extracted from 140 μL of infected culture supernatant using the QIAamp Viral RNA Mini Kit according to the manufacturer's protocol. The RNA was eluted in 60 μL of elution buffer and stored at -80°C until use. Viral RNA from ZIKV strain PRABC59 was kindly provided by Dr. Shigeru Tajima (NIID). Viral RNAs from other arboviruses, including DENV serotype 1–4, YFV, WNV, CHIKV, and RVFV, as well as genomic DNA from *P.falciparum* strain 3D7 were kindly provided by Dr. Kouichi Morita and Dr. Osamu Kaneko (Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University).

3.3.3.2 Preparation of RNA Standards

RNA standards, consisting of partial genome sequences of ZIKV strains 976Uganda and PRVABC59, were amplified by RT-PCR using forward (5'-GGAGTCAGGATGGTACTTGTACC-3') and reverse (5'-AAAATTGGATATTCAGGAACC-3') primers with the PrimeScriptII High Fidelity One Step RT-PCR Kit (Takara Bio, Shiga, Japan). The reactions were performed using the TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice with the following program: 45°C for 10 min, 94°C for 2 min, followed by 40 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 15 s, and 68°C for 20 s. Amplified PCR fragments were cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The plasmids were digested with *Bam*HI, purified from the agarose gel slice using a column purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), and used as templates for RNA synthesis. The partial genomic RNAs of each

ZIKV strain were synthesised *in vitro* using T7 RNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA concentration was determined by measuring the optical density at 260 nm (OD₂₆₀) with a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the RNAs were diluted in DEPC-treated water to achieve the desired concentrations.

3.3.3.3 Primer design

LAMP primers for ZIKV detection were designed based on the coding sequences for the E protein. The ZIKV sequences available in GenBank were aligned using CLUSTALX to identify conserved regions. A consensus sequence for a region in the *E* gene was used to design LAMP primers using LAMP Designer (Optigene; <http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>). Primers specific for Asian genotype viruses were designed first, and then African genotype-specific primers were designed by adapting each position to the African genotype consensus sequence. The RT-LAMP assay required a set of six primers, two outer primers (F3 and B3), a forward inner primer (FIP), a reverse inner primer (BIP), a forward loop primer (LF), and a reverse loop primer (LB). The FIP consisted of the F1c sequence, which was complementary to the F1 and F2 sequences. The BIP consisted of the B1c sequence, which was complementary to the B1 and B2 sequences²⁷. The LB primer was designed to detect both Asian and African genotype sequences. The sequences and locations of the oligonucleotide primers are shown in Table 1.

3.3.3.4 RT-LAMP

RT-LAMP was performed with Isothermal Master Mix reagent (Optigene, West Sussex, UK) using the Genelyzer FIII real-time fluorescence detection platform (TOSHIBA Medical Systems, Otawara, Japan). The reaction mixture (total volume, 25 µL) contained 15 µL of Isothermal Master Mix; 1 µL of WarmStart RTx reverse transcriptase (1 U; New England BioLabs, Ipswich, MA, USA); 4 µL of the LAMP primer mix consisting of 5 pmol F3 and B3, 20 pmol FIP and BIP, 10 pmol LF and LB; and 5 µL of RNA sample (template). The assay was carried out using a mixture of primers specific for the Asian and African genotypes. All primers were cartridge-purified oligonucleotides purchased from Hokkaido System Science (Sapporo, Japan). The reaction was performed at 65 °C for 30 min, followed by a dissociation analysis at 95 °C–80 °C. DEPC-treated distilled water and RNA

synthesised from 976Uganda or PRVABC59 were used for the negative and positive controls, respectively. Nonspecific amplification was excluded by comparing the melting temperature to that of the positive control³¹.

3.3.3.5 Real time RT-PCR

Real time RT-PCR for ZIKV was performed using the QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) as reported previously²¹. The reaction mixture (total volume, 25 μ L) contained 12.5 μ L of 2 $\times$ QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 0.5 μ L of QuantiTect RT Mix, 10 pmol each of primers 1086 and 1162c, and 5 pmol FAM-labelled 1086 probe for ZIKV. Then, aliquots of the RNA samples (2 μ L) were added to the 25- μ L reaction mixtures. Each reaction was performed using the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) with a thermal cycle profile consisting of 48 °C for 30 min, 95 °C for 15 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Cut-off values were set at Ct 38.5. To quantify viral RNA, a standard curve, generated with 10-fold serial dilutions of synthesised standard RNA from 976Uganda or PRVABC59, was used.

3.3.3.6 Droplet digital PCR

Each arbovirus RNA listed in Table 1 except ZIKV was quantified by droplet digital PCR (ddPCR). The complementary DNA (cDNA) of each arbovirus RNA was synthesised from an extracted RNA stock using the SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) with forward primer for RVFV and reverse primers for DENV, WNV, YFV, and CHIKV, respectively (Table 7). The primers used for ddPCR were designed using Primer3 (Table 1). All 20- μ L ddPCR mixtures contained 2 $\times$ EvaGreen ddPCR Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 0.1 μ M forward and reverse primers, and 2 μ L of cDNA. Each oil compartment of the droplet generator DG8 cartridge (Bio-Rad) was filled with 70 μ L of droplet generation oil for EvaGreen (Bio-Rad), and approximately 20,000 droplets were generated in each well by the QX200 Droplet Generator (Bio-Rad). The reactions were performed in a 40- μ L droplet emulsion using a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) under the following thermal cycling conditions: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 94 °C for 30 s and 60 °C for 2 min, with a final step at 98 °C for 10 min. Controls without the template were used to monitor for signals from contamination or

primer-dimer formation. The cycled droplets were read individually using the QX200 droplet reader (Bio-Rad) and analysed with QuantaSoft Droplet Reader software (Bio-Rad).

