

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Monique Mendes de Oliveira

**REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE OS TESTES DIAGNÓSTICO DA FEBRE  
DE CHIKUNGUNYA**

Rio de Janeiro  
2018

Monique Mendes de Oliveira

**REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS DA FEBRE  
DE CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços

Tutora: Marisa Coelho Adati

Preceptores: Helena C. B. G. Borges

Álvaro S. Ribeiro

Orientação: Marli Melo da Silva

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Oliveira, Monique Mendes de

Revisão integrativa sobre os testes diagnósticos da febre de Chikungunya. /  
Monique Mendes de Oliveira. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

60 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Vigilância Sanitária) –  
Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Tutora: MSc. Marisa Coelho Adati

Preceptores: Dra. Helena C. B. G. Borges e MSc. Álvaro S. Ribeiro

Orientação: Dra. Marli M. da Silva.

1. Febre de Chikungunya. 2. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos. 3.  
Sensibilidade e Especificidade. I. Título

Monique Mendes de Oliveira

**REVISÃO INTEGRATIVA SOBRE OS TESTES DIAGNÓSTICOS DA FEBRE  
DE CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Fausto Klabund Ferraris (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Helena Cristina Balthazar Guedes Borges (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marli Melo da Silva (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a todos que estiveram dispostos a me ensinar, aos que me ajudaram na confecção deste trabalho e a todos aqueles anseiam por conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por ter me ajudado a superar todas as dificuldades, pela Sua misericórdia e por Seu amor infinito.

À minha família. Meus pais, Humberto e Maria do Carmo; minhas irmãs, Dominique, Ana Gabriela e Lola; e ao meu cunhado, Daniel; por todo apoio e compreensão, por estarem ao meu lado durante toda minha trajetória, pelas palavras de ânimo e de incentivo e, principalmente, por me sustentarem nos momentos de maior dificuldade. Obrigada, amo vocês.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Sangue e Hemoderivados por todo aprendizado. Em especial à Sabrina e Valéria pela empatia, pelo companheirismo e pelo carinho que sempre tiveram comigo, vocês tornaram os meus dias muito melhores. À minhas orientadoras, Marli Melo e Marisa Adati. Em especial à Marisa por ter sido firme e pela determinação em me ensinar a ser uma profissional capacitada, forte, responsável e a sempre ir além dos meus limites. Mesmo muitas vezes sendo dura demais, me preparou para o mercado de trabalho e, também, para a vida. Agradeço também ao Ministério da Saúde por subsidiar esta etapa da minha jornada profissional.

À equipe da Vigilância Sanitária do RJ, em especial à Saúde do Trabalhador por todo o aprendizado adquirido, pelo carinho, momentos de alegria e excelente tratamento. Agradeço aos professores do INCQS por todo conhecimento adquirido.

Aos meus amigos da turma de Residência. Obrigada pela companhia, pelo suporte e por me fazerem acreditar que a amizade deixa tudo mais fácil. Especialmente a minha amiga Paulinha, pelos oito anos de companhia, pelas palavras de coragem e por partilhar de todos os momentos, sempre ao meu lado. Desejo muito sucesso a todos!

À todos que de alguma forma estiveram presentes em meu caminho, me auxiliando a ser uma pessoa melhor, agradeço de coração.

“Não seja melhor que ninguém, seja apenas diferente e lute pelos seus objetivos”.

Ananda de Almeida Fonseca

## RESUMO

A Febre de Chikungunya é causada pelo vírus Chikungunya (VCHIK), um arbovírus de genoma RNA, de cadeia simples, com polaridade positiva e pertencente à família *Togaviridae*. A transmissão ocorre pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *A. aegypti* e o *A. albopictus* as espécies mais comumente infectadas no Brasil. O período de incubação ocorre de 2-12 dias e dentre os acometidos há uma porcentagem que não apresenta os sintomas da doença. A infecção aguda típica em pacientes sintomáticos varia de leve a moderada com recuperação de 2 a 4 semanas. A doença é caracterizada por início repentino de febre intensa, dores intensas nas articulações (artralgia) de pés e mãos (dedos, tornozelos e pulsos) e sintomas menos evidentes como cefaleia e manchas vermelhas na pele. O Ministério da Saúde definiu como casos suspeitos da doença todos os indivíduos que apresentem febre de início súbito acima de 38,5°C, forte artralgia e que apresentem histórico de viagem recente à áreas de circulação contínua do vírus. Até o momento, não existe um tratamento específico para a doença, sendo tratados apenas os sintomas através de medicação para a febre e para as dores articulares. O diagnóstico laboratorial da doença é realizado através de testes moleculares e de testes sorológicos, sendo realizada a pesquisa de antígenos ou de anticorpos específicos. Devido aos surtos de ampla magnitude que acometeram a população mundial nos últimos anos, foram desenvolvidos *kits* para o diagnóstico laboratorial da doença. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão integrativa acerca das informações disponíveis na literatura sobre os parâmetros de sensibilidade e especificidade dos *kits* para diagnóstico da doença comercializados nos mercados nacional e mundial. A metodologia utilizada para realizar este trabalho foi a busca em bases de dados científicos, como Medline, Scopus, Web of Science, PubMed e SciELO, constando termos chaves como: “*Chikungunya diagnosis*”, “*Tests for diagnosis of Chikungunya fever*”, “*Commercially assays for Chikungunya’s diagnosis*”, sendo realizada de junho de 2017 à janeiro de 2018 e selecionando ao todo 4 artigos. Como resultado, pôde-se notar uma grande diferença nos valores de sensibilidade e especificidade dos testes, variando principalmente com o tipo de metodologia adotada, sendo o RT-PCR a metodologia com melhores

valores de sensibilidade e especificidade e o Teste rápido a metodologia com piores valores. Como o RT-PCR apresenta alto custo, uma opção mais econômica e que mantém o bom desempenho é a Imunofluorescência Indireta. De forma geral, os valores de sensibilidade e especificidade são baixos, concluindo-se que os *kits* disponíveis no mercado apresentam uma grande variação de desempenho. Espera-se que com as novas pesquisas e tecnologias, sejam desenvolvidos produtos mais sensíveis, específicos e acessíveis.

Palavras-chaves: Febre de Chikungunya. Métodos Diagnósticos. Sensibilidade, Especificidade.

## ABSTRACT

Chikungunya fever is caused by the Chikungunya Virus (VCHIK), a single-stranded, positive-stranded RNA genome arbovirus, belonging to the Togaviridae family. The transmission occurs through the female bite of mosquitoes of the genus *Aedes*, with *A. aegypti* and *A. albopictus* being the most commonly infected species in Brazil. The incubation period occurs for 2-12 days and among those affected there is a percentage that does not present the symptoms of the disease. The typical acute infection in symptomatic patients ranges from mild to moderate with recovery from 2 to 4 weeks. The disease is characterized by sudden onset of severe fever, severe pain in the joints (arthralgia) of the feet and hands (fingers, ankles and wrists) and less obvious symptoms such as headache and red patches on the skin. The Ministry of Health defined as suspected cases of the disease all individuals who present fever of sudden onset above 38.5°C, strong arthralgia and that present recent history of travel to areas of continuous circulation of the virus. Until now, there is no specific treatment for the disease, and only symptoms are treated through fever and joint pain medication. The laboratory diagnosis of the disease is carried out through molecular tests and serological tests, and the investigation of antigens or specific antibodies is carried out. Due to the outbreaks of large magnitude that have affected the world population in the last years, *kits* have been developed for the laboratory diagnosis of the disease. The objective of the present work was to carry out an integrative review about the information available in the literature on the sensitivity and specificity parameters of the disease diagnosis *kits* marketed in the national and world markets. The methodology used to perform this work was the search in scientific databases such as Medline, Scopus, Web of Science, PubMed and SciELO, with key terms such as: "Chikungunya diagnosis", "Tests for diagnosis of Chikungunya fever", "Commercially assays for Chikungunya's diagnosis", being held from June 2017 to January 2018 and selecting in all 4 articles. As result, a great difference could be observed in the sensitivity and specificity values of the tests, varying mainly with the type of methodology adopted, with RT-PCR being the methodology with the best sensitivity and specificity values and the Rapid Test the methodology with the worst values. Because RT-PCR is expensive, a more

economical option that maintains good performance is the Indirect Immunofluorescence. In general, the sensitivity and specificity values are low, and it is concluded that the *kits* available in the market show a great variation in performance. It is hoped that with the new research and technologies, more sensitive, specific and accessible products will be developed.

Key-words: Chikungunya Fever. Diagnostic Methods. Sensitivity, Specificity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de casos prováveis e incidência de febre de Chikungunya (/100 mil hab.), até a Semana Epidemiológica 52, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2016 e 2017.....	22
Tabela 2. Comparativo entre Dengue, Zika e Chikungunya. ....	26
Tabela 3 - Relação dos <i>kits</i> referentes aos artigos selecionados.....	41
Tabela 4 - Resultados dos testes para diagnóstico sorológico do painel A .....	42
Tabela 5 - Resultados dos testes para diagnóstico sorológico do painel B mais Mayaro e O'nyong-nyong .....	43
Tabela 6 - Dados de sensibilidade, especificidade, Falso-positivos e Falso-negativos dos <i>kits</i> analisados .....	43
Tabela 7 - Resultados da imunofluorescência indireta.....	45
Tabela 8 - Valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de IgM e IgG. ....	46
Tabela 9 - Resultados ICT e ELISA IgM .....	46
Tabela 10 - Resultados obtidos por laboratório.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vírus Chikungunya (VCHIK) .....	15
Figura 2 - Genoma do Alphavírus .....	16
Figura 3 - Estrutura genômica do Vírus Chikungunya .....	16
Figura 4 - <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> .....	17
Figura 5 - Ciclo de vida do gênero <i>Aedes</i> .....	19
Figura 6 - Casos prováveis de Febre de Chikungunya, por SE no Brasil nos anos 2015, 2016 e 2017.....	21
Figura 7 - (A) Erupção maculopapular difusa, articulações rígidas e inchaço consistente; (B) Rash maculopapular .....	23
Figura 8 - Etapas de um RT-PCR para obtenção de múltiplas cópias de DNA a partir de RNA.....	29
Figura 9 - Etapas realizadas durante um ELISA indireto.....	30
Figura 10 - ELISA sanduíche para captura de IgM .....	31
Figura 11 - Teste Rápido para detecção de anticorpos IgM contra Chikungunya.....	32
Figura 12 - Imunofluorescência Indireta .....	33
Figura 13 - Fluxograma de seleção de artigos na presente revisão integrativa .....	38
Figura 14 - Evolução imunológica durante a Febre de Chikungunya .....	40
Figura 15 - Resultado obtido comparando o RT-PCR <i>in-house</i> e o comercial .....	48
Figura 16 - Avaliação de ensaios para detecção de IgM disponíveis comercialmente segundo o CDC .....	53

## LISTA DE SIGLAS

cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DENV	Vírus Dengue
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático)
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa
SE	Semana Epidemiológica
VCHIK	Vírus Chikungunya
WHO	World Health Organization
VZIK	Vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 O vírus</b> .....	15
<b>1.2 Vetor</b> .....	17
<b>1.3 Febre de Chikungunya</b> .....	20
1.3.1 Epidemiologia .....	20
1.3.2 Sinais e sintomas.....	22
1.3.3 Tratamento .....	23
<b>1.4 Diferenças clínicas entre doenças similares</b> .....	25
<b>1.5 Métodos para diagnóstico da doença</b> .....	26
1.5.1 Testes Moleculares.....	27
1.5.1.1 <i>Amplificação de Ácidos Nucleicos</i> .....	28
1.5.2 Testes Sorológicos .....	29
1.5.2.1 <i>ELISA, Teste Rápido e Imunofluorescência</i> .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3 OBJETIVO</b> .....	35
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	35
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	35
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>5.1 Seleção dos artigos</b> .....	38
<b>5.2 Atributos de sensibilidade e especificidade</b> .....	39
<b>5.3 Resultados</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Saúde Pública do país tem enfrentado um enorme desafio: controlar o mosquito *Aedes aegypti* (LINNAEUS, 1762), considerado o principal vetor dos quatro sorotipos do vírus da dengue circulantes no Brasil (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), além de transmitir os arbovírus Chikungunya e Zika, recém-emergidos no Brasil (ZARA et al, 2016). O aparecimento de doenças utilizando como vetor o *Aedes aegypti* foram descritos inicialmente por volta de 1762 por *Linnaeus* no Egito, nesta ocasião o mosquito já se fazia presente em várias regiões da América, Ásia e Índia (CHRISTOPHERS, 1960).

