

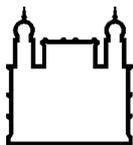
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

PREVALÊNCIA SOROLÓGICA DE INFECÇÕES POR DENGUE, ZIKA
E CHIKUNGUNYA VÍRUS EM GESTANTES ATENDIDAS NUMA
MATERNIDADE PÚBLICA, NO MUNICÍPIO DE NOVA IGUAÇU,
BAIXADA FLUMINENSE.

BERNARDO BASTOS WITTLIN

Rio de Janeiro
Abril de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

BERNARDO BASTOS WITTLIN

Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique da Silva Pilotto

RIO DE JANEIRO

Abril de 2018

Wittlin, Bernardo Bastos .

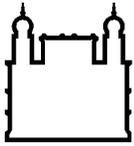
Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense. / Bernardo Bastos Wittlin. - Rio de Janeiro, 2018. xiii, 58 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientador: José Henrique da Silva Pilotto.

Bibliografia: f. 44-52

1. Zika virus . 2. Vírus Chikungunya. 3. Dengue. 4. Estudos Soroepidemiológicos . 5. Gestantes. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: BERNARDO BASTOS WITTLIN

Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Henrique da Silva Pilotto

Aprovada em: 26/04/2018

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Elba Regina Sampaio Lemos - Presidente (Fundação Oswaldo Cruz/IOC)

Prof.^a Dr.^a Flávia Barreto dos Santos (Fundação Oswaldo Cruz/IOC)

Prof.^a Dr.^a Cristina Barroso Hofer (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof.^a Dr.^a Dalziza Victalina de Almeida (Fundação Oswaldo Cruz/IOC)

Prof.^a Dr.^a Sheila Maria Barbosa de Lima (Fundação Oswaldo Cruz/Biomanguinhos)

Prof. Dr. Sérgio de Araújo Pereira (Fundação Oswaldo Cruz/IOC)

Rio de Janeiro, 26 de abril de 2018

Dedico esta dissertação à minha mãe, Helena, meu pai, Flavio, minha irmã, Gabriela, e minha esposa, Carolina, que compõem meu ribeirão de amores e de coragem.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

Ao Prof. Dr. José Henrique Pilotto, por sua precisa orientação e incentivo.

À Prof.^a Dr.^a Martha Suárez-Mutis, por seu apoio e incentivo.

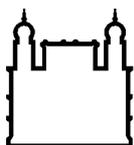
À Dr.^a Rosalina Jorge Koifman, pela prestimosa colaboração na análise estatística.

À Dr.^a Dalziza Victalina de Almeida, pela revisão e oportunas sugestões.

À minha companheira de vida e profissão, Carolina Cipriano Monteiro, por suas inestimáveis contribuições, intelectuais e afetivas.

Ao meu pai, Flavio Wittlin, por ter me inspirado desde sempre nos caminhos da medicina como expressão generosa do espírito humano.

“Um(a) cientista, que também é um ser humano, não deve descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento repousa em uma estante.”
— Albert Sabin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

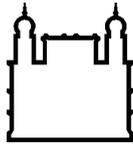
Prevalência sorológica de infecções por dengue, zika e chikungunya vírus em gestantes atendidas numa maternidade pública, no município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO MEDICINA TROPICAL

Bernardo Bastos Wittlin

Há décadas, a dengue constitui um enorme desafio em saúde pública no Brasil e no mundo. A este desafio, sobreveio a emergência de duas outras arboviroses, também transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes*: a zika e a febre chikungunya. Epidemias em diversos países do continente americano, a partir da década de 2010, levou-as a alcançar uma escala epidêmica inédita. Na esteira de um surto de microcefalia em recém-nascidos no Brasil em 2015, surgiram as primeiras evidências da associação entre a infecção por vírus zika (ZIKV) em gestantes e malformações fetais graves, reforçadas por estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Por sua vez, manifestações reumatológicas associadas à infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV) vêm ocasionando redução da qualidade de vida e produtividade nas populações afetadas. Enquanto foram reportadas variadas taxas de soroprevalência para a infecção por vírus dengue (DENV) no Brasil, são escassos os inquéritos sorológicos para ZIKV e CHIKV. O presente estudo objetivou avaliar a prevalência sorológica de DENV, ZIKV e CHIKV numa amostra de 349 gestantes atendidas numa maternidade pública de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro. Utilizou-se testes comerciais de ELISA de diferentes fabricantes. Dentre os resultados, houve 88,8% de sorologia positiva para DENV, 47,2% para ZIKV e 28,4% para CHIKV. Ainda que alguns estudos demonstrem alta especificidade de ELISA revestido por antígeno NS1 de ZIKV utilizado, a possibilidade de reações-cruzadas com DENV deve ser considerada. Em todo caso, os achados indicam um cenário de hiperendemicidade de dengue e um alcance significativo das recentes epidemias por ZIKV e CHIKV na Baixada Fluminense.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Serological prevalence of dengue, zika and chikungunya virus infections in pregnant women admitted to a public maternity hospital in the municipality of Nova Iguaçu, Rio de Janeiro state.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Bernardo Bastos Wittlin

For decades, dengue has been a major public health challenge in Brazil and worldwide. Superimposing this challenge, two other arboviruses, also transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, have been emerging recently: zika and chikungunya fever. Since the decade of 2010, outbreaks in several countries of the American continent led them to reach an unprecedented epidemiological scale. In the wake of an outbreak of microcephaly in Brazil in 2015, it emerged the first evidence of the association between zika virus (ZIKV) infection in pregnant women and severe fetal malformations, later reinforced by epidemiological, clinical and laboratory studies. In its turn, rheumatological manifestations associated with chikungunya virus (CHIKV) infection have been reducing quality of life and productivity in the affected populations. While several seroprevalence rates have been reported for dengue virus (DENV) infection in Brazil, serological surveys for ZIKV and CHIKV are scarce. The present study aimed to evaluate the serological prevalence of DENV, ZIKV and CHIKV in a sample of 349 pregnant women at admission to a public maternity hospital of Nova Iguaçu municipality, state of Rio de Janeiro. Among the results, there were 88.8% serology positive for DENV, 47.2% for ZIKV and 28.4% for CHIKV. Although some studies demonstrate high specificity of NS1 antigen-coated ELISA utilized, the possibility of cross-reactions with DENV should be considered. In any case, the findings indicate a dengue hyperendemicity scenario and a significant reach of the recent outbreaks of ZIKV and CHIKV in the region.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dengue: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial	1
1.2 Zika: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial	5
1.3 Chikungunya: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial	8
1.4 Métodos sorológicos e suas limitações	11
1.4.1 Dengue e Zika	11
1.4.2 Chikungunya	14
1.4.3 Descrição dos principais métodos	15
1.5 Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya em gestantes no mundo	17
1.6 Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya, de base-populacional e em populações específicas, no Brasil	19
1.7 Justificativa	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAL MÉTODOS	24
3.1 Desenho do estudo	24
3.2 Localidade e Instituições	24
3.3 População do estudo e seleção dos participantes	25
3.4 Plano amostral	26
3.5 Fluxo, coleta de dados e de espécimes clínicos	26

3.6	Avaliações e técnicas laboratoriais	27
3.6.1	Diagnóstico de Dengue, Zika e Chikungunya	27
3.6.2	Diagnóstico de HIV e Sífilis	28
3.7	Variáveis do estudo	28
3.8	Aspectos éticos	29
3.9	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
5	DISCUSSÃO	36
6	PERSPECTIVAS	42
7	CONCLUSÕES	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
9	ANEXOS	53
9.1	Ficha de Entrevista das Participantes	53
9.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localização do município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil.....	25
Figura 2. Mapas do município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.....	32
Figura 3. Locais de moradia das gestantes recrutadas em maternidade pública de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, de março a agosto de 2017.....	32