3.3.3.7 Clinical specimens

Peripheral blood and urine samples were obtained from patients between 2 and 65 year old with suspected arbovirus infection, who presented with fever, rash, and/or arthralgia symptoms. Venous whole blood samples were collected in one VACUETTE® Z Serum Separator Clot Activator and two Vacuette® EDTA Tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). To one EDTA tube, *RNAlater* (Thermo Fisher Scientific) was added at half the volume of the collected blood samples to prevent RNA degradation during transport. In total, 90 plasma/serum and 99 urine samples from 120 patients with suspected arbovirus infection, including paired samples from 69 cases, were used in this study. The separated plasma or serum samples and urine samples were stored at -80°C until use. RNAs were extracted from sera and urine using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were eluted with 60 μL of elution buffer and stored at -80°C until use.

3.3.3.8 Ethical declaration

This study was approved by the CCS-UFPE Ethical Committee (CAAE: 61603316.7.0000.5208) and all patients gave informed consent. Whole blood and urine samples were collected as part of an education and follow-up campaign for arboviruses and cardiovascular diseases conducted by LIKA in the states of Paraíba and Pernambuco, Brazil in February–July 2016. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Table 1 – Sequences of primers used for digital droplet PCR.

Virus	Primer	Sequence (5'–3')	Reference
<i>DENV serotype 1</i>	CDC DENV-1-F	CAAAAGGAAGTCGYGCAATA	[41]
	CDC DENV-1-R	CTGAGTGAATTCTCTCTGCTRAAC	
<i>DENV serotype 2</i>	CDC DENV-2-F	CAGGCTATGGCACYGTCACGAT	[41]
	CDC DENV-2-R	CCATYTGACAGCARCACCATCTC	
<i>DENV serotype 3</i>	CDC DENV-3-F	GGACTRGACACACGCACCCA	[41]
	CDC DENV-3-R	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGYCT	
<i>DENV serotype 4</i>	CDC DENV-4-F	TTGTCCTAATGATGCTRGTCG	[41]
	CDC DENV-4-R	TCCACCYGAGACTCCTTCCA	
<i>WNV</i>	WNV_10776_Fw WNV_10999_Rv	TGGGTAAACAAAGGCAAAMCA ATCCCAGGTGTCAATATGCTG	This paper
<i>YFV</i>	YFV_14_5UTR_Fw YFV_105_5UTR_Rv	GTGCTAATTGAGGTGCATTGG TCTGCTAATCGCTCAACGAAC	This paper
<i>CHIKV</i>	CHIKV_24_CDS_Fw CHIKV_161_CDS_Rv	GCCTACCAGTTTCTTACTGCTC CCTCAAACATGGGGTACG	This paper
<i>RVFV^a</i>	RVFV_S_70_CDS_Fw RVFV_S_180_CDS_Rv	AGAGTGGTCGTCGTGTTGTG TAGGACGATGGTGCATGAGA	This paper

^aPrimers for RVFV were designed against the S-segment of its genome.

3.3.4 Results

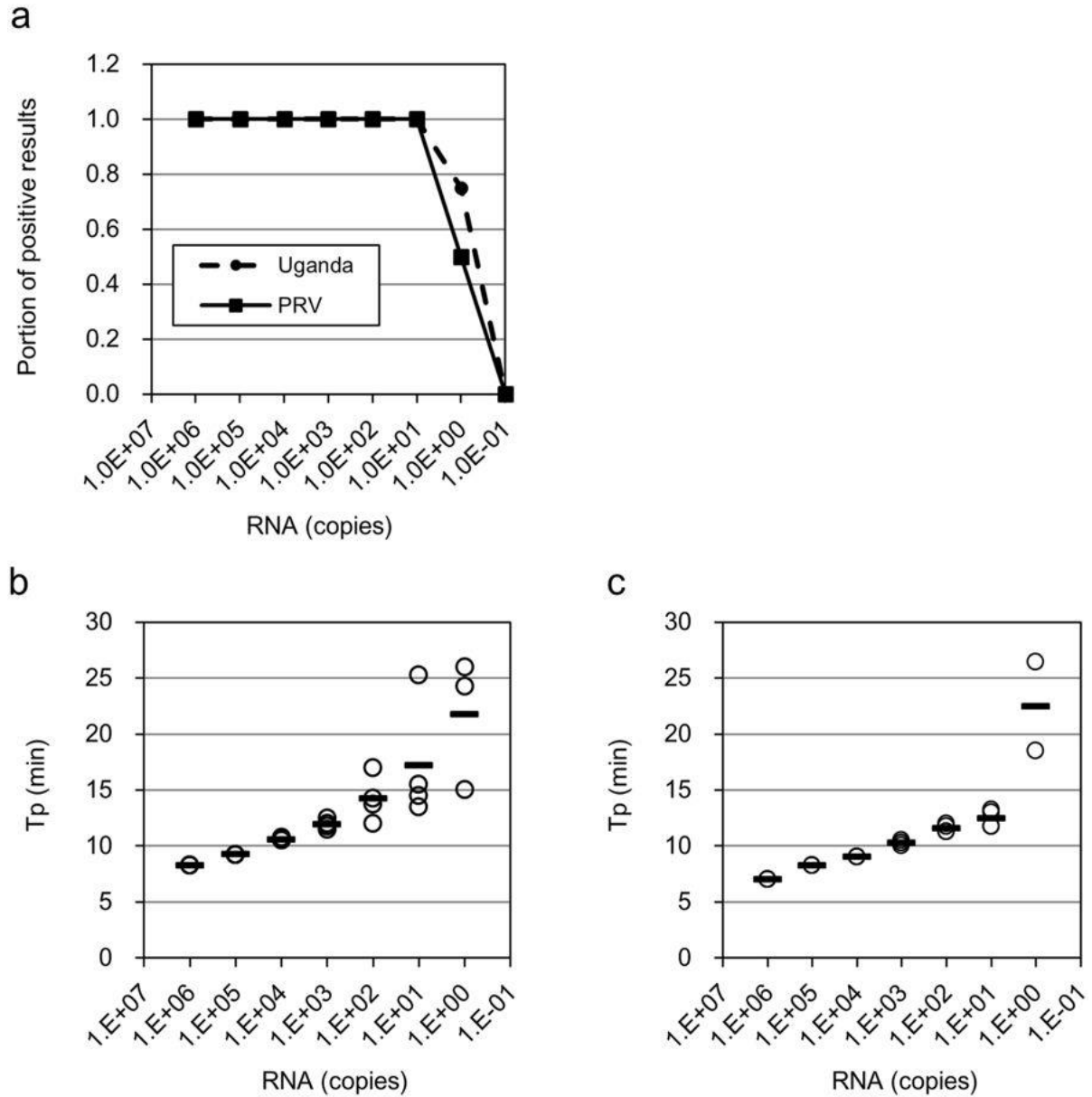
3.3.4.1 Sensitivity

We designed ZIKV genotype-specific LAMP primers that targeted conserved sequences in the E protein-coding region (Table 2). Each genotype-specific primer recognized the same genomic position. To detect all known ZIKV strains, we used a mixture of primers specific for each genotype in a single reaction.