No Brasil, o combate ao *Aedes aegypti* foi sistematizado e intensificado no século XX, sendo o objetivo principal combater a febre amarela urbana que assolava a população na ocasião. Várias formas de combate ao vetor foram realizadas, como a eliminação mecânica de criadouros e o uso de larvicidas e inseticidas (ZARA et al, 2016). Entre os anos de 1958 e 1973, o Brasil erradicou o *Aedes aegypti*, porém o acelerado crescimento da população na década de 70, a urbanização e falhas na vigilância epidemiológica fizeram com que o vetor fosse reintroduzido no país (MACIEL et al, 2008).

O mosquito transmissor da Dengue, Zika e Chikungunya se faz presente em todo território nacional, onde o ambiente urbano favorece a vasta disseminação do mesmo. É fácil encontra-lo em recipientes como copos, tampinhas, sacolas entre outros, abandonados e a céu aberto, onde haja água parada, tornando-se um local propício para seu criadouro, o que vem a favorecer a proliferação da espécie nos ambientes de convívio humano (CHRISTOPHERS, 1960).

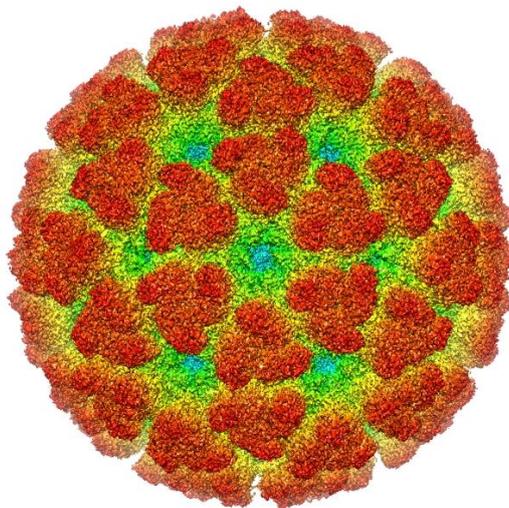
Os surtos atuais das arboviroses supracitadas, em especial a Febre de Chikungunya que será abordada neste trabalho, destacam a importância de compreender os fatores epidemiológicos que contribuem para essas epidemias, promovendo a patogenicidade e afetando as medidas de controle (BURT et al, 2017).

## 1.1 O vírus

O vírus Chikungunya (VCHIK) é um *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*, originário da África e foi o primeiro vírus deste gênero transmitido a humanos durante os anos 50 e desde então tem aumentado nos países da África e Ásia, sendo transmitido pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SHUKLA et al, 2009). O nome Chikungunya é derivado da língua falada pelo grupo étnico Makonde, que habita algumas regiões da Tanzânia e de Moçambique, e significa “aquele que se contorce”, devido as dores articulares causadas pela doença (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

Os *Alphavirus* são vírus envelopados e de aparência esférica, possuem cerca de 70 nm de diâmetro com um capsídeo icosaédrico e genoma constituído de RNA fita simples linear de polaridade positiva, Figura 1 (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Apesar de terem sido originalmente classificados junto aos vários grupos de vírus transmitidos de forma predominante por insetos, análises mais recentes redefiniram como uma família distinta (*Togaviridae*), com dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus* (LOPES et al, 2014). Outras viroses desse gênero que infectam humanos e são semelhantes ao VCHIK são: Mayaro, Ross River e O'nyong'nyong (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

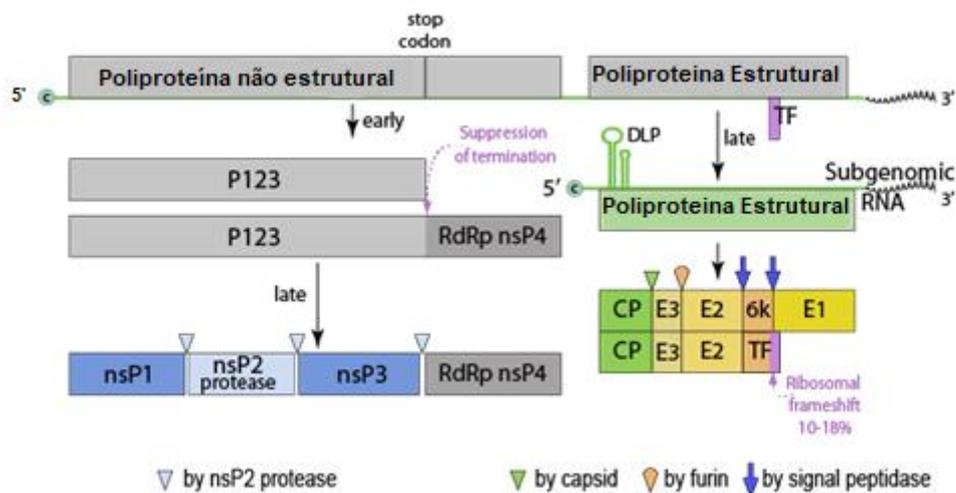
Figura 1 - Vírus Chikungunya (VCHIK)



Fonte: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/eb/Emd-5577.jpg>

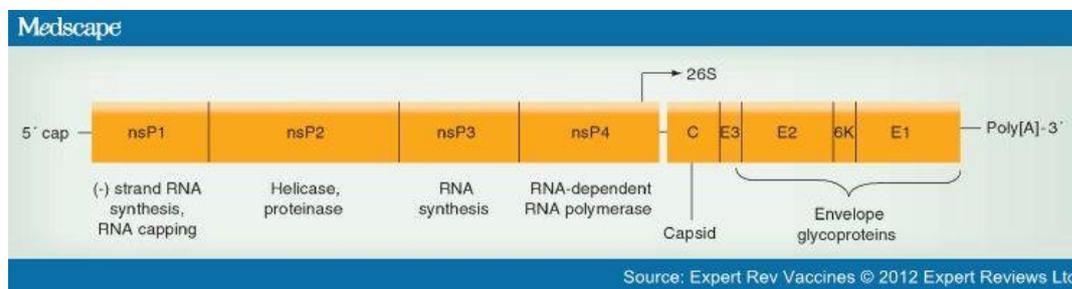
O vírus Chikungunya apresenta um genoma de aproximadamente 12kb, que codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1-4) e 5 estruturais (C, E3, E2, 6K e E1), conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3 (BURT et al, 2017).

Figura 2 - Genoma do Alphavírus



Fonte: [http://education.expasy.org/images/Alphavirus\\_genome.png](http://education.expasy.org/images/Alphavirus_genome.png).

Figura 3 - Estrutura genômica do Vírus Chikungunya



Fonte: <http://img.medscape.com/article/774/865/774865-fig1.jpg>.

Os isolamentos virais mostraram uma mutação da glicoproteína E1, a qual consiste na troca de uma alanina por uma valina na posição 226 (E1-A226V). Essa mutação está localizada próximo a uma região que é conhecida por induzir a diminuição da dependência de colesterol, consequentemente aumentando a infectividade viral (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). A mutação causou aumento da replicação, da disseminação e da transmissão através da espécie *Aedes albopictus* (BURT et al, 2017), implicando no aumento de surtos da doença e

em novos casos reportados nas regiões temperadas (LOUNIBOS; KRAMER, 2015; ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015).

Análises filogenéticas dos genes de E1 concluíram que existem três genótipos do Vírus: 1) Asiático, 2) do Oeste da África, e 3) do Leste, do Centro e do Sul (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; SHUKLA et al, 2009). A caracterização genética mostrou que o genótipo atuante no Caribe e nas Américas é o genótipo asiático, muito semelhante às cepas que circulam no Filipinas (2013), China (2012) e Yap (2013), no sudeste da Ásia. Além disso, cepas do genótipo do Leste, do Centro e do Sul da África foram identificados no Brasil em 2014 e se assemelham as cepas que circulam em Angola, com evidência de infecção ocorrendo em locais residentes sem histórico de viagem (BURT et al, 2017).

Embora o vírus não cause uma elevada taxa de mortalidade, o mesmo é responsável por um grande impacto socioeconômico devido a diversas comorbidades que criam uma grande demanda na saúde pública (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015).

## 1.2 Vetor

As fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes* são as responsáveis pela transmissão do Vírus Chikungunya, sendo as principais espécies o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, Figura 4. Quando a doença foi identificada em 1953, esta foi detectada nas regiões rurais tropicais, no sangue de pacientes que apresentavam febre alta e de várias espécies de mosquito (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015).

Figura 4 - *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*



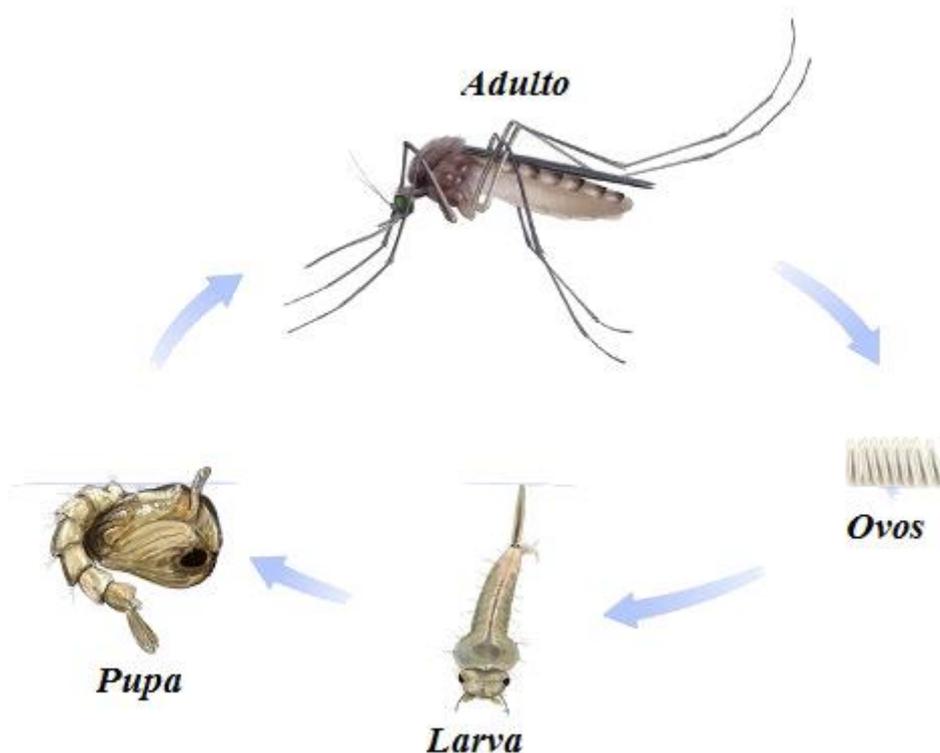
Fonte: [http://consenfmh.blogspot.com.br/2015/01/febre-chikungunya\\_23.html](http://consenfmh.blogspot.com.br/2015/01/febre-chikungunya_23.html)

Esses vetores são reconhecidos por sua alta capacidade invasiva e por figurarem tanto na zona rural quanto na zona urbana. Alimentam-se preferencialmente de humanos, no entanto a espécie *Aedes albopictus* é a mais oportunista, alimentando-se também de outras espécies de mamíferos e aves (LOUNIBOS; KRAMER, 2015). Outra característica destes vetores é que ambos são encontrados nas regiões tropicais e subtropicais, contudo a espécie *Aedes albopictus* apresenta uma distribuição mais ampla, sendo encontrado também nas regiões temperadas (BURT et al, 2017).

O ciclo de vida dos mosquitos do gênero *Aedes* compreende as fases: ovo, larva, pupa e adulto, na qual a maior parte do tempo se desenvolve no ambiente aquático, Figura 5. De acordo com o Instituto Oswaldo Cruz, em condições ambientais favoráveis, após a eclosão do ovo, o desenvolvimento do mosquito até a forma adulta pode levar um período de 10 dias. Por isso, a eliminação de criadouros deve ser realizada pelo menos uma vez por semana, assim o ciclo de vida do mosquito será interrompido. O *Aedes* coloca seus ovos, preferencialmente, nas paredes de criadouros com água limpa e parada, bem próximo à superfície da água. Daí a importância de lavar, com escova ou palha de aço, as paredes dos recipientes que não podem ser eliminados, onde o ovo pode permanecer grudado (Instituto Oswaldo Cruz, [s.d.]).