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya em gestantes, no mundo, a partir da década de 2000.....	18
Quadro 2. Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya no Brasil.....	20
Tabela 1. Dados demográficos e obstétricos relativos às gestantes recrutadas em maternidade pública de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, de março a agosto de 2017 (n=349).....	31
Tabela 2. Resultado dos testes de ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017.....	33
Tabela 3. Total de amostras com positividade combinada (IgG e/ou IgM positivos) em ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017.....	33
Tabela 4. Testes-rápidos para HIV e Sífilis, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017.....	34
Tabela 5. Indicadores de validade para informação oral referente a diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya, tendo como padrão-ouro soroprevalência, em gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017 (n = 349).....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	antibody-dependent enhancement (amplificação dependente de anticorpo)
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CHIKV	vírus chikungunya
DENV	vírus dengue
ECSA	genótipo Leste-Centro-Sul Africano do chikungunya vírus
ED I/II/III	domínios I, II e III da glicoproteína E (envelope) de flavivírus
ELISA	ensaio de imunoabsorção imunoenzimática
FRNT	“focus reduction neutralization test” (teste de neutralização por redução de focos)
GAC-ELISA	ensaio imunoenzimático de captura para imunoglobulina G
HGNI	Hospital Geral de Nova Iguaçu
IFI	imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IH	inibição da hemaglutinação
IOL	linhagem do Oceano Índico do chikungunya vírus
JEV	vírus da encefalite japonesa
MAC-ELISA	ensaio imunoenzimático de captura para imunoglobulina M
MS	Ministério da Saúde do Brasil
MVE	vírus da encefalite de Murray Valley
NS1	“non-structural protein 1” (proteína viral não-estrutural 1)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PRNT	“plaque reduction neutralization test” (teste de neutralização por redução de placas)
RT-PCR	Técnica de transcriptase reversa com reação em cadeia da polimerase
SGB	síndrome de Guillain-Barré
TBEV	vírus da encefalite transmitida por carrapatos
VPN e VPP	valor preditivo negativo e valor preditivo positivo
WNV	vírus do Oeste do Nilo
YFV	vírus da febre amarela
ZIKV	vírus zika

1 INTRODUÇÃO

O aumento da mobilidade e das migrações humanas, o desordenado processo de urbanização, bem como o fenômeno de aquecimento global vêm contribuindo para o avanço das epidemias pelos chamados arbovírus (do inglês, "arthropod-borne virus"), com destaque para aqueles transmitidos pelo mosquito do gênero *Aedes*. Há décadas, a dengue constitui um enorme desafio em saúde pública, no Brasil e no mundo, agravado por sua expansão geográfica e um aumento do número e magnitude de epidemias, além de suas formas graves e mortes (1). A este desafio, que por si só justificava o empenho de recursos e esforços globais na tentativa do controle dos vetores, sobreveio a emergência recente de duas outras arboviroses de particular importância: a zika e a febre chikungunya. Sua introdução e disseminação pelas Américas em meados da década de 2010 levou-as a alcançar uma escala epidêmica inédita (2, 3).

Ao final do ano de 2015, na esteira de um surto de microcefalia em recém-nascidos no Brasil, surgiram as primeiras evidências da associação entre a infecção por vírus zika em gestantes e malformações fetais graves, posteriormente reforçadas por estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Tais evidências levaram ao Ministério da Saúde brasileiro e a Organização Mundial de Saúde a decretarem estado de emergência (4-8).

Por sua vez, a febre Chikungunya cresceu em importância a partir da década de 2000, devido a diversas epidemias em ilhas do Oceano Índico e na Ásia (9). Manifestações reumatológicas associadas à mesma vêm ocasionando redução da qualidade de vida e produtividade nas populações afetadas (10). Os primeiros casos autóctones da febre chikungunya no Brasil foram confirmados no segundo semestre de 2014, com progressiva disseminação pelo território nacional (3).

1.1 Dengue: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial

A dengue é a arbovirose mais comum em todo o mundo, sendo causada pelo vírus dengue (DENV), membro do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. O vírus é composto por uma fita única de ácido ribonucléico (RNA), de sentido positivo, e um envelope esférico contendo três proteínas estruturais (capsídeo C, membrana M e

envelope E). Existem quatro tipos de vírus (DENV1-4), distintos do ponto de vista filogenético e antigênico. DENV é transmitido por mosquitos da espécie *Aedes aegypti* e, em menor grau, por *Aedes albopictus* (1).

A doença impõe risco a aproximadamente metade da população mundial (3.97 bilhões de pessoas, atingindo ao menos 128 países), segundo estimativas de um estudo de 2012 (11). Sua incidência aumentou 30 vezes ao longo de 50 anos, sendo atualmente endêmica em mais de 100 países das Américas, do Sudeste Asiático, do Pacífico Ocidental, da África e do Mediterrâneo Oriental (12). Estima-se a ocorrência de 390 milhões de casos por ano (IC 95%: 284 a 528), dos quais 96 milhões seriam sintomáticos (13). Entretanto, essas estimativas são consideravelmente incertas, tendo em conta as deficiências de muitos sistemas nacionais de vigilância, levando a subnotificações, e diferenças nos processos, critérios de notificação e produção de dados desses sistemas (14).

No Brasil, a doença reemergiu pontualmente em Roraima em 1981 (epidemia causada por DENV-1 e DENV-4), após décadas de controle propiciado pelo programa de erradicação do mosquito vetor da febre amarela urbana (15). Em 1986, foi reintroduzida no Rio de Janeiro (DENV-1), espalhando-se então por diversos outros estados (16). DENV-2 e DENV-3 foram também primeiramente identificados no Rio de Janeiro, respectivamente nos anos de 1990 e 2000. Em 2010, DENV-4 reemergiu em Roraima, ocorrendo posterior disseminação para as demais regiões do país (17). Até a década de 2000, a doença predominava em adultos e em cidades populosas (>500.000 habitantes). A partir daí, houve uma mudança de padrões epidemiológicos no país: uma interiorização da doença (para cidades com <100.000 habitantes), um aumento da proporção de crianças com febre do dengue e dengue grave, um aumento global de incidências nos ciclos epidêmicos e, por fim, um aumento da proporção, mortalidade e letalidade de dengue grave. A mortalidade por dengue aumentou 39 vezes de 2000 a 2011, enquanto que a letalidade de dengue grave dobrou (18, 19).

Os ciclos de epidemias de dengue variam têmporo-espacialmente e são resultantes da interação dinâmica de variáveis complexas, relativas à população, ao mosquito, ao vírus e ao meio ambiente. A infecção por um tipo viral confere imunidade duradoura ao mesmo, mas somente transitória aos demais. Desta forma, a circulação e predomínio de determinado tipo e sorotipo viral é influenciada pelo *status* imune populacional e capacidade replicativa viral ("fitness"), determinando também possíveis mudanças no padrão etário da doença ao longo do tempo, tal

qual ocorreu no Brasil. A ocorrência e proporção de infecções assintomáticas podem ter importância para compreensão da epidemiologia e patogênese da doença, sendo influenciada pelas características virais e genética dos hospedeiros (20).