First, we examined the sensitivity of the assay using serial 10-fold dilutions of *in vitro* synthesized standard RNAs from strain 976Uganda, which was isolated from a rhesus macaque in Uganda, and strain PRVABC59, which was isolated at the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) from a patient who travelled to Puerto Rico in 2015³². Ten copies of the RNA standards were detected from both strains in quadruplicate reactions (Fig. 1a). The times to obtain positive results (Tp) for RNA standards ranging from 10^6 to 10^1 copies were mostly less than 15 min, and within this range, Tp was correlated with the number of RNA copies (Fig. 1b and c).

Single copies of the standard RNAs from the 976Uganda and PRVABC59 strains were detected with 75% and 50% positivity, respectively, and Tp values were dispersed. These results suggested that the RT-LAMP assay could be used as a rapid, sensitive diagnostic test for ZIKV, the Tp value (i.e., less than 15 min) can be used as an indicator of the number of RNA copies in each reaction.

Figure 1 – Sensitivity and detection time of the RT-LAMP assay for Zika virus (ZIKV).



(a) Ten-fold serial dilutions of the RNA standards (976Uganda and PRVABC59 strains) were detected by the RT-LAMP assay. All reactions were performed in quadruplicate. Time to obtain positive results (Tp) for reactions with 976Uganda (b) and PRVABC59 (c) were determined using Genelyzer FIII. Each circle indicates the Tp for each reaction. Bars are the mean times of detection at the indicated dilutions.

Table 2 – Sequences of LAMP primers.

Name	Type	Position*	Sequence (5'–3') [†]	Specificity
ZIK- As4-F3	F3	1053–1071	AACATGGAGGTTGTGTCAC	Asian genotype
ZIK- As4-B3	B3	1315–1332	AACTTAGCGCATGTCACC	
ZIK- As4-FIP	FIP (F1c + F2)	1174–1192, 1114–1133	GCTGTCCGAAGCCATGTCT- TACAACAACAGTCAGCAACA	
ZIK- As4-BIP	BIP (B1c + B2)	1199–1220, 1262–1279	CCAACACAAGGTGAAGCCTACC- CCAGCCTCTGTCCACTAA	
ZIK- As4-LF	LF	1149–1170	ATTGATGCCTCATAGCAGTAGG	
ZIK- As4-LB	LB	1222–1242	TGACAAGCAATCAGACACTCA	Asian and African genotype
ZIK- Af41-F3	F3	1053–1071	AACATGGAGGTTG <u>C</u> GTCAC	African genotype
ZIK- Af41-B3	B3	1315–1332	AACTTG <u>G</u> C <u>A</u> CATGTCACC	
ZIK- Af41-FIP	FIP (F1c + F2)	1174–1192, 1114–1133	<u>A</u> CTGTCCGAAGCCATGT <u>C</u> - <u>C</u> AC <u>G</u> ACAAC <u>G</u> GT <u>T</u> AG <u>T</u> AACA	
ZIK- Af41-BIP	BIP (B1c + B2)	1199–1220, 1262–1279	CCAACACAAGGTGAAGCCTACC- CCA <u>A</u> CCTCTGTCCAC <u>C</u> AA	
ZIK- Af41-LF	LF	1149–1170	ATTGATGCCTC <u>G</u> TAGCA <u>A</u> TAGG	

*Primer position in ZIKV strain MR766 (accession number: NC_012532). † Underlining indicates the positions of nucleic acids adapted to the African genotype.