Pesquisas realizadas em campo indicam que os grandes reservatórios, como caixas d'água, galões e tonéis (muito utilizados para armazenagem de água para uso doméstico em locais dotados de infraestrutura urbana precária), são os criadouros mais encontrados e, portanto, os mais perigosos. Contudo, deve-se dar atenção também a pequenos reservatórios, como vasos de plantas, calhas entupidas, garrafas, lixo a céu aberto, bandejas de ar-condicionado, poço de elevador, entre outros (Instituto Oswaldo Cruz, [s.d.]).

Figura 5 - Ciclo de vida do gênero Aedes



Fonte: <http://brasilecola.uol.com.br/animais/ciclo-vida-aedes-aegypti.htm>

O ciclo de transmissão da infecção se inicia quando uma fêmea se alimenta do sangue de um organismo infectado e ao se alimentar de um novo organismo não infectado, inocula o vírus para o mesmo. Sendo assim, o mosquito funciona apenas como um vetor mecânico (LOUNIBOS; KRAMER, 2015).

No decorrer da picada do mosquito infectado, o vírus se replica na pele (fibroblastos) e então se dissemina através da corrente sanguínea para o fígado, células endoteliais, juntas, músculos e sistema nervoso, fazendo com que as células infectadas sofram apoptose (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). O diagnóstico antecipado do VCHIK resulta na prevenção referente ao controle do vetor, visando prevenir surtos futuros (SAM et al, 2011).

A proliferação desses vetores é influenciada por muitos mecanismos, incluindo o crescimento populacional com urbanização não planejada (e conseqüente sobrecarga de sistemas de água e saneamento), aumento nas viagens domésticas e internacionais, transporte de mercadorias (como pneus), falta de vontade política para intervir, recursos financeiros limitados e poucos profissionais treinados para implementar medidas de controle efetivas. Por

muitos anos, a pulverização com inseticidas tem sido o principal método de controle, embora muitas vezes tenha tido sucesso limitado (AL-MUHANDIS; HUNTER, 2011).

### 1.3 Febre de Chikungunya

#### 1.3.1 Epidemiologia

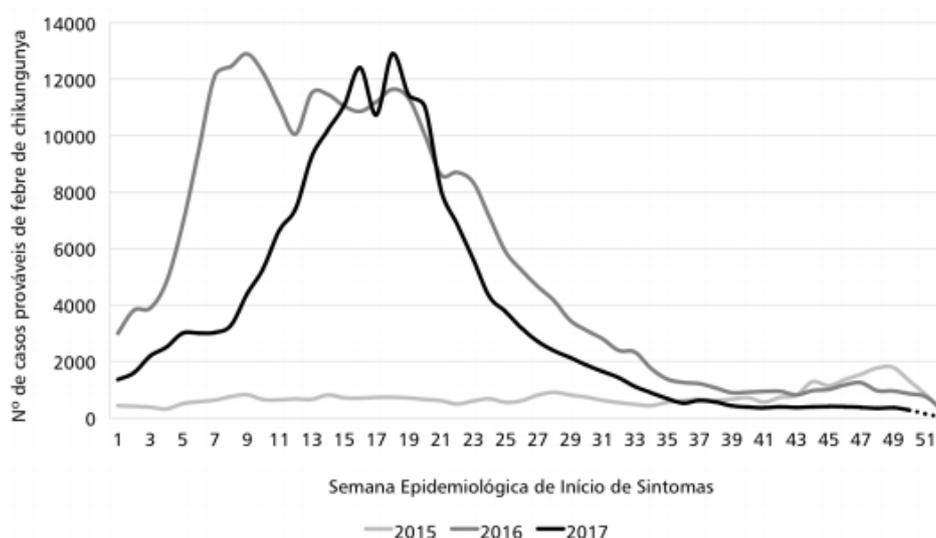
A primeira epidemia da doença foi reportada cientificamente no Leste da África, em 1953 (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Após esse período, surtos da doença aconteceram esporadicamente por toda a África. Desde 2000, o vírus re-emergiu, causando uma série de surtos de forma mais severa do que a forma reportada previamente (BURT et al, 2017). Em 2004, uma grande epidemia se iniciou na costa do Quênia (África Oriental) e se espalhou rapidamente por várias ilhas do Oceano Índico, Índia e Sudeste da Ásia (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015). Em estágios avançados do surto ocorrido no Oceano Índico, foi relatada uma mutação do vírus (E1-A226V) que permitiu melhor disseminação através do vetor *Aedes albopictus*, além de melhoria na habilidade na adaptação e replicação nesse vetor, o que provavelmente contribuiu para a magnitude desse surto (BURT et al, 2017).

Pequenos surtos foram reportados na Europa desde 2007, com 200 casos reportados na região da Ravena (Itália), França (2010), Espanha (2010). Já a região do Pacífico experimentou uma série de surtos entre 2011 e 2013 (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015; KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). O vírus Chikungunya foi inicialmente identificado nas ilhas de Saint Martin em outubro de 2013 e então espalhou-se rapidamente para outros países e para as Américas (BURT et al, 2017).

A Febre de Chikungunya é uma doença de notificação compulsória no Brasil e está presente na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública. Dados da incidência, prevalência e óbitos mais recentes desta doença, constam no Boletim Epidemiológico que compreende as Semanas Epidemiológicas (SE) de 1 a 52 de 2017 e as compara com o mesmo período de 2015 e 2016 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018).

Em 2016, da SE 1 a SE 52, foram registrados 277.882 casos prováveis de febre de Chikungunya, e em 2015, 38.499. Em 2017, até a SE 52 (1/1/2017 a 30/12/2017), foram registrados 185.737 casos prováveis de febre de Chikungunya no país, com uma incidência de 90,1 casos/100 mil hab.; destes, 151.966 (81,8%) foram confirmados e outros 52.285 casos suspeitos foram descartados, Figura 6.

Figura 6 - Casos prováveis de Febre de Chikungunya, por SE no Brasil nos anos 2015, 2016 e 2017



Fonte: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>

Em 2017, até a SE 52, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis de Febre de Chikungunya em relação ao total do país, em seguida aparecem respectivamente as regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul, conforme a Tabela 1. Até a SE 52/2017, foram confirmados laboratorialmente 173 óbitos por Chikungunya, sendo o maior número de casos ocorridos nos meses de maio (n=48; 27,7%), junho (n=34; 19,7%) e abril (n=30; 17,3%).

Tabela 1 - Número de casos prováveis e incidência de febre de Chikungunya (/100 mil hab.), até a Semana Epidemiológica 52, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2016 e 2017

Região/Unidade da Federação	Casos prováveis (n)		Incidência (/100 mil hab.)	
	2016	2017	2016	2017
<b>Norte</b>	<b>9.019</b>	<b>16.570</b>	<b>50,9</b>	<b>93,6</b>
Rondônia	829	222	46,4	12,4
Acre	372	115	45,5	14,1
Amazonas	878	244	21,9	6,1
Roraima	240	4.088	46,7	795,0
Pará	4.343	8.505	52,5	102,8
Amapá	967	221	123,6	28,3
Tocantins	1.390	3.175	90,7	207,1
<b>Nordeste</b>	<b>239.714</b>	<b>142.131</b>	<b>421,2</b>	<b>249,7</b>
Maranhão	13.853	6.416	199,2	92,3
Piauí	2.779	6.358	86,5	197,9
Ceará	48.324	113.927	539,1	1.271,0
Rio Grande do Norte	24.927	2.082	717,3	59,9
Paraíba	20.289	1.675	507,3	41,9
Pernambuco	50.139	1.933	532,8	20,5
Alagoas	18.451	520	549,3	15,5
Sergipe	9.268	401	409,0	17,7
Bahia	51.684	8.819	338,3	57,7
<b>Sudeste</b>	<b>25.245</b>	<b>22.984</b>	<b>29,2</b>	<b>26,6</b>
Minas Gerais	1.452	16.771	6,9	79,9
Espírito Santo	470	841	11,8	21,2
Rio de Janeiro	18.516	4.288	111,3	25,8
São Paulo	4.807	1.084	10,7	2,4
<b>Sul</b>	<b>1.978</b>	<b>373</b>	<b>6,7</b>	<b>1,3</b>
Paraná	1.058	229	9,4	2,0
Santa Catarina	578	70	8,4	1,0
Rio Grande do Sul	342	74	3,0	0,7
<b>Centro-Oeste</b>	<b>1.926</b>	<b>3.679</b>	<b>12,3</b>	<b>23,5</b>
Mato Grosso do Sul	284	168	10,6	6,3
Mato Grosso	568	3.154	17,2	95,4
Goiás	486	227	7,3	3,4
Distrito Federal	588	130	19,7	4,4
<b>Brasil</b>	<b>277.882</b>	<b>185.737</b>	<b>134,8</b>	<b>90,1</b>

Fonte: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>

### 1.3.2 Sinais e sintomas

A Febre de Chikungunya é uma doença aguda causada pelo VCHIK, sendo primariamente uma doença tropical, de início abrupto. A maior parte dos pacientes acometidos por essa doença apresenta a sintomatologia, caracterizada por febre alta (maior que 38,5°C), erupções cutâneas (maculopapulares ou eritematosas) e severa artralgia, principalmente nas mãos, nos pés, nos tornozelos e nos pulsos, Figura 7. Em alguns pacientes podem ocorrer manifestações hemorrágicas, neurológicas (mais comuns em casos pediátricos), miocardite, hepatite e distúrbios oculares, e embora essa doença seja auto limitável, uma parte dos pacientes pode manifestar artralgia

por anos. Apenas 15% dos indivíduos infectados com Chikungunya são assintomáticos (BURT et al, 2017).

Figura 7 - (A) Erupção maculopapular difusa, articulações rígidas e inchaço consistente; (B) Rash maculopapular



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159534>

A doença se desenvolve de 2 a 6 dias após a picada do mosquito infectado (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012), contudo o período de incubação ocorre entre 1 a 12 dias (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2015; SHUKLA et al, 2009) e a poliartralgia aparece em 80 a 90% dos pacientes dentro dos primeiros 3 meses (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

Embora a fatalidade da doença não seja comum em indivíduos saudáveis (<1:1000), ela pode ser fatal em alguns casos, particularmente em neonatos, pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e outras condições de imunossupressão (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015; BURT et al, 2017). O grupo de risco dessa doença abrange os neonatos, pessoas idosas acima de 65 anos com outras doenças, indivíduos imunossuprimidos, gestantes e pacientes com comorbidades crônicas como diabetes e falha nos órgãos (BURT et al, 2017; PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016).

### 1.3.3 Tratamento

Atualmente, nenhuma vacina ou medicamento antiviral está disponível contra o vírus Chikungunya, sendo assim, a terapia medicamentosa se direciona ao controle dos sintomas da doença, orientando os pacientes a

evitem o uso de aspirina e antiinflamatórios não esteroidais pelo risco de sangramentos (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016).

A maioria das pesquisas para descoberta de compostos antivirais tem como alvo as proteínas envolvidas na replicação do vírus. No entanto, como a maioria dos candidatos até agora foram testados apenas em camundongos, muitos permanecem na fase pré-clínica sendo necessário avançar esses compostos para ensaios clínicos visando garantir a eficácia e segurança desses compostos (BURT et al, 2017).

Um dos desafios para o desenvolvimento de uma terapia medicamentosa é a série de sintomas compartilhados entre a Chikungunya e outras arboviroses, como Dengue, Zika e Febre Amarela (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015; KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; SHUKLA et al, 2009). Além disso, a replicação do vírus ocorre muito rapidamente no hospedeiro, com alto nível de viremia em poucos dias de infecção. Estudos relataram que esses altos níveis durante a viremia aguda aumentam a possibilidade do desenvolvimento de uma resistência ao antiviral (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015). Outra dificuldade encontra-se em definir mecanismos da neutralização viral. A liberação destes mecanismos permitiria comparar as possíveis candidatas disponíveis e conseqüentemente o desenvolvimento de uma terapia eficaz (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015).