O DENV produz uma doença febril aguda com espectro clínico variado, desde apresentações assintomáticas e oligossintomáticas, até formas graves. Após o período de incubação, a doença começa abruptamente e é seguida por três fases: febril, crítica e de recuperação. A primeira fase é marcada por febre elevada, de duração de 2-7 dias, associada à cefaleia, dor retro-orbitária, adinamia, mialgias e artralgias. Exantema pode estar presente em 50% dos casos, predominantemente do tipo máculo-papular. Anorexia, náuseas, vômitos, diarreia e pequenas manifestações hemorrágicas (petéquias e sangramento gengival) também podem estar presentes. A fase crítica inicia-se entre o terceiro e sétimo dia e coincide em geral com a defervescência. É marcada pela ocorrência de aumento da permeabilidade capilar e extravasamento plasmático (com aumento de hematócrito), além de leucopenia e plaquetopenia. O grau de extravasamento plasmático varia e é, na maior parte das vezes, transitório. Quando intenso, o paciente apresenta a forma grave da doença, geralmente com sinais de alarme, podendo evoluir para choque, disfunções orgânicas, com ou sem hemorragias. A fase de recuperação se dá com a reabsorção gradual do conteúdo extravasado e progressiva melhora clínica (1, 20).

Uma série de estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que indivíduos com reinfecção e crianças com infecção no primeiro ano de vida, tendo nascidas de mães com exposição prévia a DENV, apresentam risco maior para o desenvolvimento de dengue grave (21, 22). A hipótese mais favorecida por evidências a explicar tal fenômeno é a da amplificação dependente de anticorpo (em inglês, "antibody-dependent enhancement" ou ADE). Segundo a mesma, diante de uma infecção secundária por novo sorotipo viral, anticorpos subneutralizantes e de reatividade-cruzada originados da primo-infecção (ou adquiridos passivamente via transplacentária) ligar-se-iam aos vírus, facilitando sua entrada nas células que expressam receptores de Fc. O aumento de células infectadas levaria, assim, à maior viremia e à indução de intensa resposta inflamatória, com liberação de citocinas e mediadores, culminando com extravasamento plasmático (23-25). Os linfócitos T de memória também parecem ter participação no processo. Compreende-se, pois, como "pecado antigênico original" as alterações da resposta imune durante uma infecção secundária, marcadas pelo predomínio da resposta

humoral e celular mais específica contra o sorotipo da primo-infecção (26). Ressalta-se que a infecção por determinado sorotipo é capaz de produzir temporariamente proteção-cruzada aos demais sorotipos (27). Este fato poderia estar relacionado a títulos bastante elevados de anticorpos heterotípicos nos meses subsequentes à infecção, o que compensaria, no curto prazo, o baixo poder de neutralização dos mesmos (28).

Pouco ainda se sabe acerca de possíveis riscos relacionados à infecção aguda por DENV durante a gestação, tanto em relação aos desfechos fetais quanto aos maternos. Ao agrupar diversos estudos, uma meta-análise publicada em 2016 não logrou resultados consistentes e estatisticamente significativos no que tange aos desfechos fetais, embora tenha apontado uma tendência a aumento de partos prematuros e baixo-peso ao nascer (29). Outra meta-análise de 2017 concluiu que o conjunto de estudos analisados não evidenciavam relação da infecção por DENV com parto prematuro, baixo-peso, abortamento ou morte fetal (30). Em estudo posterior não contemplado pelas referidas meta-análises, Nascimento et al. (2017) utilizaram a base nacional de dados referente a casos notificados (SINAN) e nascidos vivos (SINASC) no Brasil, de 2007 a 2013, tendo incluído 3.898 gestantes dengue-positivas, 3.165 gestantes dengue-negativas e 3.898 respectivas crianças. Após análise ajustada, encontraram uma razão de chances de 1,26 para parto prematuro (IC 95%; 1,06-1,49, $p=0,006$), sem diferença no risco para malformações e baixo-peso (31). Em particular, sabe-se que transmissão vertical e dengue neonatal, decorrente de infecção materna perinatal, pode ocorrer, tendo sido reportada por diversos relatos e séries de casos, avaliados em conjunto por revisão sistemática de 2010 (32). Além disso, um estudo retrospectivo sugere aumento do risco materno para dengue grave durante a gestação (33).

Durante a infecção aguda, a viremia dura aproximadamente 4-5 dias, coincidindo com a fase febril da doença. Na fase precoce, o diagnóstico é possível através de técnicas que detectem o vírus ou seus componentes, a partir do soro ou, menos usualmente, de tecidos *post mortem*. Dentre elas, estão o isolamento viral (inoculação em mosquito ou cultura em linhagem celular *A albopictus* C6/36), detecção de RNA viral pela técnica de transcriptase reversa com reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, RT-PCR em tempo real) e detecção do antígeno NS1 – uma proteína viral não-estrutural secretada por células de mamíferos infectadas por flavivírus – através de teste-rápido ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (1, 20).

Na infecção primária, a detecção de imunoglobulina M (IgM) ocorre a partir de 5-6 dias após o início da febre, com pico em 2 semanas e desaparecimento em 2-3 meses. Já os títulos de imunoglobulina G (IgG) começam a se elevar, lentamente, a partir de 8-10 dias, com persistência por muitos anos ou por toda a vida. Desta forma, o diagnóstico de infecção recente pode ser feito através da detecção de IgM (a partir do quinto dia), e de IgG em amostras pareadas (aumento de 4 vezes ou mais dos títulos da fase aguda para a fase de convalescença). Nas infecções secundárias, os títulos de IgG sobem rapidamente após o início da infecção, seguido de reaparecimento de IgM em títulos usualmente baixos, na fase de recuperação; em alguns casos, IgM pode não ser detectada. Desta forma, além do pareamento de IgG, a razão IgG/IgM pode ser utilizada para o diagnóstico da infecção recente secundária. Dentre as técnicas sorológicas mais comumente usadas está o ELISA, com seus diferentes formatos, como o ELISA de captura (MAC-ELISA e GAC-ELISA) e ELISA indireta. Outra técnica utilizada, porém de realização mais demorada, é a detecção de anticorpos anti-dengue pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH) com amostras pareadas, especialmente útil para diferenciação de infecções secundárias de primárias, em função de pontos de corte distintos definidos (1, 34, 35).

1.2 Zika: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial

O ZIKV, assim como o DENV, é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda. Apesar de o vírus ter sido repetidamente isolado nos 50 anos seguintes à sua descoberta, somente 14 casos de infecção em humanos foram notificados até abril de 2007, quando uma epidemia ocorreu na ilha Yap na Micronésia (36). Esta epidemia representou a primeira vez em que o ZIKV foi detectado fora da África e da Ásia. Até o momento, três linhagens principais do ZIKV foram descritas, duas de origem africana (grupo Nigeriano e grupo Ugandense MR766) e uma asiática (37). Em 2013, a linhagem asiática do ZIKV chegou à Polinésia Francesa, provavelmente introduzida a partir do Sudeste Asiático. Na sequência, disseminou-se por diversas outras ilhas da do Pacífico Sul, incluindo Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (38).

No Brasil, a confirmação inicial de casos da doença se deu em 2015, a partir da identificação do vírus nos estados da Bahia e Rio Grande do Norte (39, 40).