3.3.4.2 Specificity

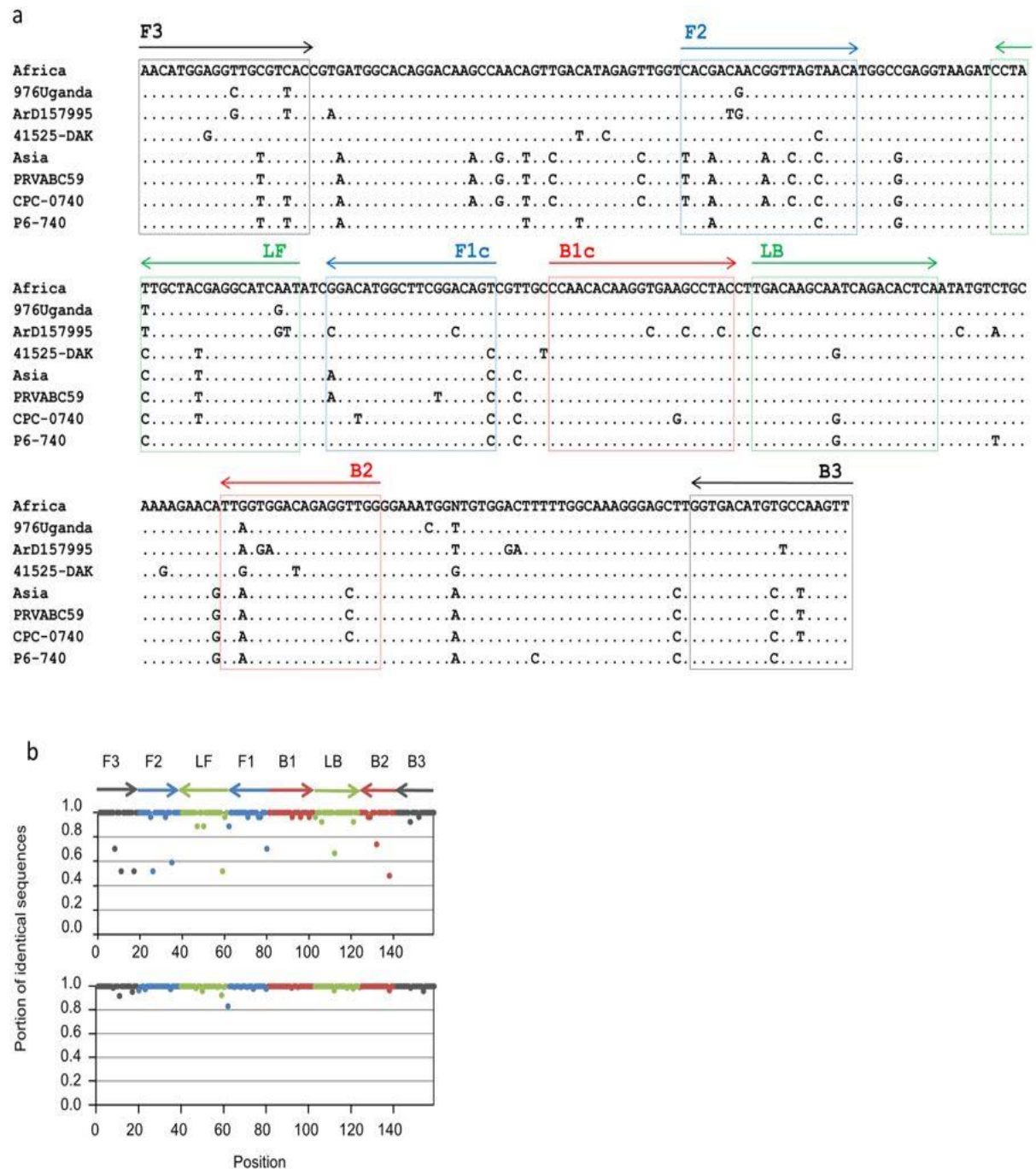
We evaluated the specificity of each primer *in silico* using 176 ZIKV strain sequences available in GenBank as of November 2016. Twenty-seven sequences of African genotype isolates collected in 1947–2001 and 149 sequences of Asian genotype isolates collected in Southeast Asia and Polynesia in 1966–2014 as well as from the current outbreak in the Americas were used for this analysis.

The LAMP primers consist of 159 nucleotides in total length and recognize eight separate sites on ZIKV genome (Fig. 2a). We determined the proportion of sequences that had identical nucleotides at each position for either the Asian or African genotype primers (Fig. 2b). African genotype ZIKV sequences had identical residues at 129 out of 159 positions (81.1%) in the African or Asian genotype-specific primers. At 14 positions in the primer recognition sites, more than 10% of African genotype ZIKV sequences had mismatched nucleotides. At six positions, scattered in the F3, F2, LF, and B2 sites in the Asian and African genotype primers, more than 40% of the African genotype ZIKV sequences had nucleotide differences (Fig. 2b, upper panel).

Asian genotype sequences showed greater identity than African genotype sequences to the LAMP primers. Asian genotype sequences had identical residues at 131 out of 159 positions (82.4%) in the Asian or African genotype primers. For one residue at the 3' terminus of the F1 site of the FIP primers, 16.8% of the Asian genotype sequences had nucleotide differences (Fig. 2b, lower panel). To assess the primer specificity for ZIKV strains, we synthesized RNAs with the partial genome sequences of two African genotype ZIKV strains, 41525-DAK and ArD157995, and two Asian genotype ZIKV strains, P6-740 and CPC-0740, which had more mismatched nucleotides against the primer sequences compared with the average for all strains. These RNA sequences were also detected using the RT-LAMP assay, in addition to the sequences in the 976Uganda and PRVABC59 strains (Table 3).

Furthermore, no cross-reactions with other tested arboviruses, including DENV, YFV, West Nile virus (WNV), CHIKV, and Rift Valley fever virus (RVFV), and *Plasmodium falciparum* were observed. These results suggested that the RT-LAMP assay developed here was highly specific for detecting ZIKV strains of both African and Asian genotypes.

Figure 2 – Specificity of the LAMP primers for ZIKV sequences.



Alignment of ZIKV sequences and positions of LAMP primers (a). Boxes are the sites recognised by each oligonucleotide primer and arrows show the direction of each primer. Africa and Asia in the alignments indicate the consensus sequences of African and Asian genotypes, respectively. The accession numbers for the strains are LC002520.1, KF383118, KF955591, KU501215, HQ234499, and KU681082 (from top to bottom). Proportion of African (upper) and Asian (lower) genotype sequences that had identical nucleic acids with primers at respective positions in the LAMP primers (b).

Table 3 – Species specificity of ZIKV RT-LAMP.

Family	Genus	Species	Strain	Amount of RNA/DNA	Results of RT-LAMP
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	<i>Zika virus</i>	976Uganda	2.0×10^2 copies	+
		<i>Zika virus</i>	PRABC59	2.0×10^2 copies	+
		<i>Zika virus</i>	ArD157995*	2.0×10^2 copies	+
		<i>Zika virus</i>	41525-DAK*	2.0×10^2 copies	+
		<i>Zika virus</i>	CPC-0740*	2.0×10^2 copies	+
		<i>Zika virus</i>	P6-740*	2.0×10^2 copies	+
		<i>Dengue virus serotype 1</i>	Hawaii	2.4×10^4 copies	–
		<i>Dengue virus serotype 2</i>	ThNH7/93	9.5×10^4 copies	–
		<i>Dengue virus serotype 3</i>	PhMH-J1-97	2.2×10^5 copies	–
		<i>Dengue virus serotype 4</i>	SLMC 318	2.1×10^3 copies	–
		<i>Yellow fever virus</i>	17D	2.7×10^4 copies	–
		<i>West Nile virus</i>	NY99	3.5×10^4 copies	–
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	<i>Chikungunya virus</i>	10Mdy30	1.7×10^5 copies	–
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Phlebovirus</i>	<i>Rift Valley fever virus</i>	SPU22/07	5.8×10^5 copies	–
<i>Plasmodiidae</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	3D5	0.5 ng	–

*Synthesised partial genomic RNA sequences were used for these strains.