A apresentação clínica da doença é similar à Dengue e Zika, no entanto em contraste com essas duas doenças, a maioria das pessoas infectadas com o vírus Chikungunya são pacientes altamente sintomáticos, apresentando uma artralgia incapacitante que pode perdurar de meses até anos (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016). O tratamento dessas três doenças é de suporte, ou seja, são tratados apenas os sintomas e não o agente causador da doença, e conforme ocorre com a Febre de Chikungunya, não se deve fazer uso de aspirina ou de antiinflamatórios não esteroidais pelo mesmo risco (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016).

#### 1.4 Diferenças clínicas entre doenças similares

As doenças da atualidade que se assemelham à Febre de Chikungunya são as febres causadas pelo vírus Dengue (DENV) e pelo vírus Zika (VZIK). A Dengue, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a arbovirose mais perigosa e mais prevalente das doenças emergentes, por ter alto poder de propagação e por ser endêmica. Sem tratamento, a Dengue severa gera uma mortalidade de 20% que, administrada, pode ser reduzida a 1%. Dentre os 4 sorotipos de Dengue, o tipo 2 é considerado o mais virulento (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016).

A Dengue pode ser assintomática (corresponde a  $\frac{3}{4}$  dos casos) ou sintomática, sendo esta última classificada de acordo com a OMS em 2009 e a partir de 2014, no Brasil, como Dengue com sinais ou não de alerta e Dengue grave (BHATT et al, 2013).

A Febre Zika é uma arbovirose que se assemelha à Dengue e que começou a receber significativa atenção frente a mídia e a saúde pública após ser confirmada a correlação entre a infecção pelo vírus e a microcefalia fetal. Os sintomas entre Dengue e Zika são indistinguíveis. Também foram reportados em países do Oeste do Pacífico e nas Américas o aumento da ocorrência da Síndrome de Guillain-Barre durante os surtos da Febre Zika (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016; SHUAIB et al, 2016).

As diferenças clínicas entre Chikungunya e Dengue são importantes. Em pacientes com VCHIK, o rash cutâneo aparece antes (do 1º ao 4º dia) enquanto na Dengue aparece próximo do fim da primeira semana. Artralgia não é comum em pacientes com Dengue, já sangramento e dor retro-orbital são raros na Febre de Chikungunya (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

A Tabela 2 compila dados comparativos entre essas três doenças emergentes: Dengue, Zika e Chikungunya.

Tabela 2. Comparativo entre Dengue, Zika e Chikungunya.

	Dengue	Zika	Chikungunya
Gênero	Flavivírus	Flavivírus	Alphavírus
Vetores	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	<i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>
Período de incubação	3-14 dias	3-12 dias	2-12 dias
Sintomas clínicos	Febre alta, artralgia, mialgia, cefaleia, rash cutâneo, náuseas e vômitos	Febre baixa, artralgia, conjuntivite, cefaleia, coceira e rash cutâneo	Febre alta, artralgia, mialgia, cefaleia, edema da articulação e rash cutâneo
Tratamento	Sintomático	Sintomático	Sintomático
Transmissão vertical	Sim	Sim	Sim
Transmissão por transfusão sanguínea	Sim	Sim	Sim

Adaptado de (PATTERSON et al, 2016; CHANG et al, 2010; SHUAIB et al, 2016).

Um caso apresentado por CHANG et al, descreve uma mulher que ao retornar de viagem apresentava febre (38,2°C), neutrofilia, linfopenia, trombocitopenia (achado típico da dengue) e tempo de trombina parcialmente ativada prolongado (CHANG et al, 2010). O conjunto de sintomas levou a suspeita inicial de bronquite, Influenza, Dengue ou Chikungunya. A febre alta persistiu por 3 dias, acompanhada de forte artralgia. Após o 4º dia de hospitalização, a paciente foi liberada e a artralgia persistiu por 30 dias. Apenas 14 dias após o começo dos sintomas, anticorpos (IgM e IgG) contra Chikungunya foram detectados. A análise de casos como o dessa paciente são de extrema importância para elucidar os sintomas clínicos da Febre de Chikungunya, visto que o diagnóstico diferencial de várias doenças tropicais por características clínicas é difícil já que dividem uma série de apresentações comuns, incluindo febre, rash cutâneo e artralgia, com diferentes graus de severidade (CHANG et al, 2010).

### 1.5 Métodos para diagnóstico da doença

O diagnóstico clínico é baseado na sintomatologia do paciente e no histórico de possíveis picadas de um mosquito infectado, sendo confirmadas

por métodos laboratoriais. O diagnóstico laboratorial é necessário para a detecção dos casos, reconhecimento antecipado da transmissão local e controle do vetor (NIEDRIG et al, 2009), além de iniciar uma resposta específica à saúde pública (SHUKLA et al, 2009). Nos últimos anos, houve um aumento nas tentativas de desenvolvimento de *kits* comerciais de diferentes formatos, tanto para a detecção do antígeno quanto para a detecção dos anticorpos. A dificuldade que norteia esse desenvolvimento encontra-se na baixa sensibilidade e especificidade dos *kits* devido a vários fatores, incluindo a reação cruzada entre o VCHIK e outras arboviroses, como as causadas pelo Vírus Dengue e pelo vírus Zika (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012; NIEDRIG et al, 2009).

A rotina para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo VCHIK é baseada na cultura e em sorologia seguidos pela identificação do genoma viral através do RT-PCR (SHUKLA et al, 2009).

O teste ideal deve compreender algumas características recomendadas pela OMS: ser acessível, sensível, específico, com treinamento mínimo, rápido e robusto (em diferentes climas, livres de equipamentos e possível de ser entregue a quem necessita). Além disso, deve ser avaliado rigorosamente com amostras bem caracterizadas e alinhadas ao diagnóstico clínico que inclua infecções causados por genótipos diferentes do vírus (SAM et al, 2011).

Dentre as metodologias para diagnóstico laboratorial destacam-se os testes moleculares e os testes sorológicos.

### 1.5.1 Testes Moleculares

Durante a fase inicial da infecção, títulos elevados do vírus Chikungunya estão presentes no sangue, resultando em alta viremia que pode ser detectada através de testes moleculares, principalmente pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) (BURT et al, 2017), sendo a metodologia mais comumente utilizada por apresentar excelente sensibilidade e especificidade. Além disso, essa técnica é capaz de distinguir os genomas de Chikungunya de outras arboviroses. É importante salientar que o RNA viral é

detectável no soro ou plasma até uma semana após o aparecimento dos sintomas (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

#### 1.5.1.1 *Amplificação de Ácidos Nucleicos*

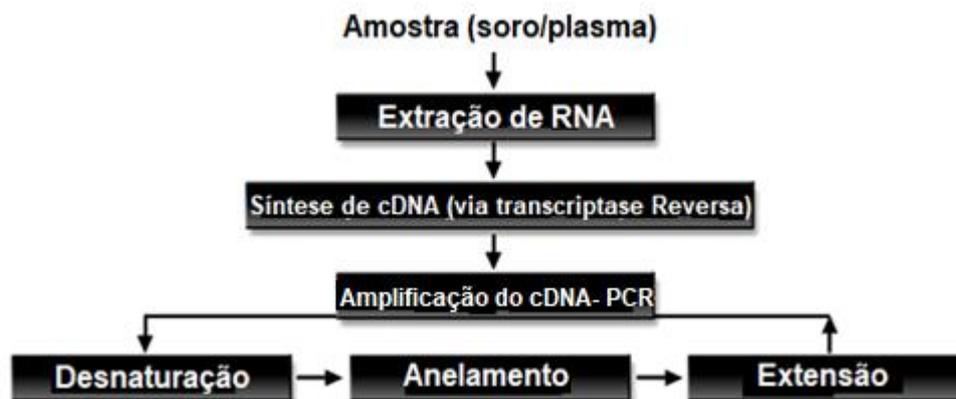
A metodologia do RT-PCR visa extrair uma região definida do genoma e amplificá-la. É um processo exponencial, uma vez que os produtos amplificados de cada ciclo anterior servem como modelos para o próximo ciclo de amplificação, tornando-se assim uma técnica altamente sensível para a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos. Tipicamente, o produto amplificado de forma suficiente é gerado após 20 a 40 ciclos de PCR, de modo que possa ser visualizado em um gel com brometo de etídio. A reação inclui vários componentes, como: modelo, iniciadores (primers) direto e reverso, tampão de reação, magnésio, mistura de dNTP e DNA polimerase termoestável (SANTOS et al, 2004).

Este método se inicia com a escolha da região do genoma a ser amplificada e para tal existem bases de dados que contemplam a sequência genética do vírus (PABBARAJU et al, 2016). A partir de uma matriz (soro/plasma) é feita a extração do RNA viral. Após, é realizada a purificação e então a conversão de RNA em cDNA, utilizando um par primers e uma enzima chamada Transcriptase Reversa (REDDY et al, 2012). Quando se obtém o cDNA pode-se aplicar a técnica de PCR convencional, que consiste em três etapas: Desnaturação, Anelamento e Extensão, Figura 8. Desta forma, obtêm-se várias cópias da região de interesse.

A desnaturação é o momento em que a dupla fita de DNA é aberta (desnaturada), tornando-se uma fita única. Após a separação das fitas há o anelamento dos primers, sendo um deles complementar à sequência de uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro, complementar à sequência da outra fita.

O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se anelam a fita. Com o molde já identificado, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA (SANTOS et al, 2004).

Figura 8 - Etapas de um RT-PCR para obtenção de múltiplas cópias de DNA a partir de RNA



Fonte: Adaptado de SANTOS et al, 2004.

### 1.5.2 Testes Sorológicos

Os pacientes infectados com VCHIK desenvolvem uma resposta robusta de anticorpos (importantes para a eliminação do vírus), com concentrações de Imunoglobulina M (IgM- característica de infecção aguda) detectáveis nos primeiros dias da infecção e Imunoglobulina G (IgG- característica de infecção passada/crônica) mensurável na segunda semana de infecção (BURT et al, 2017). Devido à possibilidade de cronicidade da doença, caracterizada pela intensa artralgia, a IgM pode ser detectável no paciente por vários anos (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). Com vistas a detecção de antígenos e/ou anticorpos muitos dos *kits* foram disponibilizados no mercado através de metodologias sorológicas, como ELISA, Teste Rápido e Imunofluorescência.

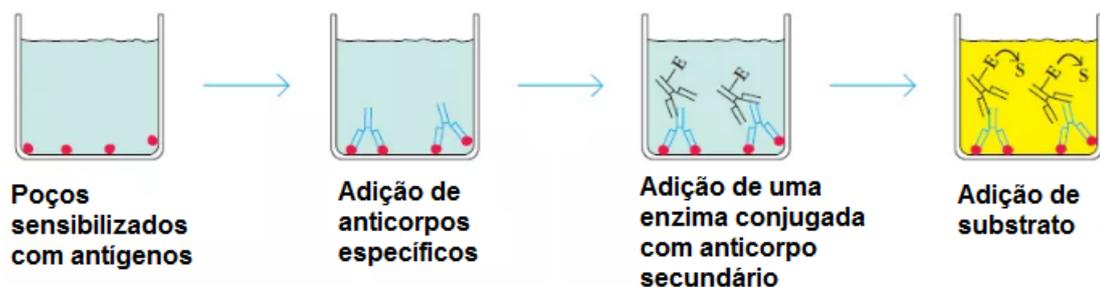
#### 1.5.2.1 ELISA, Teste Rápido e Imunofluorescência

- ELISA

É um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos, por apresentar grande sensibilidade e especificidade. O teste se baseia nas reações entre antígeno-anticorpo detectáveis. Para detecção de anticorpos contra Chikungunya são utilizadas as técnicas de ELISA indireto e ELISA sanduíche para captura de Anticorpos (CAMARA, 2013).

O método de ELISA indireto consiste em sensibilizar a placa de 96 poços com antígenos (proteínas virais purificadas), em seguida, é adicionada uma matriz (soro/plasma) que pode ou não conter anticorpos contra o vírus e, caso tenha, é formado um complexo antígeno-anticorpo. A próxima etapa é a adição de uma enzima conjugada com um anticorpo secundário e na sequência, o substrato é adicionado e a reação entre enzima-substrato é bloqueada (geralmente utilizando ácido) e quantificada através da leitura do comprimento de onda estabelecido pelo fabricante, em uma leitora de ELISA (SHUKLA et al, 2009). Os tempos de incubação, condições de temperatura e condições de lavagem variam de acordo com o fabricante, Figura 9.