Entretanto, desde o fim de 2014, grupos de pacientes com quadros compatíveis vinham se acumulando em municípios do Nordeste brasileiro (39). Estudos utilizando análises filogenéticas e/ou modelos matemáticos sugerem que a introdução do vírus no Brasil ocorreu entre o final de 2013 e início de 2014, disseminando-se posteriormente para o restante das Américas (41-43). Já ao final de 2015, casos autóctones se acumulavam em dezoito estados das cinco macrorregiões brasileiras (2). Em 2016, a taxa de incidência (casos suspeitos) foi de 104,7 por 100.000 habitantes no Brasil e, em 2017, de 8,4 (até a semana epidemiológica 50), havendo portanto uma redução de 92% de casos no último ano em relação ao anterior. No estado do Rio de Janeiro, as incidências de 2016 e 2017 foram respectivamente de 429,6 e 13,3 (44). Salienta-se que, em períodos epidêmicos, o Ministério da Saúde (MS) recomenda que o diagnóstico de casos não-complicados e em não-gestantes limite-se a critérios clínico-epidemiológicos, o que de um lado reduz o custo e impõe prioridade à confirmação laboratorial para os casos de maior morbidade, e de outro reduz a precisão diagnóstica. Além disso, sabe-se que em torno de 80% das infecções por ZIKV são assintomáticas, o que sem dúvida leva a subestimação de casos pelos sistemas de notificação.

Embora o principal modo de transmissão do ZIKV seja através da hematofagia de mosquitos vetores, estudos indicam que o vírus pode ser transmitido também por via sexual, o que pode ter contribuído para a rápida dispersão viral (45-47). Em um estudo (48), o qual tomou por base os casos notificados de zika no estado do Rio de Janeiro, verificou-se uma incidência proporcionalmente maior da infecção em mulheres, comparadas aos homens. Após correção para eventuais vieses, tais como, testagem sistemática da infecção em gestantes e maior procura por atendimento médico pelas mulheres, os autores encontraram uma probabilidade 90% maior de mulheres em idade reprodutiva contraírem ZIKV, em relação aos homens. Com efeito, a transmissão sexual seria a causa mais provável desta diferença.

Os quadros sintomáticos (cerca de 20%) cursam comumente com exantema, febre baixa ou ausente, artrite ou artralgia, podendo haver conjuntivite não-purulenta, mialgia, cefaleia, dor retro-orbitária, edema e vômitos. Seu curso é quase sempre benigno, não determinando hospitalização. A ocorrência de formas assintomáticas acarreta, em larga medida, uma subnotificação da doença na população e pode levar ao diagnóstico tardio de síndrome congênita por ZIKV em fetos e bebês expostos (38, 49).

Um aumento incomum do número de recém-nascidos com microcefalia começou a ser detectado meses após os surtos de ZIKV se iniciarem no nordeste brasileiro, causando um alarme mundial de emergência em saúde pública (6, 50). Subseqüentes estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais (envolvendo células-tronco neurais e modelos animais) vêm endossando a associação causal entre a infecção pelo ZIKV na gravidez e o desenvolvimento de malformações fetais, embora ainda persistam relevantes lacunas de conhecimento (4, 8). Possíveis cofatores ainda não identificados poderiam concorrer para tais desfechos e explicar a concentração de casos de microcefalias em determinadas regiões geográficas, em contraste com outras. A "síndrome congênita do ZIKV" passou a ser incluída no rol das infecções congênitas, tendo na microcefalia o seu desfecho mais marcante. Ao lado desta, outras manifestações a compõem: desproporções craniocaudais, espasticidade, irritabilidade, convulsões, disfunções do tronco encefálico (como, dificuldades para se alimentar), anormalidades oculares e achados de neuroimagem, incluindo calcificações, lesões corticais e hidrocefalia (51). Um estudo de coorte no Rio de Janeiro demonstrou anormalidades fetais, através de ultrassonografia com "doppler", em 12 (29%) de 42 gestantes com infecção documentada por ZIKV. Entre os desfechos adversos: 2 casos de aborto, 5 casos de restrição de crescimento intrauterino com ou sem microcefalia, 7 casos de calcificações ventriculares ou outras lesões do sistema nervoso central, e 7 casos de anormalidade em volume amniótico ou fluxo de artéria umbilical (49). Em novembro de 2015, o MS passou a monitorar os casos de microcefalia por sistema de notificação compulsória. Segundo dados cumulativos, até a semana epidemiológica 50 de 2017, 2.753 foram confirmados e 141 foram classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação, excluídos os casos ainda sob investigação. Dos óbitos fetais e neonatais relacionados a infecção congênita durante a gestação, 30 foram confirmados e 7 foram classificados como prováveis (52).

Além disso, a infecção adquirida por ZIKV vem sendo associada a complicações neurológicas pouco frequentes, porém potencialmente graves, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (8). Esta síndrome manifesta-se como uma paralisia flácida ascendente, sendo uma condição imunomediada e frequentemente deflagrada por variados agentes infecciosos (virais e bacterianos), dias ou semanas após a infecção. Um estudo de caso-controle realizado na Polinésia Francesa observou que evidência sorológica de infecção prévia por ZIKV foi maior nos casos

comparados ao controles, refletindo uma razão de chances de 59,7% (IC 95%; 10.4- $\pm\infty$) (53).

O diagnóstico específico da infecção por ZIKV se baseia na detecção de ácido nucleico viral (RNA viral) por técnicas moleculares, como RT-PCR, bem como na detecção de anticorpos IgM através de técnicas sorológicas, como MAC-ELISA. A positividade de testes moleculares no soro oferece um diagnóstico definitivo, contudo a infecção aguda por ZIKV produz viremia transitória, até 5-11 dias. Isso acarreta um limite a esta técnica, considerando que muitos pacientes chegam tardiamente ou sequer procuram atendimento, uma vez acometidos por quadros oligo ou assintomáticos. Existem, contudo, algumas evidências de que a positividade é algo mais longa em amostras de urina (até 14 dias), o que poderia aumentar a capacidade diagnóstica dessas técnicas (38, 54).

A cinética de anticorpos da infecção por ZIKV não é ainda bem definida, no entanto, baseado no conhecimento de outros flavivírus, estima-se que anticorpos IgM surjam após 1 semana do início dos sintomas e persistam por vários meses. Desta forma, a detecção de IgM por testes sorológicos (e.g., MAC-ELISA, ELISA indireta, ELISA competitivo, imunofluorescência indireta) oferece a possibilidade de diagnóstico após o período de viremia. Todavia, reações-cruzadas com anticorpos de outros flavivírus é frequente, o que limita esta técnica em zonas de cocirculação (e.g., com DENV) (55). Com isso, a detecção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, mais específica e útil para diferenciação de vírus muito próximos, pode ser útil para confirmação em caso de ELISA positivo. O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) é considerado padrão-ouro para este fim. No entanto, sua pouca disponibilidade em laboratórios e suas exigências técnicas (envolve manipulação de vírus vivos e demora cerca de 1 semana para obtenção do resultado) dificultam seu uso na prática clínica (38).