3.3.4.3 Detection of ZIKV in virus-spiked samples

In the routine molecular diagnosis of ZIKV infection, blood and/or urine is used, since viral RNA can be detected in these clinical specimens during the acute phase of infection. The feasibility of using the RT-LAMP assay for clinical specimens was evaluated using ZIKV-spiked human serum and urine samples. We prepared human serum and urine spiked with four-fold serially diluted ZIKV strain 976Uganda, and obtained samples with titres of 232.7–0.9 TCID₅₀/mL. The sensitivity of the RT-LAMP assay was compared to that of the real time RT-PCR (rRT-PCR) assay developed by the CDC²¹.

Using the RT-LAMP assay, we detected viral RNA in both serum and urine samples at a titre of 14.5 TCID₅₀/mL in quadruplicate reactions. The Ct values in the rRT-PCR were 34.6 ± 0.8 and 35.4 ± 0.4 for serum and urine samples, respectively, which corresponded to 44.3 and 23.5 genome equivalents (geq) per reaction, respectively (Table 4). Using the rRT-PCR assay, we detected viruses in both serum and urine samples at a titre of 3.6 TCID₅₀/mL, which corresponded to 8.8 and 8.9 geq per reaction, respectively; however, the RT-LAMP assay failed for these samples, suggesting that the RT-LAMP assay was less sensitive than the CDC rRT-PCR assay for ZIKV detection. Together with the results obtained using standard RNA shown in Fig. 1, the limit of detection of the RT-LAMP assay was estimated to be 10 copies per reaction. The assay may be sufficiently sensitive for detecting ZIKV in clinical specimens.

Table 4 – Detection of ZIKV in virus-spiked urine and serum samples.

Sample	TCID ₅₀ /mL	RT-LAMP		rRT-PCR		geq/test
		Positive	Tp (min)	Positive	Ct	
Serum	232.7	4/4	12.5 ± 0.5	4/4	31.4 ± 0.2	329.5
	58.2	4/4	13.4 ± 0.9	4/4	33.1 ± 0.4	109.7
	14.5	4/4	14.3 ± 1.5	4/4	34.6 ± 0.8	44.3
	3.6	0/4	—	4/4	37.0 ± 0.7	8.8
	0.9	0/4	—	0/4	—	—
	mock	0/4	—	0/4	—	—
Urine	232.7	4/4	12.3 ± 0.4	4/4	31.0 ± 0.2	423.0
	58.2	4/4	14.4 ± 0.4	4/4	33.1 ± 0.2	105.8
	14.5	4/4	14.6 ± 2.1	4/4	35.4 ± 0.4	23.5
	3.6	1/4	23.8	4/4	37.1 ± 0.8	8.9
	0.9	0/4	—	1/4	37.5	5.8
	mock	0/4	—	0/4	—	—

3.3.4.4 Clinical evaluation of the RT-LAMP assay

We conducted a clinical evaluation of this assay using samples from patients with suspected arbovirus infection in the states of Paraíba and Pernambuco, Brazil in February–July 2016. The samples included 90 plasma/serum and 99 urine samples from 120 suspected arbovirus infection cases, including paired samples from 69 cases. To evaluate the diagnostic accuracy of this assay, we simultaneously conducted the CDC rRT-PCR assay as a reference test. In the RT-LAMP assay, eight out of sixteen serum samples collected in Pernambuco state in February 2016 were positive.

However, all 74 plasma samples as well as urine samples collected in Paraíba state in March and July 2016 were negative. These results were concordant with those of the reference rRT-PCR assay (Table 5). The RT-LAMP assay did not show any false-positive results, even for six confirmed DENV samples (data not shown). The Ct values of these eight ZIKV-positive samples were 19.5–22.9, and the viral loads were estimated to be 1.6×10^6 – 1.4×10^7 geq/mL using the viral RNA standards (Table 6). These viral titres were higher than those reported in previous studies.

To examine whether the assay can detect viral RNA in samples with lower titres, we randomly selected two ZIKV-positive samples confirmed in this study, MRL51 and MRL53, and conducted a dilution test (Table 7). While the RT-LAMP failed to detect samples with the Ct value > 37 , however, it detected viral RNA at the Ct < 37 , consistent with our earlier results obtained using the virus-spiked serum and urine samples (Table 4). These results show that the rRT-LAMP assay had sufficient specificity for the detection of ZIKV as a molecular diagnostic test. The assay can be used to detect an amount of viral RNA equivalent to that yielding Ct values of 36–37 in the reference rRT-PCR test.

Table 5 – Detection of ZIKV in samples from patients with suspected arbovirus infection collected in Paraíba and Pernambuco, Brazil in 2016.

Period	State	Type	No. samples	RT-LAMP		rRT-PCR	
				Positive	Negative	Positive	Negative
February, 2016	Pernambuco	Serum	16	8	8	8	8
March, 2016	Paraíba	Plasma	65	0	65	0	65
July, 2016	Paraíba	Urine	69	0	69	0	69
		Plasma	9	0	9	0	9
		Urine	30	0	30	0	30
Total		Serum/ Plasma	90	8	82	8	82
		Urine	99	0	99	0	99

Table 6 – Viral load in ZIKV-positive samples tested in this study.

Sample ID	RT-LAMP (Tt, min)	rRT-PCR (Ct)	Virus load (geq/ml)
LAV01	8.5	20.4	7.9×10^6
LAV04	8.8	20.8	6.2×10^6
LAV08	7.8	19.5	1.4×10^7
MRL51	8.3	21.6	3.7×10^6
MRL53	9.0	22.9	1.6×10^6
MRL55	8.5	21.4	4.2×10^6
MRL56	8.8	21.3	4.5×10^6
MRL57	8.8	21.2	4.8×10^6

Table 7 – Detection of ZIKV by RT-LAMP and rRT-PCR using diluted ZIKV-confirmed samples.