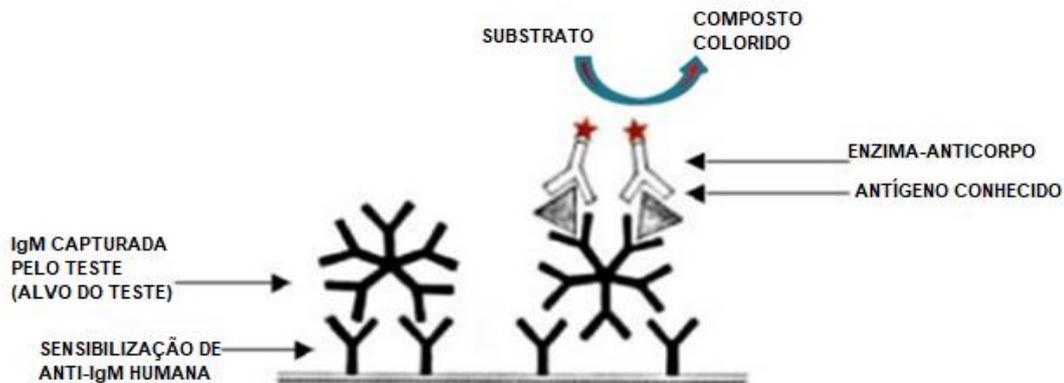
Figura 9 - Etapas realizadas durante um ELISA indireto



Fonte: <http://www.ageracaociencia.com/2017/09/21/ensaio-imunoenzimatico-ELISA/>

O método de ELISA sanduíche para captura de anticorpos, também conhecido como MAC-ELISA, consiste em sensibilizar a placa de 96 poços com um anti-IgM humano, em seguida é adicionada a matriz (soro/plasma). Os anticorpos a serem capturados ficarão retidos na placa, então é adicionado o antígeno e apenas os anticorpos específicos serão capazes de reter o antígeno na placa. Por fim, adiciona-se o anticorpo específico para o antígeno, conjugado com uma enzima, seguido da adição do substrato e por último, a solução de parada (REDDY et al, 2012). A leitura é realizada em um leitor de ELISA, Figura 10.

Figura 10 - ELISA sanduíche para captura de IgM



Fonte: Adaptado de <https://www.slideshare.net/drbarna43/japanese-encephalitis>

- **TESTE RÁPIDO**

O teste rápido é um método imunocromatográfico que pode ser utilizado para a detecção de antígenos e/ou anticorpos contra Chikungunya. Apresenta algumas vantagens frente à outras metodologias como a ampla faixa de temperatura para estocagem do produto, a rapidez na obtenção do resultado, a facilidade na execução, além de não necessitar de instalações ou equipamentos especiais para sua realização (BRISTOW et al, 2015). Eles basicamente preenchem o critério ASSURED preconizado pela OMS- *Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Robust/Rapid, Equipment Free, Deliverable*; que solicita que tenham baixo custo, boa sensibilidade e especificidade, de fácil manipulação, rápido e robusto, livre de equipamentos e que seja disponível onde necessário (KAY et al, 2014).

Para a detecção de anticorpos, as tiras são revestidas com antígenos e sobre a área demarcada adiciona-se a matriz (geralmente soro, plasma ou sangue total). A reação entre antígeno-anticorpo ocasiona a formação de uma linha ou ponto colorido na região sensibilizada da membrana. Já para a detecção de antígenos, as tiras são sensibilizadas com anticorpos específicos e quando adiciona-se a matriz (soro, plasma ou sangue total) a reação antígeno-anticorpo forma uma banda colorida na região sensibilizada da membrana (KAY et al, 2014). É importante ressaltar que as questões de temperatura, tempo e adição de diluentes variam de acordo com os fabricantes, Figura 11.

Figura 11 - Teste Rápido para detecção de anticorpos IgM contra Chikungunya



Fonte: <http://g1.globo.com/bahia/noticia/2016/09/anvisa-libera-teste-rapido-de-chikungunya-desenvolvido-na-ba.html>

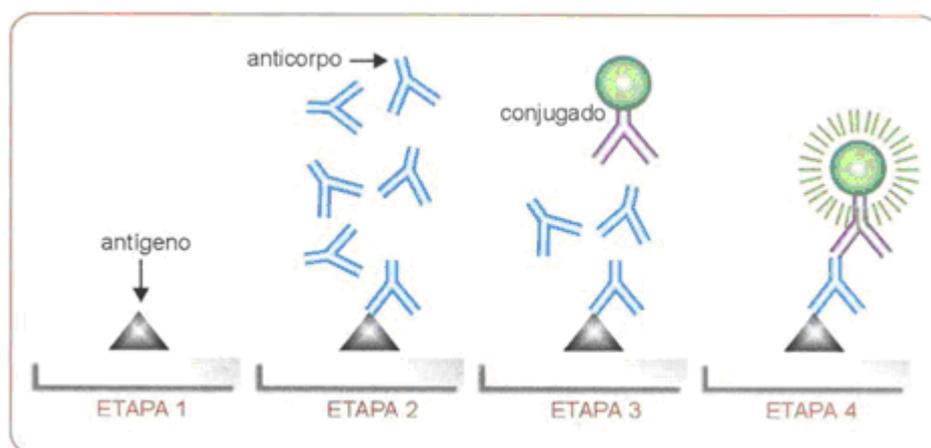
- **IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA**

As moléculas de anticorpos podem ser usadas para localizar suas moléculas-alvo de forma precisa através de uma variedade de técnicas de marcação. Quando o próprio anticorpo ou anticorpo anti-imunoglobulina usado é marcado com um corante fluorescente, a técnica é conhecida por imunofluorescência (MURPHY, TRAVERS e WALPORT, 2010).

Como em todas as técnicas sorológicas, o anticorpo se liga de forma estável ao seu antígeno, permitindo que os anticorpos não-ligados sejam removidos por lavagens exaustivas. Um corante fluorescente pode ser ligado covalentemente direto no anticorpo. Em geral, o anticorpo ligado é detectado por um anticorpo anti-imunoglobulina fluorescente, uma técnica conhecida por imunofluorescência indireta (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Os corantes escolhidos para imunofluorescência são excitados por luz de um comprimento de onda, em geral, verde ou azul, e emitem luz de diferente comprimento de onda no espectro visível. Com o uso de filtros seletivos, apenas a luz proveniente do corante ou do fluorocromo usado é detectada no microscópio de fluorescência, Figura 12 (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Figura 12 - Imunofluorescência Indireta



Fonte: [http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias\\_chagas.html](http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias_chagas.html)

## 2 JUSTIFICATIVA

Devido aos surtos de grande magnitude ocorridos no Brasil e no mundo nos últimos anos, a Febre de Chikungunya tornou-se um grande desafio na saúde pública. Por se tratar de uma doença emergente e por apresentar sinais e sintomas compartilhados com outras arboviroses, torna-se imprescindível o desenvolvimento de testes moleculares e/ou sorológicos para o rápido diagnóstico e, conseqüentemente seu tratamento.

Desta forma, este trabalho buscou avaliar frente a literatura nacional e internacional, a qualidade dos *kits* para diagnóstico da Febre de Chikungunya disponíveis nos mercados mundial e nacional, frente aos parâmetros de sensibilidade e especificidade.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho é realizar uma revisão integrativa acerca da qualidade dos ensaios para diagnóstico da Febre de Chikungunya disponíveis nos mercados nacional e mundial nas questões referentes à sensibilidade e especificidade.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Buscar artigos em bases de dados eletrônicas sobre o assunto em pauta.
- Identificar e selecionar artigos nacionais e internacionais sobre os testes para diagnóstico da Febre de Chikungunya.
- Demonstrar os parâmetros de Sensibilidade e Especificidade dos testes para diagnóstico da Chikungunya disponíveis no mercado mundial.

## 4 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão integrativa, sendo esta a mais ampla abordagem metodológica referente as revisões, permitindo a inclusão de estudos experimentais e não-experimentais para uma compreensão completa do fenômeno analisado. Integra também dados da literatura teórica e empírica, além de incorporar um vasto leque de propósitos: definição de conceitos, revisão de teorias e evidências, e análise de problemas metodológicos de um tópico particular (SOUZA; SILVA; CARVALHO, 2010).

Para a elaboração da presente revisão integrativa foram efetuadas as seguintes etapas: elaboração da pergunta norteadora, busca na literatura, estabelecimento de critérios de inclusão e exclusão de artigos, análise crítica dos artigos selecionados, interpretação dos resultados e apresentação da revisão.

A primeira etapa foi a elaboração de uma pergunta norteadora. A indagação que guiou esta revisão foi: os *kits* disponíveis nos mercados nacional e mundial para o diagnóstico sorológico da infecção causada pelo vírus Chikungunya, em suas diferentes metodologias são sensíveis e específicos?

A busca na literatura foi realizada através de pesquisas *on-line* em diferentes bases de dados eletrônicas, como Medline, Scopus, Web of Science, PubMed e SciELO, utilizando os descritores: “Diagnosis of Chikungunya”, “Available tests for diagnosis of Chikungunya Virus”, “Commercially assays for diagnosis of Chikungunya virus”, “RT-PCR for the Diagnosis Of Chikungunya”, “Serology of Chikungunya” e “Antibodies Screening”, realizadas no período de junho de 2017 a janeiro de 2018.

Os critérios adotados para a seleção e inclusão dos artigos foram:

- a) artigos publicados em português e inglês;
- b) artigos com disponibilidade de texto (*free full text*);
- c) artigos em modelo de revisão;
- d) artigos que abordassem a temática referente à pergunta norteadora do trabalho;

e) artigos que constavam nas referências dos artigos selecionados primariamente.

Os critérios adotados para a exclusão de artigos foram:

- a) artigos em idiomas diferentes de português e inglês;
- b) artigos que não apresentavam todo o texto disponível para visualização;
- c) artigos que não eram relevantes ao tema;
- d) artigos que não apresentavam dados de especificidade e sensibilidade.

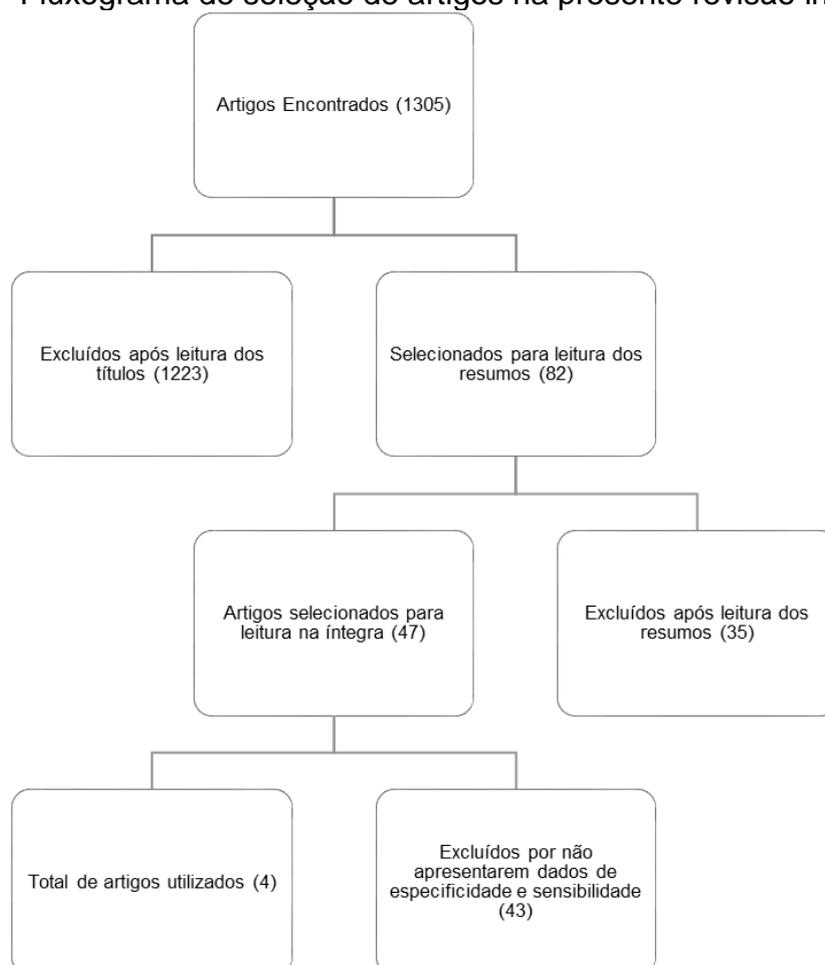
Os artigos selecionados descreviam detalhes sobre a doença, assim como a abrangência dos testes diagnósticos desenvolvidos com a finalidade de auxiliar no diagnóstico clínico desta Febre. Foi realizada, então, a transcrição dos resultados e de trechos significativos, a fim de levantar o conhecimento já produzido sobre os *kits* desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial do vírus Chikungunya no que diz respeito aos valores de sensibilidade e especificidade, disponíveis a nível nacional e mundial.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção dos artigos

Através das pesquisas nas bases de dados científicas, seguindo as palavras descritoras já mencionadas anteriormente, foram identificados 1305 artigos. Com a leitura dos títulos, foram excluídos 1223 artigos por fugirem do tema proposto, restando 82 artigos cujos resumos foram lidos visando excluir aqueles que não abordavam os objetivos elencados para a elaboração desta revisão, ou seja, foi excluído um total de 35 artigos. Os 47 artigos selecionados foram lidos na íntegra e apenas aqueles que cumpriam todos os critérios de inclusão citados anteriormente foram incluídos no presente trabalho, ou seja, 4 artigos. A figura 13 abaixo demonstra a sequência utilizada para a seleção dos artigos desta revisão.