1.3 Chikungunya: epidemiologia, manifestações clínicas, complicações e diagnóstico laboratorial

A febre de Chikungunya é causada pelo CHIKV, pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*. É um vírus de RNA fita-simples de sentido positivo, com genoma de aproximadamente 12.000 pares de bases (9). Foi isolado pela primeira vez em 1952, na Tanzânia. O primeiro surto de CHIKV, no entanto, foi identificado na Ásia, causando epidemias na Índia e no sudeste Asiático entre os

anos de 1950s e 1980s. Após esse período, a doença permaneceu sem ser detectada pelos sistemas de vigilância, refletindo provável arrefecimento de sua disseminação. Em 2004, o CHIKV reemergiu na África Oriental, de onde se disseminou globalmente. Desde sua descoberta, três genótipos do CHIKV foram descritos: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) e Asiático (56). A partir do genótipo ECSA, emergiu uma linhagem responsável por epidemias explosivas nas Ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011, denominada linhagem do Oceano Índico (IOL) (56). Diversas cepas da IOL desenvolveram mutações na proteína do envelope viral E1, que aumentaram a transmissibilidade e infectividade em *Aedes albopictus*, o que foi associado a surtos explosivos (57). Uma notável epidemia em 2005-2006 atingiu as Ilhas Reunião, território francês no Oceano Índico, previamente "naíve" para CHIKV, ensejando inúmeros estudos epidemiológicos e clínicos (58, 59).

Em 2013, o genótipo Asiático do CHIKV foi detectado na região do Caribe, expandindo-se em 2014 para as áreas continentais das Américas (60). No Brasil, além do genótipo Asiático detectado no Amapá e provavelmente importado da Guiana Francesa, também foi evidenciada a circulação do genótipo ECSA na Bahia, introduzido provavelmente de Angola onde este genótipo seria endêmico (61). Desta forma, o Brasil apresenta uma situação única no contexto da epidemia do CHIKV nas Américas, com a cocirculação de cepas virais de dois genótipos distintos. Além disso, a dispersão do genótipo ECSA no Brasil cria um ambiente propício para a ocorrência de surtos similares aos observados nas ilhas do Oceano Índico, uma vez que o *Ae. albopictus*, além do *Ae. aegypti*, está presente no país (62).

Ao final de 2014, além de casos importados esparsos, já havia registros de casos autóctones em oito municípios de cinco estados brasileiros, com progressão da autoctonia nos anos de 2015 e 2016, até atingir todos os estados. Em 2016, a taxa de incidência (casos suspeitos) no Brasil foi de 134,3 por 100.000 habitantes e, em 2017, de 90,1 (até a semana epidemiológica 50). No estado do Rio de Janeiro, o pico epidêmico deu-se em 2016 (incidência de 110,9), sofrendo uma retração em 2017 (incidência de 25,2). A exemplo da dengue e da zika, o MS recomenda que, em zonas de transmissão sustentada, o diagnóstico de casos não-complicados se baseie em critérios clínico-epidemiológicos, o que acarreta redução da precisão diagnóstica (44).

Entre os indivíduos infectados por CHIKV, há uma elevada proporção de formas sintomáticas (>70% dos infectados), especialmente se comparado a outras

arboviroses. Estudos de soroprevalência revelaram que, dentre os positivos, de 3.8% a 27.7% não relataram sintomas (9). Dentre as manifestações agudas da doença, estão: febre alta de início abrupto, artralgias, mialgias, cefaleia, dor lombar e prostração. Artralgia e artrite são bastante frequentes e marcantes (87-98%) (9). Mais comumente, são poliarticulares e simétricas, embora nem sempre, podendo atingir tanto pequenas quanto grandes articulações. Podem ocorrer manifestações cutâneas em 40-50% dos pacientes. A forma mais comum é um exantema macular ou pápulo-macular, envolvendo face, tronco e extremidades, por vezes pruriginoso. Outras lesões dermatológicas possíveis incluem: dermatite esfoliativa, hipermelanose, hiperpigmentação, fotossensibilidade, vesículas, bolhas e lesões de vasculite. Náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, fotofobia, dor retro-orbitária e linfadenopatia são outras manifestações descritas (9, 63). A evolução para uma fase tardia, com manifestações reumatológicas subagudas e crônicas, pode ocorrer em 40-80%, com impacto na qualidade de vida e produtividade. Nesse caso, as manifestações mais comuns são poliartralgia, poliartrite e mialgias (10).

Uma coorte prospectiva envolvendo gestantes infectadas por CHIKV durante epidemia na Ilha Reunião, no Oceano Índico, em 2006, demonstrou que os sintomas e sinais da fase aguda nesse grupo pouco diferiam da população geral, com exceção da ocorrência de epistaxe e gengivorragia (9%). O número de cesarianas, de sangramento no terceiro trimestre, prematuridade, recém-natos com baixo peso, natimortos e malformações fetais não diferiu das gestantes não-infectadas (59). A transmissão vertical é incomum e, quando ocorre, se dá no período periparto, relacionando-se com a viremia materna no momento do parto. Nessas situações de infecção congênita, o recém-nascido pode apresentar quadro grave, poucos dias após o nascimento, com febre, dor, prostração e trombocitopenia, além de acometimento neurológico (encefalopatia e sangramento intracraniano), hemodinâmico, cardiovascular, digestivo e cutâneo (9, 63).

O diagnóstico laboratorial de CHIKV é baseado na detecção direta do vírus (isolamento viral), do RNA viral (através de RT-PCR) e de anticorpos específicos. Na fase de viremia (até sete dias após o início dos sintomas), o PCR é de mais fácil e rápida execução, além de permitir a contagem da carga viral. Após este período, o emprego de técnicas sorológicas está indicado. O diagnóstico de infecção recente se faz através da detecção de anticorpos IgM (e.g., ELISA ou teste rápido por imunocromatografia) e/ou aumento dos títulos de IgG em 4 vezes. Os títulos de IgM costumam negativar após 3-6 meses. Na fase aguda, a detecção de IgM pode

ocorrer em 4 a 22% dos casos, aumentando para 80% após 1 semana de doença. Já os títulos de IgG costumam persistir por muitos anos (64, 65). Analogamente aos flavivírus, pode haver reação-cruzada quando há infecção por outros alfavírus (*e.g.*, Mayaro), ensejando o papel da pesquisa de anticorpos neutralizantes para devida diferenciação em áreas de cocirculação (66).

1.4 Métodos sorológicos e suas limitações

1.4.1 Dengue e Zika

Ao longo das últimas décadas, os inúmeros inquéritos sorológicos de dengue têm utilizado diferentes técnicas (Quadros 1 e 2), com destaque para o ELISA e a inibição da hemaglutinação (IH), os quais apresentam resultados menos equívocos na ausência de outros flavivírus circulantes. De fato, a ocorrência de reações-cruzadas de anticorpos para diferentes flavivírus é um fenômeno há muito conhecido (67, 68), assumindo importância ainda maior na atualidade, devido à ampla cocirculação desses vírus. A maior parte dos estudos de soroprevalência de zika, consideravelmente mais escassos na literatura que os de dengue, tem encerrado limitações desta natureza (69). Desta forma, em alguns deles, a pesquisa de anticorpos neutralizantes foi empregada, de modo complementar, visando à maior especificidade. Ademais, o fenômeno de reatividade-cruzada não somente impõe desafios ao diagnóstico e inquéritos sorológicos, como tem implicações complexas nas respostas imunes e patogênese de infecções flavivirais sequenciais.