ID	Dilution ($\times 10^2$)	Estimated RNA copies	RT-LAMP		rRT-PCR	
			Positive	Tp (min)	Positive	Ct
MRL51	1	116.0	3/3	12.4 ± 1.0	3/3	32.9 ± 0.1
	3	38.7	3/3	12.8 ± 1.3	3/3	34.4 ± 0.1
	9	12.9	2/3	13.2 ± 1.1	3/3	36.3 ± 0.6
	27	4.3	0/3		2/3	36.7 ± 0.1
	81	1.4	0/3		1/3	37.2
	243	0.5	0/3		0/3	
MRL53	1	51.2	3/3	11.9 ± 0.4	3/3	34.5 ± 0.1
	3	17.1	3/3	15.8 ± 2.8	3/3	36.2 ± 0.2
	9	5.7	0/3		2/3	37.8 ± 0.1
	27	1.9	0/3		0/3	
	81	0.6	0/3		0/3	
	243	0.2	0/3		0/3	
No template control			0/3		0/3	

3.3.5 Discussion

We developed a rapid molecular detection assay for ZIKV in response to the recent outbreak in South America. LAMP assays and modified diagnostic methods for ZIKV have been reported; however, these molecular techniques have never been evaluated for clinical use^{33,34,35,36}. This is the first evaluation of the clinical usage of a LAMP assay for molecular diagnostic testing in the recent outbreak of ZIKV infections. Since ZIKV shares a vector with DENV and CHIKV, these viral diseases can occur simultaneously, and Northeast Brazil is an endemic area for Dengue and Chikungunya³⁷. Numerous severe mosquito-borne diseases, including arbovirus infections as well as Malaria, share clinical symptoms during the acute phase.

However, ZIKV infection is generally associated with mild symptoms. A major concern with respect to molecular diagnostic testing for ZIKV is the potential for cross-reactivity with other flaviviruses, especially DENV, which have close antigenic relation with ZIKV^{21,23,25,38}. In contrast, our assay showed no cross-reactions with other arboviruses or *P. falciparum*, and did not show false-positive results when applied to ZIKV-negative samples. These results indicated that the RT-LAMP assay is specific for the detection of ZIKV and is a reliable molecular diagnostic test.

Another potential limitation of molecular diagnostic testing is that ZIKV-infected samples often have low titres after the acute or early phase of infection due to rapid clearance by the host immune system. This makes it difficult to identify ZIKV cases, even using RT-PCR-based tests. The limit of detection for this assay was 10 copies for both genotypes. The assay was slightly less sensitive than the CDC rRT-PCR test, which was commonly used to confirm ZIKV infection during the recent outbreak. ZIKV-infected clinical samples often show high Ct values (>35)^{19,23}. However, the ZIKV-positive samples detected in this evaluation showed Ct values of less than 22.9 (more than 1.6×10^6 geq/mL), which was a higher titre than that reported in other studies. To confirm its clinical utility, this assay should be tested using samples with lower titers or borderline ZIKV infections.

It has been reported that viral RNA can be detected for longer periods in urine than in blood^{19,23}. Therefore, we considered urine to be one of the best sample types for detecting ZIKV infections. Recently, Paz-Bailey *et al.* reported contradictory results for the persistence of viral RNA in blood samples of ZIKV patients; RNA can be detected 1 or 2 weeks after the onset of illness¹⁷. In some cases, viral RNA can also be detected at higher titres in saliva than in blood, but persists for shorter periods^{15,17}. It is necessary to determine

the sample types suitable for the RT-LAMP assay and to establish a standardized RNA extraction protocol adjusted to each clinical specimen type in order to improve the sensitivity of this assay.

Owing to the sequence diversity among ZIKV isolates, we designed LAMP primers specific for each genotype and used a mixture of these primers to detect all known isolates of both African and Asian genotypes. As shown in Fig. 2, we conducted an *in silico* evaluation of each primer using available ZIKV sequences. African genotype strains supposedly have a longer history of circulation in African mosquitoes and humans than that of Asian genotype strains¹¹, and African genotype sequences showed a lower identity at some positions in the LAMP primers.

The LAMP primers designed here showed high identities at most positions against the sequences of strains involved in the recent outbreak on the American continent, as well as its ancestral Southeast Asian and Polynesian isolates. During the outbreak of ZIKV in Americas, confirmed or probable ZIKV-infected cases has been continuously reported in Southeast Asia³⁹. Our assay will be useful for virus detection and may contribute to preparedness for future outbreaks in these ZIKV endemic countries as well as in Asia and Africa. However, the evolution of ZIKV sequences must be constantly monitored to guarantee primer specificity.

Using samples obtained from subjects with suspected arbovirus infection, we did not find any ZIKV-positive samples in Paraíba in March or July 2016 by rRT-PCR or our RT-LAMP test. These samples were collected from patients within 1 or 2 weeks after the onset of arbovirus infection-like symptoms as part of an education and follow-up campaign for cardiovascular diseases. Many samples might have been collected after the acute or early stage of infection. In addition, when this campaign was conducted, the prevalence of ZIKV infection may have been low, since most cases were reported from November 2015 to March 2016⁴⁰, which is closely linked to the ecology of the vector *Aedes* mosquito.

The main advantages of this assay are its speed (positive results can be obtained within 15 min) and the use of a battery-operated portable device. Since the device has a user-friendly interface, training is not necessary to conduct the assay and interpret the results. Recently, freeze-dried reagents for LAMP assays have been made available; making cold-chain-free LAMP assays a possibility. Our assay is suitable for use in field surveillance or remote areas where it is difficult to implement laboratory diagnostic tests. The assay should be evaluated in a prospective study to confirm its utility for molecular diagnostic

testing, especially under limited resources and by field laboratories in ZIKV endemic countries.

3.3.6 Conclusion

In this paper, we successfully developed a RT-LAMP assay for the detection of ZIKV by designing Asian and African genotype-specific primers. The assay showed results consistent with those of the reference rRT-PCR assay in diagnostic tests with suspected cases of ZIKV infection. Our results provide a potential new molecular diagnostic test for ZIKV and may serve as a basis for the development of alternative rapid diagnostic techniques to prepare for potential outbreaks.