Figura 13 - Fluxograma de seleção de artigos na presente revisão integrativa



Fonte: Própria

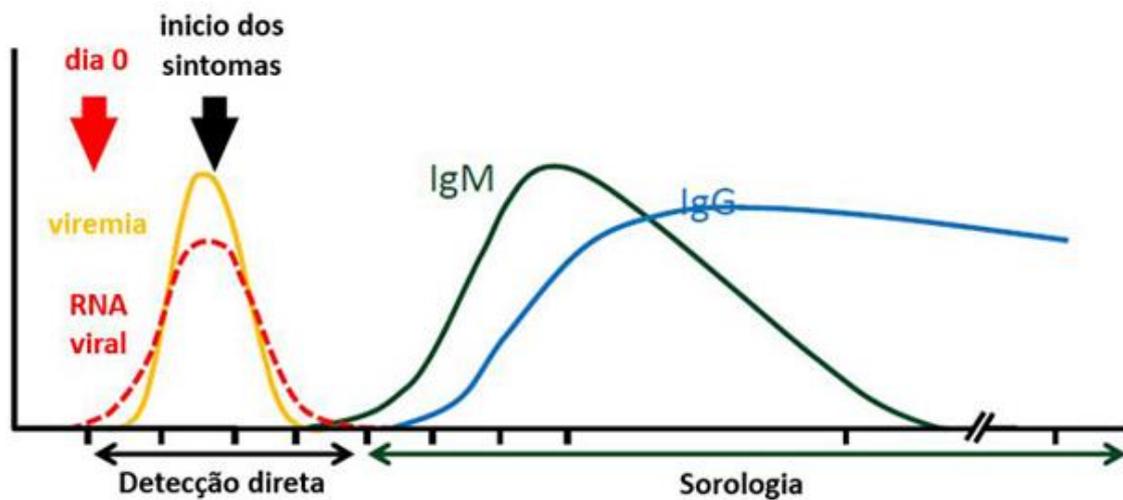
É importante ressaltar a dificuldade inerente à pesquisa sobre o tema escolhido, visto que não há disponível no mercado mundial muitos *kits* registrados para diagnóstico da Febre de Chikungunya. Devido aos fatores de exclusão, o número de artigos encontrados foi drasticamente reduzido.

## 5.2 Atributos de sensibilidade e especificidade

Para esta revisão foram selecionados artigos que apresentassem dados de especificidade e sensibilidade, comprovando ou reprovando sua eficácia. Segundo Takao Kawamura, sensibilidade é a probabilidade de um indivíduo avaliado e doente ter seu resultado alterado (positivo), ou seja, a sensibilidade é o número de pacientes verdadeiramente positivos sobre os verdadeiramente positivos mais os falso-negativos, conforme a equação  $s = VP / (VP + FN)$ . Já especificidade é a probabilidade de um indivíduo avaliado e normal ter seu teste normal (negativo), ou seja, a especificidade é o número de indivíduos verdadeiramente negativos sobre os verdadeiramente negativos mais os falso-positivos, conforme a equação  $e = VN / (VN + FP)$  (KAWAMURA, 2002). Diante do exposto podemos concluir que um diagnóstico sensível e específico é aquele que não apresenta resultados Falso-negativos ou Falso-positivos, respectivamente. Ainda não foram definidos internacionalmente valores para os atributos de especificidade e sensibilidade.

Vale ressaltar que a imunidade contra o vírus Chikungunya é mediada por anticorpos dirigidos ao vírus. Como já mencionado anteriormente, na fase aguda da doença há no sangue a presença de antígenos (presença de RNA viral) com altos níveis de viremia. Após o declínio da concentração de antígenos, segue o aparecimento de IgM e alguns dias depois, IgG (GRAHAM; REPIK; YACTAYO, 2015), Figura 14. É importante salientar que em alguns pacientes há persistência de IgM por mais de um ano, então é de suma importância saber o status de IgG a fim de distinguir uma infecção aguda de uma persistência de IgM (LITZBA et al, 2008).

Figura 14 - Evolução imunológica durante a Febre de Chikungunya



Fonte: <http://zikavirus.com.br/>

### 5.3 Resultados

As metodologias para o diagnóstico laboratorial da Febre de Chikungunya são divididas em: Testes moleculares, no qual o RT-PCR é o mais comumente utilizado; e em Testes sorológicos, onde apresentam-se as metodologias ELISA, Teste rápido e Imunofluorescência indireta.

Visando analisar os dados de especificidade e sensibilidade de *kits* para diagnóstico disponíveis comercialmente nos mercados nacional e mundial, foram selecionados 4 artigos em bases de dados científicas. Os *kits* analisados nos artigos estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Relação dos *kits* referentes aos artigos selecionados

Título	Autor	Ano	Tipo de Teste	Sensibilidade	Especificidade
<i>Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus</i>	PRAT e colaboradores	2014	Teste Rápido 01 Chikungunya IgM	30%	73%
			Teste Rápido 02 Chikungunya IgM	20%	93%
			ELISA IgM 03 Chikungunya IgM	79%	88%
			ELISA IgM 05 Chikungunya IgM	85%	82%
			ELISA IgG 04 Chikungunya IgG	52%	96%
			ELISA IgG 06 Chikungunya IgG	88%	95%
<i>Evaluation of the first comercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test</i>	LITZBA e colaboradores	2008	Imunofluorescência Indireta IgM IIFT	96,9%	98,3%
			Imunofluorescência Indireta IgG IIFT	95,4%	100%
<i>Poor Diagnostic Accuracy of Commercial Antibody-Based Assays for the Diagnosis of Acute Chikungunya Infection</i>	BLACKSELL e colaboradores	2011	Teste Rápido Chikungunya IgM	1,9-3,9%	92,5-95%
			ELISA IgM Chikungunya IgM AGUDA	3,9%	92,5%
			ELISA IgM Chikungunya IgM CONVALESCENTE	84%	91%
<i>Desempenho of RealStar Chikungunya Virus Real-Time Reverse Transcription- PCR kit</i>	PANNING e colaboradores	2009	RT-PCR Chikungunya Virus Real-Time Reverse Transcription- PCR kit	100%	100%

Fonte: Própria

Prat e sua equipe realizaram no ano de 2014, uma análise de 6 *kits* para diagnóstico de Chikungunya provenientes de 4 empresas diferentes que foram aprovados pela Comissão Europeia. As metodologias analisadas foram: Teste imunocromatográfico (teste-rápido) e Teste imunoenzimático (ELISA). Para esta análise foram utilizados dois painéis de amostras conhecidas (N<sub>Total</sub>=53): O painel A, contendo 23 amostras e o painel B, contendo 30 amostras. Tais amostras foram caracterizadas através de dois ELISAS *in-house* realizados por Centros de Referência para arbovirose (PRAT et al, 2014).

O painel A foi utilizado para testar previamente os *kits* comerciais e caso alcançassem um valor mínimo de 70% tanto na especificidade quanto na sensibilidade, o painel B seria utilizado (devido ao pouco volume das amostras). Os *kits* analisados estão listados abaixo e é importante salientar que

a execução foi realizada de acordo com as instruções de uso específicas dos produtores.

1. SD Bioline Chikungunya IgM
2. *OnSite* Chikungunya IgM combo rapid test
3. Chikungunya IgM m-capture ELISA
4. Chikungunya IgG capture ELISA
5. Anti- Chikungunya vírus ELISA IgM teste
6. Anti- Chikungunya vírus ELISA IgG teste

Para avaliação dos *kits* (1-6), foram utilizadas as 23 amostras do painel A mais amostras de soro infectadas com os vírus Mayaro e O'nyon-nyong (ambos alfavírus), pertencentes ao Painel B. Os resultados apresentam-se nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados dos testes para diagnóstico sorológico do painel A

Virus tested, sample no.	In-house ELISA				In-house CHIKV neutralization, IRBA and CDC§	Commercially available RDT		Commercially available ELISA			
	IRBA†		CDC‡			SD Bioline Chikungunya IgM¶	OnSite Chikungunya IgM Combo Rapid Test#	Chikungunya IgM/IgG Capture**		Anti-Chikungunya Virus ELISA IgM/IgG††	
	IgM	IgG	IgM	IgG				IgM	IgG	IgM	IgG
<b>CHIKV</b>											
<b>IgG</b>											
1	-	+	-	+	5,120	+	-	-	+	-	-
2	-	+	-	+	1,280	-	-	-	-	-	+
3	-	+	-	+	>320	+	+	-	+	+	+
<b>IgM + IgG</b>											
4	+	+	+	+	320	-	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	40	-	-	+	+	+	-
6	+	+	+	+	2,560	+	-	+	+	+	+
7	+	+	+	+	1,280	-	+	+	+	NA	NA
8	+	+	+	+	640	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	320	+	-	+	-	+	+
10	+	+	+	+	80	-	-	+	-	+	+
<b>IgM</b>											
11	+	-	+	-	<10	-	-	+	-	+	-
12	+	-	+	-	<10	-	-	+	-	+	-
13	+	-	+	-	80	-	-	+	-	+	-
<b>DENV</b>											
<b>IgM + IgG</b>											
14	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
<b>Negative samples‡‡</b>											
16	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	<10	+	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	<10	+	-	+	-	-	-
20	-	-	-	-	<10	-	-	+	-	+	NA
21	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	<10	-	-	-	-	-	-

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418184>

Tabela 5 - Resultados dos testes para diagnóstico sorológico do painel B mais Mayaro e O'nyong-nyong

Virus tested, sample no.	In-house ELISA				In-house CHIKV neutralization, IRBA and CDC§	Commercially available RDT			Commercially available ELISA			
	IRBA†		CDC‡			SD Bioline Chikungunya IgM	OnSite Chikungunya IgM Combo Rapid Test#	Chikungunya a IgM/IgG Capture**		Anti- Chikungunya Virus ELISA IgM/IgG††		
	IgM	IgG	IgM	IgG				IgM	IgG	IgM	IgG	
CHIKV												
IgG												
24	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	+	+	
25	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	+	+	
26	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+	
27	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+	
28	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+	
29	-	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	+	-	+	
IgM + IgG												
30	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	NA	NA	
31	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	
32	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	
33	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	+	+	
34	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	+	+	
35	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	+	+	
36	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+	
37	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	-	
38	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	+	+	
39	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	
40	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	NA	
41	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+	
IgM												
42	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	+	NA	
43	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	
44	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	+	-	
45	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	+	-	+	-	
46	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	
47	+	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	
DENV												
IgM + IgG												
48	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	
49	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	
50	-	-	NA	NA	NA	NA	NA	-	-	-	+	
RVRV‡‡												
IgG, 51												
	-	+	NA	NA	<10	NA	NA	-	-	NA	NA	
MAYV‡‡												
IgM + IgG, 52												
	-	+	NA	NA	<10	-	-	-	-	-	+	
ONNV‡‡												
IgM + IgG, 53												
	+	+	NA	NA	<10	-	-	+	+	+	+	

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418184>

Após a análise dos resultados obtidos, os valores de sensibilidade, especificidade, FP e FN foram calculados, Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de sensibilidade, especificidade, Falso-positivos e Falso-negativos dos kits analisados

	Detecção de Mayaro	Detecção de O'nyong nyong	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	FN (%)	FP (%)
Teste 1	NÃO	NÃO	30	73	39	57
Teste 2	NÃO	NÃO	20	93	36	33
Teste 3	NÃO	SIM	79	88	21	12
Teste 4	NÃO	SIM	52	96	Valor Não Definido	Valor Não Definido
Teste 5	NÃO	SIM	85	82	15	18
Teste 6	SIM	SIM	88	95	Valor Não Definido	Valor Não Definido

Fonte: Adaptado de PRAT et al, 2014

Como os Testes rápidos demonstraram baixa sensibilidade (<70%), presença de FP e FN, as amostras do painel B não foram utilizadas nos *kits* 1 e 2. Contudo, foram utilizadas nos *kits* 3, 4, 5, 6 e os dados estão relatados na tabela 5.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se perceber que os testes rápidos analisados, apesar de apresentarem sensibilidade extremamente baixa em ambos os casos, apresentaram melhores valores de especificidade, principalmente no teste 2.