Sabe-se que os flavivírus apresentam uma organização estrutural básica e comum, com diversas similaridades em seus componentes moleculares, sendo agrupados em diferentes soro-complexos de acordo com o nível de interseção antigênica. Estudos com DENV demonstraram que a resposta humoral tem como alvos principais as glicoproteínas do envelope E e prM, bem como a proteína não-estrutural NS1 (70). A NS1 é secretada pelas células infectadas e está relacionada à capacidade de evasão imune e patogênese do DENV. Já a proteína E é responsável pela ligação, fusão e entrada do vírus nas células hospedeiras, sendo o alvo principal de anticorpos neutralizantes, relacionados à proteção específica e duradoura. Por outro lado, tanto a proteína E quanto a prM deflagram também a produção de anticorpos subneutralizantes, os quais podem apresentar reatividade-cruzada com sorotipos heterólogos e estão implicados na patogênese da dengue

grave pelo fenômeno da ADE, como descrito anteriormente (25). A capacidade de neutralização ou não de um vírion parece estar relacionada não só ao grau de afinidade de determinado anticorpo, mas à superação de um limiar de ligações antígeno-anticorpo, dependente da quantidade de anticorpos e da exposição de epítomos aos mesmos (28, 71). Desta forma, respostas imunológicas em indivíduos apresentando infecção secundária podem levar a desfechos variados e mesmo antagônicos, como proteção-cruzada transitória de um lado e exacerbação da doença de outro. A genética do hospedeiro, a genética viral, a ordem sequencial de sorotipos e o intervalo de tempo entre as exposições parecem influenciar tais desfechos. Para além dos sorotipos de DENV, os fenômenos imunológicos, fisiopatogênicos e clínicos decorrentes de exposições sequenciais a diferentes flavivírus (*e.g.*, pacientes infectados por ZIKV com prévia infecção por DENV, e vice-versa) são ainda menos conhecidos.

Pesquisas envolvendo amostras de soro de pacientes infectados por DENV ou por ZIKV, obtidas durante as fases aguda e de convalescença, demonstraram elevado grau de reações-cruzadas entre ambos os flavivírus. Dejnirattisai et al. (2016) testaram amostras de crianças tailandesas infectadas por DENV, obtidas entre 2002-2004, época em que não havia circulação de ZIKV na região. Das 18 amostras, todas apresentaram positividade para ZIKV em teste de IgM/IgG ELISA de captura (72). Priyamvada et al. (2016) utilizaram amostras de 14 pacientes tailandeses com infecção por DENV, todas igualmente positivas em teste de IgG ELISA baseado em lisado de ZIKV (73). De modo inverso, Lanciotti et al. (2008) realizaram ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgM contra diferentes flavivírus em 23 amostras de pacientes obtidas durante surto de ZIKV no estado de Yap, Micronésia, em 2007. A especificidade do teste de IgM ELISA anti-ZIKV foi alta para os pacientes com critérios de infecção primária por ZIKV/flavivírus. Já para os pacientes com critérios de infecção provável por ZIKV/secundária por flavivírus, houve ampla positividade de ELISA IgM para DENV, vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite de Murray Valey (MVE) e vírus do Oeste do Nilo (WNV) (74). Em outro trabalho mais recente, Felix et. al (2017) testaram 61 amostras de soro de pacientes com infecção comprovada por ZIKV, utilizando três testes comerciais para DENV, encontrando altas frequências de IgM positivo e soroconversão, mesmo entre os pacientes previamente DENV-não-imunes (75).

Dadas as limitações no uso de soros naturalmente policlonais nesses estudos (*i.e.*, não é possível individualizar os anticorpos, seus respectivos alvos antigênicos e suas propriedades funcionais), em alguns deles foram confeccionados painéis de anticorpos monoclonais (mAbs), a partir de células B de memória presentes nesses soros (72, 73, 76). Priyamvada et al., ao construírem um painel de 47 mAbs anti-DENV derivado do soro de pacientes com infecção comprovada por DENV, observaram que quase a metade dos mAbs (26/47) apresentava afinidade com ZIKV (lisado e/ou partícula inteira), mormente anticorpos contra epítomos da glicoproteína do envelope E (73). Já Stettler et al. (2016), desenvolveram um painel com 119 mAbs anti-ZIKV, a partir do soro de pacientes com infecção comprovada por ZIKV. Neste estudo, um subgrupo de mAbs, que se ligavam a NS1 mostraram-se, em larga medida, ZIKV-específicos. Segundo os autores, a similaridade da sequência de aminoácidos que constituem as proteínas NS1 de ZIKV e DENV é de 51-53%. Em contraste, mAbs contra os domínios I e II da glicoproteína E (EDI/II) mostraram elevada reatividade-cruzada, apresentando baixa capacidade neutralizante e induzindo ADE *in vitro* e em cobaias. Enquanto isso, os mAbs mais neutralizantes tiveram como alvo o domínio III da proteína E (EDIII) e epítomos quaternários (76).

Além da ampla ocorrência de anticorpos de afinidade-cruzada e baixo poder neutralizante, alguns estudos sugerem que infecções por DENV e ZIKV poderiam produzir também, em graus variados, anticorpos neutralizantes com reatividade-cruzada (73, 74, 77, 78). Isto foi observado no já referido estudo de Priyamvada et al., ao testarem soros de pacientes com infecção aguda comprovada por DENV com teste de neutralização para ZIKV (73). Os mesmos pesquisadores observaram que, dentre os 47 anticorpos que compunham o painel de mAbs derivado desses soros, e dos quais quase a metade apresentava afinidade com ZIKV, houve uma parcela menor (7/26) que apresentava potencial neutralizante, evidenciando o fenômeno em nível monoclonal. Por outro lado, Dejnirattisai et al. (2016) não encontraram níveis significativos de anticorpos neutralizantes para ZIKV entre amostras de pacientes com infecção por DENV (72). Já no estudo de Lanciotti et al. (74), o qual envolveu amostras de pacientes do surto de ZIKV de Yap, os testes de neutralização também não demonstraram reações-cruzadas significativas entre ZIKV e outros flavivírus quando aplicados às amostras dos pacientes com critérios de infecção primária por ZIKV. O mesmo não ocorreu com as amostras dos pacientes com critérios de infecção provável por ZIKV/secundária (primoinfecção por outros flavivírus), nas quais houve variados graus de neutralização cruzada para os demais flavivírus –

DENV (1-4), vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus da encefalite de Murray Valley (MVE) e vírus do Oeste do Nilo (WNV). Neste caso, os títulos elevados de anticorpos neutralizantes contra outros flavivírus, subsequentes a uma infecção aguda provável por ZIKV, seriam reflexo do "pecado original antigênico".

Uma vez que a neutralização cruzada entre DENV e ZIKV aconteça em grau significativo *in vivo*, seu possível corolário seria a ocorrência de proteção-cruzada. De forma colateral, a mesma poderia limitar a especificidade de testes de neutralização viral, preconizados como padrão-ouro em certos algoritmos diagnósticos, após a fase virêmica. Em compensação, a elevação de "end-points" e pontos de cortes dos títulos de anticorpos poderia possivelmente contornar o problema. Além disso, um estudo de Collins et al. (2017) sugere que o fenômeno seja negligenciável após seis meses da infecção, ao demonstrar mínima neutralização-cruzada em amostras de indivíduos com critérios soropidemiológicos de exposições prévias a ZIKV e/ou DENV, analogamente ao que acontece entre os sorotipos de DENV (79). Isto reforça o valor dos testes de neutralização para inquéritos sorológicos, ensaios clínicos de vacinas e diagnóstico tardio de zika em gestantes.

Em suma, o conhecimento aprofundado dos anticorpos/epítomos envolvidos nos fenômenos de reação-cruzada, neutralização/proteção e ADE pavimentam o caminho para o desenvolvimento de testes sorológicos mais específicos, bem como de vacinas e possíveis imunoterapias (55, 80). A busca pelo aprimoramento dos métodos diagnósticos tem se baseado na existência de anticorpos mais específicos contra alvos antigênicos, presentes na proteína NS1 e em regiões da glicoproteína E. Atualmente, novos testes "in-house" e comerciais de ELISA para ZIKV vêm sendo desenvolvidos, apresentando diferentes graus de especificidade, alguns mais promissores que outros (81-86).