References

1. Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M. & Honein, M. A. Zika Virus. *N Engl J Med* **374**, 1552–1563 (2016).
2. Wikan, N. & Smith, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect Dis* **16**, e119–126 (2016).
3. Campos, G. S., Bandeira, A. C. & Sardi, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* **21**, 1885–1886 (2015).
4. Mlakar, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* **374**, 951–958 (2016).
5. Schuler-Faccini, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, 59–62 (2016).
6. de Araujo, T. V. et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis* **16**, 1356–1363 (2016).
7. Franca, G. V. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* **388**, 891–897 (2016).
8. Barjas-Castro, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* **56**, 1684–1688 (2016).
9. Hills, S. L. et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, 215–216 (2016).
10. Moreira, J., Peixoto, T. M., Machado de Siqueira, A. & Lamas, C. C. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* (2017).
11. Faye, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2636 (2014).
12. Musso, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis* **21**, 1887 (2015).
13. Faria, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345–349 (2016).
14. Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. & Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* **21**, 84–86 (2015).
15. Musso, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* **68**, 53–55 (2015).

16. Bingham, A. M. et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease - Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **65**, 475–478 (2016).
17. Paz-Bailey, G. et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Preliminary Report. *N Engl J Med* (2017).
18. St George, K. et al. Zika Virus Testing Considerations: Lessons Learned from the First 80 Real-Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State. *J Clin Microbiol* **55**, 535–544 (2017).
19. Fourcade, C. et al. Viral load kinetics of Zika virus in plasma, urine and saliva in a couple returning from Martinique, French West Indies. *J Clin Virol* **82**, 1–4 (2016).
20. Faye, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virol J* **10**, 311 (2013).
21. Lanciotti, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* **14**, 1232–1239 (2008).
22. Waggoner, J. J. & Pinsky, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol* **54**, 860–867 (2016).
23. Campos Rde, M. et al. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J Clin Virol* **77**, 69–70 (2016).
24. Abd El Wahed, A. et al. Rapid Molecular Detection of Zika Virus in Acute-Phase Urine Samples Using the Recombinase Polymerase Amplification Assay. *PLoS Curr* **9** (2017).
25. Tappe, D. et al. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill* **19** (2014).
26. Felix, A. C. et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol* **89**, 1477–1479 (2017).
27. Notomi, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**, E63 (2000).
28. Hong, T. C. et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* **42**, 1956–1961 (2004).
29. Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N. & Kanda, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol* **53**, 1–5 (2015).
30. Kurosaki, Y. et al. Deployment of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Ebola Virus Surveillance in Remote Areas in Guinea. *J Infect Dis* **214**, S229–S233 (2016).

31. Kurosaki, Y. et al. Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004472 (2016).
32. Yun, S. I. et al. Complete Genome Sequences of Three Historically Important, Spatiotemporally Distinct, and Genetically Divergent Strains of Zika Virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announc* **4** (2016).
33. Wang, X. et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* **238**, 86–93 (2016).
34. Tian, B. et al. Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. *Biosens Bioelectron* **86**, 420–425 (2016).
35. Song, J. et al. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. *Anal Chem* **88**, 7289–7294 (2016).
36. Lee, D. et al. Simple and Highly Sensitive Molecular Diagnosis of Zika Virus by Lateral Flow Assays. *Anal Chem* **88**, 12272–12278 (2016).
37. Pessoa, R. et al. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine (Baltimore)* **95**, e3201 (2016).
38. Zammarchi, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol* **63**, 32–35 (2015).
39. Duong, V., Dussart, P. & Buchy, P. Zika virus in Asia. *Int J Infect Dis* **54**, 121–128 (2017).
40. Pan American Health Organization and World Health Organization. Zika – Epidemiological Update 10 March.
http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599&Itemid=41691&lang=en (2016).
41. Santiago, G. A. et al. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2311, (2013).

Acknowledgements

The authors would like to thank Sayaka Okada, Shota Koyano and Olamide K. Oloniniyi for technical assistance with the experiments at Nagasaki University, Renato P. Melo Neto and Carlos Henrique M. Castelletti for bioinformatics support at LIKA, and all members of the staff for their hospitality during the visit when the main results of this paper were obtained. This work was supported by the Japan Agency for Medical Research and Development, Japan Society for the Promotion of Science Research Fellowship PD (15J06242), National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq - 459406/2014-0), and Foundation for Science and Technology of Pernambuco (FACEPE - APQ-0142-2.08/2016).

Author information

Affiliations

1. Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan: Yohei Kurosaki, Mayuko Kimura, Haruka Abe, Rokusuke Yoshikawa & Jiro Yasuda.
2. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, 50670-901, Brazil: Danyelly Bruneska Gondim Martins, Andriu dos Santos Catena, Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba, Sandra da Silva Mattos & José Luiz de Lima Filho
3. Graduate School of Biomedical Sciences and Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Nagasaki University, Nagasaki, 852-8523, Japan: Jiro Yasuda.

Contributions

Y.K., D.B.G.M., J.L.L.F., and J.Y. designed the experiments and analysed the data. Y.K., D.B.G.M., M.K., A.d.S.C., M.A.C.S.M.B., S.d.S.M., H.A., R.Y., and J.Y. performed the experiments. Y.K. and H.A. performed sequence analysis and designed the primers. Y.K., D.B.G.M., and J.Y. wrote the paper and prepared all of the figures and tables.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13836-9>. Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests. Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Corresponding author

Correspondence to Jiro Yasuda.