Os ELISAS apesar de terem obtido valores de especificidade e sensibilidade melhores que os valores obtidos pelos testes rápidos, ainda apresentaram altos valores de FP e FN. Além disso, a reatividade cruzada entre alfaviroses destaca o fato de que a soroneutralização é necessária (PRAT et al, 2014).

Não houve correlação entre os testes ELISA que avaliaram detecção de IgM, visto que o teste 3 obteve melhor especificidade enquanto o teste 5, melhor sensibilidade. Já com relação aos testes ELISA que avaliaram detecção de IgG houve uma correlação, visto que os valores de especificidade foram maiores que os de sensibilidade tanto no teste 4 quanto no teste 6.

Baseado nesses dados, pode-se concluir que ambas as metodologias necessitam de ajustes, contudo, os testes ELISA apresentam melhor desempenho tanto quando analisados individualmente quanto quando comparados aos testes rápidos.

Litza e colaboradores, em 2008, avaliaram dois *kits* que utilizavam a metodologia de imunofluorescência indireta, um para detecção de IgM e o outro para detecção de IgG, e para tal foram utilizados três painéis contendo soros bem caracterizados. O painel 1 continha 81 amostras positivas para IgM e 40 amostras positivas para IgG (soros de pacientes coletados em 2005 de La Reunion), cujos soros foram caracterizados através de ELISA de captura de IgM *in-house* e um ELISA indireto para IgG. O painel 2 continha 50 amostras positivas para IgM e 47 amostras positivas para IgG, caracterizadas através de uma Imunofluorescência indireta *in-house* (soro de pacientes do Oceano Índico). O painel 3 era composto por 100 amostras de doadores alemães que

não apresentavam risco de uma infecção e amostras de pacientes com dengue, sendo 20 IgG e 15 IgM.

É importante salientar que todas as amostras foram caracterizadas através de técnicas que utilizaram o genótipo do Leste, do Centro e do Sul da África (um ELISA de captura de IgM, um ELISA indireto para IgG, uma imunofluorescência indireta *in-house*). Já os *kits* de imunofluorescência comercial analisados pela equipe de Litzba utilizaram um genótipo diferente para detectar os anticorpos presentes nos 3 painéis (sorotipo presente em La Reunion).

Os resultados foram avaliados através do microscópio de fluorescência e os títulos maiores ou iguais a 1:10 foram considerados positivos, contudo a intensidade da fluorescência foi comparada e alocada em uma escala (1 a 4) usando o procedimento padrão, Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da imunofluorescência indireta

Panel of sera	IgM positive by in-house ELISA/IIFT [OD/titre range]	IgM positive in commercial IIFT [titre range]	IgG positive by in-house ELISA/IIFT [OD/titre range]	IgG positive in commercial IIFT [titre range]
Panel I <sup>a</sup>	81 (100%) <sup>b</sup> [0.22–4.06]	78 (96.3%) [10 to >10 000]	40 (100%) <sup>b</sup> [0.20–2.93]	40 (100%) [10 to >10 000]
Panel II <sup>c</sup>	50 (100%) <sup>d</sup> [20–10 240]	49 (98%) [10–3200]	47 (100%) <sup>d</sup> [80–20 480]	43 (91.5%) [10–3200]
Panel III <sup>e</sup>	nd	2 (2%) [100]	nd	0
Panel IV <sup>f</sup>	nd	0	nd	0

nd: not done.

<sup>a</sup> CHIKV infected patients from La Reunion.

<sup>b</sup> In-house ELISA.

<sup>c</sup> Returning CHIKV infected patients from travels to the Indian Ocean.

<sup>d</sup> In-house IIFT.

<sup>e</sup> Controls, blood donors from Germany.

<sup>f</sup> Controls, dengue infected patients.

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294706>

O desempenho geral dos *kits* de imunofluorescência analisados apresentam vieses na comparação com os testes utilizados para caracterização das amostras, como o genótipo, o qual pode-se especular que seja o motivo da diferença nos valores de sensibilidade; a diferença na quantidade de soro aplicado no teste, as diferentes condições de reações e armazenamento das amostras e os diferentes microscópios de fluorescência (PRAT et al, 2008). A análise dos 100 soros controles geraram 2 FP e o motivo permanece incerto, contudo não houve reatividade cruzada. Os valores de sensibilidade e especificidade são apontados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos de IgM e IgG.

	Panels I-III			
	IgM		IgG	
	Positive	Negative	Positive	Negative
<b>EUROIMMUN anti-CHIKV-IIFT</b>				
Positive	127	2	83	0
Negative	4	113	4	120
Specificity [%]	98.3		100	
Sensitivity [%]	96.9		95.4	
Positive predictive value [%]	98.4		100	

Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18294706>

Estes são os primeiros *kits* de imunofluorescência disponíveis comercialmente para detecção de anticorpos contra chikungunya as quais revelam resultados sensíveis e específicos, e quando comparados a ensaios *in-house* conhecidos, demonstraram ser altamente qualificados.

Quanto ao trabalho de Blacksell e sua equipe, realizado em 2011, foram avaliados dois *kits* disponíveis comercialmente para detecção de IgM. O Teste 1 é um teste rápido para detecção de IgM (ICT- *rapid immunochromatographic test* [teste imunocromatográfico]) e o Teste 2 é um ELISA para detecção de IgM.

O ICT foi testado apenas para pacientes em fase aguda e o ELISA para pacientes em fase aguda e crônica. Foram testadas também metodologias consideradas padrão ouro pelas forças Armadas de Bangkok (AFRIMS), sendo elas uma hemaglutinação, um ELISA IgM e um RT-PCR. Foram testados no total 292 amostras de soro de pacientes caracterizadas através de um RT-PCR. Os resultados são apontados na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados ICT e ELISA IgM

Ensaio	Tipo de amostras n=292	% (n° de amostras/total de amostras; 95%)	
		Sensitivity	Specificity
SD IgM antibody ELISA	Acute	3.9 (2/52; 0-13)	92.5 (222/240; 88-96)
	Convalescent	84.1 (44/52; 72-93)	91.3 (219/240; 87-95)
SD IgM antibody ICT	Acute, operator 1	1.9 (1/52; 0-10)	92.5 (222/240; 88-96)
	Acute, operator 2	3.9 (2/52; 0-13)	94.2 (226/240; 90-97)
	Acute, operator 3	3.9 (2/52; 0-13)	95.0 (228/240; 91-97)
AFRIMS HI	Acute	21.2 (11/52; 11-35)	95.0 (228/240; 92-98)
AFRIMS IgM ELISA	Acute	21.2 (11/52; 11-35)	95.4 (229/240; 92-98)
AFRIMS RT-PCR	Acute	88.5 (46/52; 77-96)	100 (0/240; 99-100)

Fonte: Adaptado de Blacksell et al, 2011.

Baseado nos resultados obtidos na Tabela 9, pode-se perceber que os valores de sensibilidade tanto do ELISA quanto do Teste rápido são extremamente baixos, quando analisadas amostras em infecção aguda. Os valores de sensibilidade provenientes dos testes de hemaglutinação e Elisa IgM do AFRIMS também foram considerados extremamente baixos. Apenas o RT-PCR proveniente do AFRIMS apresentou uma sensibilidade relativamente boa.

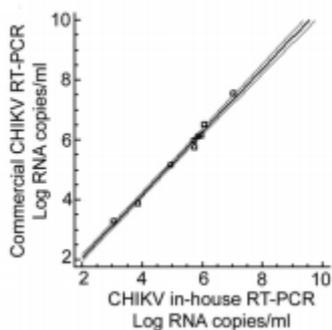
Já os valores de especificidade foram considerados bons, sendo o menor deles o ELISA IgM comercial quando analisadas amostras convalescentes, e o melhor deles, o RT-PCR (proveniente do AFRIMS).

A hipótese para o desempenho pobre de diagnóstico desses ensaios pode ser atribuída aos baixos níveis de IgM dos pacientes durante a infecção aguda, visto que no momento da admissão os pacientes foram detectados com altos níveis de viremia, através de um resultado positivo de PCR. É importante ressaltar que o aparecimento de IgM ocorre aproximadamente 5 dias após o aparecimento dos sintomas.

O estudo realizado por Panning e sua equipe, em 2009, analisou o desempenho do kit RealStar que utiliza a metodologia de RT-PCR através da comparação com um RT-PCR *in-house* já validado. O kit RealStar utiliza como alvo uma região protéica não estrutural (nP-1) similar ao RT-PCR utilizado para comparação.

Para avaliar o desempenho clínico do ensaio foram utilizadas 57 amostras de 53 indivíduos, confirmados laboratorialmente como negativos (22) ou com a doença na fase aguda (35). Todas as amostras que deram resultados positivos pelo RT-PCR *in-house* foram confirmadas através do RT-PCR comercial. Assim como as amostras que deram resultados negativos foram também confirmadas pelo kit comercial, Figura 15.

Figura 15 - Resultado obtido comparando o RT-PCR *in-house* e o comercial



Fonte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2738119/pdf/1024-09.pdf>

Comparando o método *in-house* com o kit comercial, há uma concordância de 100% nos valores de sensibilidade e especificidade, sendo esta a primeira avaliação de um RT-PCR disponível comercialmente no mercado para a detecção de antígenos da Chikungunya.

Além dos trabalhos acima declarados e com a finalidade de corroborar com tais estudos, foi apresentada uma Avaliação Externa da Qualidade, realizado por Niedrig e sua equipe, no ano de 2009. Esta avaliação interpretou a qualidade dos resultados provenientes da análise sorológica dos laboratórios participantes com vistas a acessar a acurácia do diagnóstico e dos procedimentos. Trinta laboratórios de 23 países participaram dessa avaliação (NIEDRIG et al, 2009).

Esta avaliação mostra a importância da disponibilização de *kits* comerciais que sejam sensíveis e específicos, que apresentem um bom desempenho, sejam acessíveis e eficazes. Mostra também o panorama geral dos laboratórios frente à detecção desta doença emergente.

As amostras testes foram geradas através da diluição de soro humano bem caracterizado em um plasma negativo para os vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Hepatite B (HBV) e Hepatite C (HCV). Os painéis de proficiência consistiam em 10 amostras de referência.

Para controles específicos, foram providas seis alíquotas provenientes de três soros positivos selecionados para anticorpos contra VCHIK. Foi realizada uma diluição seriada de fator 2 em um dos soros selecionados, resultando nas amostras: 12 (1:5), 11 (1:10), 2 (1:20), 4 (1:40) e mais dois soros: 10 e 5; resultando nas seis amostras. Para controles de especificidade,

foram incluídas 2 alíquotas contendo anticorpos para arboviroses heterólogas (Dengue e West Nile). E, por fim, 2 alíquotas conhecidamente negativas foram utilizadas como controle negativo (NIEDRIG et al, 2009).

Os participantes do estudo foram solicitados a utilizar os métodos diagnósticos que são aplicados na rotina para a detecção sorológica das amostras desse estudo. Os métodos foram questionados quanto ao tipo (ensaio imunoenzimático, ensaio de inibição da hemaglutinação ou ensaio de imunofluorescência) e quanto à origem (se foi utilizado um kit comercial ou ensaio *in-house*).