1.4.2 Chikungunya

A maior parte dos estudos de soroprevalência de chikungunya também têm utilizado ELISA e, em menor proporção, imunofluorescência indireta (IFI) (Quadros 1 e 2). Os ensaios imunoenzimáticos costumam utilizar antígenos inativados nativos de CHIKV ou variadas proteínas estruturais recombinantes do vírus, incluindo a proteína do capsídeo (C), E1 e E2 (87). Alguns testes comerciais disponíveis de IFI e ELISA apresentam altas sensibilidade e especificidade (88, 89), porém a

ocorrência de falso-negativos e falso-positivos não é negligenciável (90). Deve ser levada em conta a possibilidade de reações-cruzadas com outros alfavírus em zonas de cocirculação (66).

1.4.3 Descrição dos principais métodos

O ELISA, método mais empregado nos inquéritos sorológicos, possui diferentes variações técnicas, com destaque aqui para o ELISA indireta e o ELISA de captura. No primeiro ("antigen-coated indirect ELISA"), as microplacas são primariamente revestidas por antígenos virais, os quais se ligam às imunoglobulinas específicas (IgM ou IgG), caso presentes no soro; após lavagem, os anticorpos ligados serão então detectados por outros anticorpos adicionados e conjugados a enzimas, as quais permitirão a reação colorimétrica clássica sobre um substrato, medida por espectrometria. Já no ELISA de captura ("envelope/membrane or E/M-specific capture ELISA"), as microplacas são revestidas por anticorpos anti-imunoglobulina humana, os quais capturam inicialmente imunoglobulinas inespecíficas (IgM ou IgG) do soro do paciente; em seguida, antígenos do vírus de interesse são acrescidos e se ligam às imunoglobulinas específicas (IgM ou IgG), caso presentes no soro; após lavagem, os antígenos ligados serão, então, detectados por anticorpos do conjugado enzimático adicionado, repetindo os passos finais comuns a todas as variedades de ELISA. É denominado MAC-ELISA, quando empregado para IgM, e GAC-ELISA, quando para IgG (1).

O teste de neutralização por redução de placas (PRNT) baseia-se na identificação e quantificação indireta de anticorpos neutralizantes contra determinado vírus. Foi primeiramente descrito na década de 1950 (91), sofrendo aprimoramentos posteriores com a adaptação para DENV (92, 93). A amostra de soro a ser testada é sequencialmente diluída e misturada a uma suspensão viral em um tubo ou placa de microtitulação, permitindo a interação *in vitro* entre anticorpos e vírus, sendo posteriormente vertida sobre uma monocamada de células suscetíveis. Esta camada é recoberta por um meio semissólido o qual impede o espalhamento indiscriminado de vírus. Ao infectar a monocamada celular, cada vírus se replica, produzindo placas de lise, as quais podem ser detectadas de diferentes formas, tais como, observação microscópica, anticorpos fluorescentes ou corantes específicos. Após usuais 7 dias de incubação, as placas são então contadas, comparando-se as amostras testadas com a solução de vírus inicial, isto é, livre de anticorpos. Caso haja anticorpos neutralizantes no soro testado, ocorrerá conseqüente redução da

quantidade de placas esperadas. Determina-se, assim, a porcentagem desta redução, definindo-se um "endpoint" (e.g., 50%, expresso como PRNT₅₀). "Endpoints" mais elevados aumentam a especificidade, por outro lado, podem reduzir a sensibilidade do teste. Os títulos do PRNT são expressos de acordo com a última diluição do soro que atingiu a porcentagem desejada de redução na contagem de placas. No caso particular da dengue, o teste é capaz de diferenciar anticorpos sorotipo-específicos, ao contrário do ELISA e do IH. Além disso, por se correlacionar bem com proteção, tem sido empregado em estudos de desenvolvimento de vacinas, o que motivou esforços da Organização Mundial de Saúde para padronizá-lo (94, 95).

Embora o PRNT seja considerado padrão-ouro na detecção de anticorpos neutralizantes, existe uma variante do método chamada FRNT (do inglês, "Focus Reduction Neutralization Test"), a qual oferece algumas vantagens. Ao contrário daquele, este é realizado em microplacas de 96 poços, o que reduz a área de tecido celular e o volume de reagentes utilizados, além de possibilitar o uso de pipetas multicanais e automação. Isto aumenta a reprodutibilidade intra- e interensaio, bem como, permite testar número maior de amostras em cada ensaio. Ademais, utilizando a técnica imunocolorimétrica - baseada no emprego de anticorpos capazes de se ligar ao vírus infectante - possibilita a revelação dos "focos" de inoculação e replicação viral em 2 dias, sendo portanto de execução mais rápida que o PRNT (96).

1.5 Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya em gestantes no mundo

O Quadro 1 exibe um levantamento de estudos de soroprevalência realizados em gestantes pelo mundo a partir da década de 2000 para dengue, zika e chikungunya. Todos os estudos foram realizados em países em desenvolvimento, demonstrando resultados bastante variados para dengue (10,8 a 97,2%) e para chikungunya (18,2 a 71,2%) (58, 97-107). Até o momento, o único estudo que avaliou soroprevalência em gestantes para zika foi realizado no Brasil (104), tendo como base um caso-controle de parturientes cujos recém-natos apresentaram microcefalia (n=19) e parturientes cujos recém-natos não apresentavam microcefalia (n=257). A detecção de IgG anti-ZIKV (através de um teste ELISA baseado em NS1) no primeiro grupo foi de 94,7% (IC 95%, 73,5 a 99,9%), enquanto que no segundo foi de 69,3% (IC 95%: 63.3 a 74.5%). Um subgrupo de amostras entre os casos (n=15) e os controles (n=171) foi analisado utilizando-se PRNT, com achados de 93,3% e 66,6%, respectivamente.

Quadro 1. Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya em gestantes, no mundo, a partir da década de 2000.

Autores	Localidade	Período do estudo	Nº de gestantes	Técnica	Soroprevalência
DENGUE					
Perret, et al., 2005 (97)	Tailândia	2000	245	IH	94,7%
Collenberg et al., 2006 (98)	Burkina Faso	2003-2004	492	ELISA/dot blot	36,5%
Schwarz et al., 2012 (99)	Madagascar	2010	Duas localidades: 195 e 251	IFI	17,4% e 10,8%
Mohamed Ismail <i>et al.</i> , 2014 (107)	Malásia	não informado	358	ELISA	35,8%
Wood et al., 2014 (100)	Caribe (10 países)	2009-2011	442	ELISA	83,0%
Khamim et al., 2015 (101)	Tailândia	2000-2001	141	PRNT	97,2%
Laoprasopwattana et al., 2016 (102)	Tailândia	2009-2010	319	ELISA	90,3%
Yen et al., 2016 (103)	São Tomé e Príncipe	2003-2004	78	IFI/ELISA	35,9%
ZIKA					
Netto et al., 2017 (104)	Salvador, Brasil	2015-2016	Caso-controle: 19 parturientes (RN com microcefalia) 257 parturientes (RN sem microcefalia)	ELISA/PRNT	94,7% e 69,3%, respectivamente
CHIKUNGUNYA					
Gérardin et al., 2008 (58)	Ilhas Reunião	2006	888	ELISA	18,2%
Sissoko et al., 2008 (105)	Ilha Mayotte	2006	629	ELISA	26% (IgM+)
Schwarz et al., 2012 (99)	Madagascar	2010	Duas localidades: 195 e 251	IFI	44,6% e 22,7%
Bacci et al., 2015 (106)	Benin	2006/2007	352	ELISA/IFI/PRNT	36,1%
Laoprasopwattana et al., 2016 (102)	Tailândia	2009-2010	319	IFI	71,2%

ELISA: ensaio imunoenzimático; IFI: imunofluorescência indireta; IH: Teste de inibição da hemaglutinação; PRNT: Teste de neutralização por redução de placas; RN: recém-nascido. Fonte: o autor.