ANEXO A – QUESTIONÁRIO SINTOMATOLÓGICO



1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO		DATA:
Grupo do participante ☐ caso ☐ controle <i>(preenchimento posterior)</i>		
Número do prontuário	Código LIKA	
Local de coleta		
Já teve: ☐ Dengue Quando: _____ ☐ Zika Quando: _____ ☐ Chikungunya Quando: _____ Quantas vezes? _____ Foi avaliada no posto de saúde? ☐ sim ☐ não ☐ NS/NR Foi confirmado pelo laboratório: ☐ sim ☐ não ☐ NS/NR ☐ outros _____		
Quais dos sintomas abaixo você teve nas infecções anteriores: ☐ Afta ☐ Dor nas articulações ☐ Inchaço ☐ Conjuntivite ☐ Moleza ☐ Rash cutâneo ☐ Dor nos olhos ☐ Vômito ☐ Olhos vermelhos ☐ Paralisia dos membros ☐ Febre alta ☐ Dor no corpo ☐ Diarréia ☐ Placas vermelhas ☐ Alteração na visão ☐ Febre constante ☐ Dor de cabeça ☐ Sangramento ☐ Formigamento ☐ Alteração na visão		
Qual medicamento foi utilizado DURANTE AS REFERIDAS INFECÇÕES ANTERIORES? ☐ Anti-térmico (Tylenol, etc) Qual? _____ Por quanto tempo: _____ ☐ Anti-inflamatório (Ibuprofeno, etc) Qual? _____ Por quanto tempo: _____ ☐ Corticóide Qual? _____ Por quanto tempo: _____		
Tem utilizado repelente? ☐ sim ☐ não ☐ NS/NR		
Qual o nome?		
Quantas pessoas no domicílio TEM os mesmos sintomas que você:		
Quantas pessoas no domicílio TIVERAM os mesmos sintomas que você:		
Quais dos sintomas abaixo você tem atualmente? ☐ Afta ☐ Moleza ☐ Paralisia dos membros ☐ Formigamento ☐ Diarréia ☐ Alteração na visão ☐ Sangramento ☐ Alteração na visão		
Qual medicamento está utilizado DURANTE A INFECÇÃO ATUAL ? ☐ Anti-térmico (Tylenol, etc) Qual? _____ Por quanto tempo: _____ ☐ Anti-inflamatório (Ibuprofeno, etc) Qual? _____ Por quanto tempo: _____ ☐ Corticóide Qual? _____ Por quanto tempo: _____		

Entrevistador _____

Data: _____

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES EM INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS E DOENÇAS CORRELATAS

Pesquisador: José Luiz de Lima Filho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61603316.7.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.815.581

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa do Professor José Luiz de Lima Filho. O projeto consiste na identificação de alvos moleculares das infecções por arbovírus e doenças correlatas. Para tanto serão coletadas amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovírus além de serem utilizadas amostras já disponíveis no banco de amostras do LIKA (amostras controle anteriores aos surtos). Testes moleculares e sorológicos para diagnóstico diferencial de arboviroses serão realizados e utilizados como parâmetro para análise dos resultados obtidos em dispositivos point-of-care desenvolvidos no LIKA, assim como comparados com outras metodologias diagnósticas. Análises computacionais e moleculares serão realizadas buscando determinar marcadores da infecção que possam ser considerados de susceptibilidade/resistência e/ou alvos moleculares para terapias. Para tanto, amostras biológicas e informações clínicas serão coletadas de 1000 pacientes suspeitos de infecção por Zika. As amostras de sangue e urina serão coletadas nas unidades de saúde e processadas no LIKA. Os pacientes participantes terão os resultados moleculares para infecção por ZIKV, DENV ou CHIKV anexados aos seus prontuários para permitir um acompanhamento adequado pela equipe médica. Os dados obtidos serão publicados mantendo a sigilo em relação à identidade dos pacientes. Dissertações de mestrado e teses de doutorado estão vinculadas ao desenvolvimento deste projeto, que já conta com recursos

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.815.581

para sua realização. Espera-se capacitar profissionais e estudantes da área de saúde, além das publicações e patentes registradas durante o desenvolvimento deste projeto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar alvos moleculares das infecções por Arbovírus e doenças correlatas.

Objetivo Secundário:

1. Coletar amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovírus; 2. Utilizar amostras clínicas coletadas previamente ao surto de infecção pelo ZIKV que estejam disponíveis no LIKA seguindo o mesmo protocolo de coleta e armazenamento; 3. Identificar o melhor tipo de amostra biológica para realização do diagnóstico diferencial de ZIKV, DENV e CHIKV; 4. Desenvolver metodologias de diagnóstico point-of-care; 5. Realizar testes sorológicos para diagnóstico diferencial de arboviroses; 6. Realizar diagnóstico molecular das arboviroses através de metodologias previamente aprovadas pelo CDC; 7. Testar diferentes métodos e metodologias diagnósticas e comparar aos dados da metodologia aprovado pelo CDC; 8. Analisar alvos moleculares de potencial prognóstico para pacientes infectados pela ZIKV; 9. Analisar alvos moleculares em amostras de pacientes com alterações relatadas como decorrentes da infecção pelo ZIKV; 10. Realizar isolamento viral nas amostras de pacientes infectados por ZIKV; 11. Realizar testes estatísticos para correlacionar os dados obtidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são aqueles inerentes à coleta de sangue rotineira (dor no local da picada da agulha e/ou mancha roxa após a coleta) e a possível perda das amostras decorrente de problemas na coleta, na manipulação ou no armazenamento das amostras, que poderá ocasionar uma nova coleta. Como forma de amenizar os possíveis riscos toda a coleta será realizada em local apropriado nas instalações das unidades de saúde por profissionais qualificados.

Benefícios:

O benefício para o voluntário será o recebimento de diagnóstico das possíveis infecções pelos Arbovírus (zika, dengue e chikungunya), a serem incluídos em prontuário, o que auxiliará os médicos no direcionamento do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa que visa a identificação rápida das arboviroses que estão assolando o país. Tem sua grande importância na atenção rápida ao paciente.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.815.581

Outros	cvfabricio.pdf	03/11/2016 12:04:12	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvfabio.pdf	03/11/2016 12:03:44	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvelias.pdf	03/11/2016 12:03:02	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvdayse.pdf	03/11/2016 12:02:37	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvdanysantos.pdf	03/11/2016 12:02:18	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvcarolina.pdf	03/11/2016 12:02:01	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvbruneska.pdf	03/11/2016 12:01:47	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Outros	cvjoseluiz.pdf	03/11/2016 11:56:48	José Luiz de Lima Filho	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostro.pdf	03/11/2016 11:52:26	José Luiz de Lima Filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Novembro de 2016

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Prof. Luciano Tavares Montenegro
Coordenador do CEP/CCS/UFPE
CIAPE Nº 1130870
UFPE

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br