Os critérios de validação dessa análise consistiam em obter 20 pontos (representando 100%), sendo distribuídos de forma que os laboratórios deveriam detectar corretamente as 6 amostras reativas para Chikungunya (diferenciando IgM e IgG), e tanto as amostras negativas quanto as amostras reativas para outras arboviroses não poderiam dar resultado positivo. É importante salientar que os resultados que se encontraram no *borderline* foram considerados positivos. Além disso, resultados Falso-Positivos (FP) ou Falso-Negativos (FN) não foram contados. A tabela 10 demonstra os resultados obtidos por cada laboratório participante do estudo.



Com os resultados obtidos na Tabela 10, pode-se notar que apenas seis dos trinta laboratórios participantes cumpriram todos os critérios com excelência de desempenho. No tocante a diagnóstico das amostras negativas, três laboratórios reportaram resultados FP em amostras reativas para arboviroses heterologas ou amostras negativas. Treze laboratórios obtiveram pelo menos 85% de precisão nos resultados e notou-se que a falta de sensibilidade para a detecção de IgM foi observada na maior parte dos laboratórios abaixo de 18 pontos (NIEDRIG et al, 2009).

Laboratórios que utilizaram o mesmo ensaio comercial (Anti-Chikungunya Virus IIFT IgM/IgG; Euroimmun AG) variaram fortemente na precisão. Como ensaios comerciais são produzidos de acordo com critérios certificados, procurando garantir reprodutibilidade aumentada dos resultados, os motivos mais prováveis dessa variabilidade pode ser o armazenamento incorreto, manuseio inadequado das amostras ou do ensaio (NIEDRIG et al, 2009).

A tabela 10 mostra que a detecção de IgM foi significativamente menor que a detecção de IgG quanto à sensibilidade. Esses resultados levantam a hipótese de baixo desempenho do ensaio ou má realização do procedimento. Ensaios confiáveis para detecção de IgM são um pré-requisito para o diagnóstico correto da infecção aguda, sendo assim utilizados de forma crucial (NIEDRIG et al, 2009).

Com relação as metodologias utilizadas, 13 laboratórios utilizaram testes comerciais (12 Anti- Chikungunya Vírus IIFT IgM/ IgG, Euroimmun AG; 1 Chikungunya IgM Rapid Test, CTK Biotech Inc.) e 19 laboratórios utilizaram testes *in-house*. Sendo que não houve variação significativa ao comparar o tipo de ensaio ou a origem do ensaio (NIEDRIG et al, 2009).

Os laboratórios participantes dessa avaliação e que utilizaram *kits* comerciais não obtiveram reprodutibilidade em seus resultados e o questionamento fica se a problemática é sobre o kit ou sobre a forma na qual o procedimento foi realizado. Devido a falta de *kits* disponíveis no mercado e o questionamento sobre o desempenho dos mesmos, os laboratórios têm utilizado metodologias *in-house* que apresentam ótimo desempenho, garantindo alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico desta doença.

A metodologia de RT-PCR apesar de apresentar alta sensibilidade e especificidade possui reagentes e equipamentos muito caros para o uso ao redor do mundo, principalmente em países subdesenvolvidos (SAM et al, 2011). Uma opção para reduzir os custos sem alterações drásticas na sensibilidade e especificidade é o uso da Imunofluorescência Indireta para Detecção de Anticorpos, contudo os custos ainda permanecem inacessíveis para países subdesenvolvidos (YAP et al, 2010).

A metodologia mais amplamente utilizada devido ao seu custo-benefício é o ELISA. Além do seu custo relativamente baixo, apresenta facilidade no desempenho, contudo as desvantagens do teste para pesquisa de anticorpos é a possibilidade de reatividade cruzada com outros Alfavírus, a variação na sensibilidade devido ao genótipo utilizado na sensibilização e os valores variáveis de especificidade e sensibilidade. Por isso os estudos mostram a importância do entendimento da dinâmica da infecção, da resposta imune, além do tipo e da qualidade do antígeno utilizado no desenho do ensaio (SAM et al, 2011).

O CDC publicou em sua página em abril de 2015, uma avaliação de ensaios para detecção de IgM disponíveis comercialmente, as técnicas utilizadas e suas respectivas desempenhos. Os *kits* avaliados foram: Anti-CHIKV IgM (IFA), Anti-CHIKV IgM (ELISA), CHIKjj Detect MAC (ELISA), Anti-CHIKV IgM human (ELISA), CHIKV IgM  $\mu$ -capture (ELISA), RecombiLISA CHIK IgM (ELISA), SD Diagnostics CHIKa IgM (ELISA), On-site CHIK IgM Combo (Teste Rápido), SD Diagnostics SD BIOLINE CHIK IgM (Teste Rápido).

Os *kits* que obtiveram um ótimo desempenho foram: Anti-CHIKV IgM (IFA), Anti-CHIKV IgM (ELISA), CHIKjj Detect MAC (ELISA). Já Anti-CHIKV IgM human (ELISA) apresentou desempenho inconsistente. Todos os outros *kits* avaliados apresentaram desempenho ruim, Figura 16.

Figura 16 - Avaliação de ensaios para detecção de IgM disponíveis comercialmente segundo o CDC

CDC evaluation of commercially-available chikungunya virus IgM antibody assays			
Manufacturer	Assay	Type	Performance†
Euroimmun*	Anti-CHIKV IgM	IFA	High
Euroimmun*	Anti-CHIKV IgM	ELISA	High
Inbios*	CHIKjj Detect MAC	ELISA	High
Abcam (NovaTec)*	Anti-CHIKV IgM human	ELISA	Inconsistent
Genway (NovaTec)*	CHIKV IgM $\mu$ -capture	ELISA	Low
CTK Biotech	RecombiLISA CHIK IgM	ELISA	Low
SD Diagnostics	CHIKa IgM	ELISA	Low
CTK Biotech	On-site CHIK IgM Combo	Rapid	Low
SD Diagnostics	SD BIOLINE CHIK IgM	Rapid	Low

\*Available for purchase in the United States but not FDA-cleared  
†Compared to CDC IgM capture ELISA



Fonte: [https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV\\_Presentation.pdf](https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_Presentation.pdf)

Atualmente estão disponíveis *kits* para diagnóstico laboratorial da Febre de Chikungunya que são capazes de detectar a presença de antígenos e/ou anticorpos (IgM e/ou IgG). Para a detecção de antígenos, o método mais utilizado é o RT-PCR. As técnicas disponíveis para a detecção de anticorpos são mais abundantes, contudo apresentam uma grande dificuldade de desenho que pode ser associada as diferenças dos genótipos do vírus. Os métodos sorológicos mais utilizados são: ELISA, Teste Rápido e Imunofluorescência Indireta.

A técnica de RT-PCR apesar de apresentar alta sensibilidade e alta especificidade, tem como desvantagens o alto custo de implementação e manutenção, a necessidade de instrumentos altamente calibrados, treinamento de pessoal, consumo de tempo, trabalho intenso e apresenta altos riscos (biológico e de contaminação).

## 6 CONCLUSÃO

- Pôde-se concluir que os testes rápidos analisados apresentam baixas sensibilidade e especificidade, sendo o valor da sensibilidade ainda inferior quando comparado com a especificidade. Os ELISAs apesar de terem obtido valores de especificidade e sensibilidade superiores aos testes rápidos, não apresentam constância entre si, com maior discrepância nos valores de IgM quando comparados aos de IgG.
- Dentre as técnicas aqui relatadas, as que mostraram os melhores resultados frente a sensibilidade e especificidade foram o RT-PCR (antígenos) e a Imunofluorescência Indireta (anticorpos).

## REFERENCIAS

AL-MUHANDIS, N.; HUNTER, P. R. The Value of educational messages embedded in a community-based approach to combat dengue fever: a systematic review and meta regression analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Norwich, v. 5, n. 8, p. e1278.1-e1278.9, ago. 2011.

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

BLACKSELL, S. D. et al. Poor Diagnostic Accuracy of Commercial Antibody-Based Assays for the Diagnostic of acute Chikungunya Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Bangkok, v. 18, n. 10, p. 1773-1775, out. 2011.

BRISTOW, C. C. et al. A review of recent advances in rapid point-of-care tests for syphilis. **Sexual Health**, Los Angeles, v.12, p. 119-125, jan. 2015.  
Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/SH14166>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BURT, F. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, Bloemfontein, v. 17, n. 4, p. 107-117, abr. 2017.

CAMARA, B. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). **Biomedicina Padrão**, Brasil, 11 out. 2013. Disponível em:  
<<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/05/ELISA.html>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

CHANG, K. et al. Diagnosis and management of imported chikungunya fever in Taiwan: a case report. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, Kaohsiung, v. 26, n. 5, p. 256-260, maio 2010.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure. **Cambridge University Press**, Londres, 750 páginas, 1960. Disponível em:  
<[http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers\\_1960.pdf](http://www.dpi.inpe.br/geocxnets/wiki/lib/exe/fetch.php?media=wiki:christophers_1960.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2018.

GRAHAM, B. S.; REPIK, P. M.; YACTAYO, S. Chikungunya in the Americas: Recommendations and Conclusions. **The Journal of Infectious Diseases**, Geneva, v. 214, p. 510-513, dez. 2016. Suppl 5.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Dengue, vírus e vetor. **IOC, FIOCRUZ**, Brasil, [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>>. Acesso em: 30 jan. 2018.

KAY, N. S. et al. State of the art syphilis diagnostics: rapid point-of-care tests. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Londres, v. 12, n.1, p. 63-73, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14787210.2014.860356>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. **European Journal of Internal Medicine**, Katowice, v. 23, n. 4, p. 325-329, jun. 2012.

LITZBA, N. et al. Evaluation of the first comercial Chikungunya vírus indirect immunofluorescence test. **Journal of Virological Methods**, Berlim, v. 149, n. 1, p. 175-179, fev. 2008.

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

LOUNIBUS, L. P.; KRAMER, L. D. Invasiveness of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* and vectorial capacity for Chikungunya Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Nova York, v. 214, p. 453-458, dez. 2016. Suppl 5.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JÚNIOR J. B.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 37, n. 2, p. 111-130, jun. 2008.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Ferramentas dos imunologistas. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. [Porto alegre]: Artmed, 2010. p.747-749.

NIEDRIG, M. et al. International diagnostic accuracy study for the serological detection of chikungunya virus infection. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Hamburgo, v. 15, n. 9, p. 880-884, set. 2009.

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

PANNING, M. et al. Desempenho of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. **Journal of clinical microbiology**, Alemanha, v. 47, n. 9, p.3014-3016, set. 2009.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **Western Journal of Emergency Medicine**, Filadélfia, v. XVII, n. 6, p. 671-679, nov. 2016.

PRAT, C. M. et al. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for Chikungunya Virus. **Emergency Infectious Diseases**, Marselha, v. 20, n. 12, p. 2129-2132, dez. 2014.

REDDY, V. et al. Utility of UgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. **Journal of Medical Virology**, India, v. 84, n. 11, p. 1771-1778, nov. 2012.

SAM, C.; CHUA, C. L.; CHAN, Y. F. Chikungunya virus diagnosis in the developing world: a pressing need. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, Kuala Lumpur, v. 9, n. 12, p. 1089-1091, dez. 2011.

SANTOS, C. F. et al. Reverse transcription and ppolymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 1, p.1-11, mar. 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, Brasil, v. 49, n. 2, p. 1-13, jan. 2018.

SHUAIB, W. et al. Re-emergence of Zika Virus: a review on pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention. **The American Journal of Medicine**, Auburn, v. 129, n. 8, p. 879.e8-879.e12, ago. 2016.

SHUKLA, J. et al. Development and evaluation of antigen capture ELISA for early clinical diagnosis of chikungunya. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Gwalior, v. 65, n. 2, p. 142-149, jun. 2009.

SOUZA, M. T.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 102-106, mar. 2010.

ZARA ,A. L S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 391-404, jun. 2016.

ZELLER, H.; BORTEL, W. V.; SUDRE, B. Chikungunya: its history in Africa and Asia and spread to new regions in 2013-2014. **The Journal of Infectious Diseases**, Solna, v. 214, p. 436-440, dez. 2016. Suppl 5.