1.6 Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya, de base-populacional e em populações específicas, no Brasil

O Quadro 2 demonstra um levantamento das soroprevalências para dengue, zika e chikungunya realizados em cidades de grande, médio e pequeno portes do Brasil (104, 108-123). Como esperado, a larga maioria dos inquéritos populacionais referem-se a dengue. Outros estudos utilizaram amostras de conveniência de populações-específicas (e.g. crianças de escolas públicas). Nota-se uma marcante variação dos achados, entre localidades e ao longo do tempo (4,0 a 90,1%). Inquéritos soroepidemiológicos avaliaram também fatores sociodemográficos, frequência vetorial e análises espaciais, correlacionando-os à complexa dinâmica epidemiológica que envolve esta arbovirose (119-121).

Em contraste, estudos de soroprevalência de zika e chikungunya ainda são escassos, tendo em conta a introdução mais recente destes arbovírus no país. Um estudo realizado em Salvador, Bahia, por Netto e colaboradores (104) incluiu, além de parturientes, outras populações específicas, como pacientes HIV, pacientes com tuberculose e funcionários de uma universidade, cujas amostras foram colhidas entre 2013 e 2016. Dentre os achados principais, estavam soroprevalências de 63,3%, 75,7% e 7,4%, para zika, dengue e chikungunya, respectivamente.

Quadro 2. Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya no Brasil.

Autores	Localidade	Tipo de amostra	Período do estudo	Nº de participantes	Técnica	Soroprevalência
DENGUE						
Figueiredo et al., 1990 (100)	Rio de Janeiro (RJ)	crianças de escolas públicas	1986-87	402 (1986) e 384 (1987)	IH	24,9% (1986) e 44,5% (1987)
Figueiredo et al., 1995 (101)	Ribeirão Preto (SP)	base populacional	1992	662	EIA-ICC	5,4%
Da Cunha et al., 1995 (102)	Niterói (RJ)	crianças de escolas públicas	1991-2	450	IH	66%
Da Cunha et al., 1997 (103)	Paracambi (RJ)	crianças de escolas públicas	1994	370	IH	39,2%
Vasconcelos et al., 1998 (104)	Fortaleza (CE)	base populacional	1994	1.341	IH	4,0%
Vasconcelos et al., 1999 (105)	São Luís, Paço do Lumiar e São José de Ribamar (MA)	base populacional	1996	1.017, 101 e 100	IH	41,4%, 55,4% e 58%
Vasconcelos et al., 2000 (106)	Ipupiara e Prado (BA)	base populacional	1995	461 e 228	IH	11,9% e 17,5%
Teixeira Mda et al., 2002 (107)	Salvador (BA)	base populacional	1998	1.515	IH	68,7%
Siqueira et al., 2004 (108)	Goiânia (GO)	base populacional	2001-2002	1.585 (2001) e 2.906 (2002)	ELISA	29,5% e 37,3%
Lima <i>et. al.</i> , 2007 (109)	Campinas (SP)	base populacional	1998	1.260	EIA-ICC	14,7%
Silva-Nunes et al., 2008 (110)	Assentamento Pedro Peixoto (AC)	base populacional	2004	405	ELISA/P RNT	18,3%

Quadro 2. Estudos de soroprevalência para dengue, zika e chikungunya no Brasil. (continuação)

Honório et al., 2009 (111)	Rio de Janeiro (RJ), 3 bairros	base populacional	2007-2008	326 (2007) e 258 (2008)	ELISA	60,26%, 56,07% e 77,44%
Braga et al., 2010 (112)	Recife (PE), 3 bairros	base populacional	2005-2006	2.833	ELISA	91,1%, 87,4% e 74,3%
Pessanha et al., 2010 (113)	Belo Horizonte (MG), em três bairros	base populacional	2006-2007	709	PRNT	11,9%
Teixeira et al., 2012 (114)	Salvador (BA)	base populacional: crianças 0-3 anos	1998 e 2000	625 (1998) e 289 (2000)	ELISA/IH	26,6% e 33,2%
Netto et al., 2017 (96)	Salvador (BA)	diferentes populações-específicas (*)	2013-2016	206	ELISA	75,7%
ZIKA						
Netto et al., 2017 (96)	Salvador (BA)	diferentes populações-específicas (*)	2013-2016	633	ELISA/P RNT	63,3%
CHIKUNGUNYA						
Cunha et al., 2017 (115)	Riachão do Jacuípe (BA)	base populacional	2016	120	ELISA	20%
Netto et al., 2017 (96)	Salvador (BA)	diferentes populações-específicas (*)	2013-2016	633	ELISA	7,4%

ELISA: ensaio imunoenzimático; IFI: imunofluorescência indireta; IH: Teste de inibição da hemaglutinação; PRNT: Teste de neutralização por redução de placas; EIA-ICC: Teste imunoenzimático em culturas celulares infectadas (*): gestantes, pacientes HIV+, pacientes com TB e trabalhadores de uma universidade. Fonte: o autor.

1.7 Justificativa

Afora os registros de vigilância epidemiológica, com suas conhecidas limitações (subnotificações, casos assintomáticos, acurácia limitada dos critérios clínico-epidemiológicos), há uma escassez de dados que reflitam a real magnitude das epidemias recentes causadas por ZIKV e CHIKV no Brasil. Estudos de soroprevalência constituem ferramentas valiosas ao permitirem estimar a frequência de infecções prévias em determinada população (ou estrato populacional específico), bem como a momentânea relação de indivíduos imunes/suscetíveis. Isto contribui para melhor compreensão da dinâmica das epidemias, auxiliando projeções futuras e o planejamento de respostas adequadas.

Inquéritos sorológicos pontuais demonstraram variadas proporções de sororreatividade para dengue nas populações de diferentes regiões metropolitanas brasileiras e em diferentes períodos. Em contraste, há uma quase absoluta escassez de estudos de soroprevalência de zika e chikungunya no Brasil, cujas epidemias têm marcos temporais mais recentes. Pelas razões explicitadas, consideramos relevante a realização de estudos deste tipo em regiões metropolitanas com registros históricos de cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV, como a Baixada Fluminense, da qual Nova Iguaçu é uma destacada representante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar a prevalência sorológica de infecção prévia por dengue, zika e chikungunya vírus numa população de gestantes atendidas em uma maternidade de Nova Iguaçu.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características demográficas e obstétricas da amostra de gestantes recrutadas.
- Avaliar as prevalências sorológicas segundo os locais de residência das participantes (municípios e bairros).
- Avaliar a associação entre as soropositividades para as arboviroses na amostra de gestantes.
- Estimar a validade da informação oral acerca de infecção arboviral prévia, tendo como padrão-ouro a sorologia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal.

3.2 Localidade e Instituições

O município de Nova Iguaçu (Figura 1) localiza-se na Baixada Fluminense, no estado do Rio de Janeiro. Pertence à região metropolitana do Rio de Janeiro, situando-se a noroeste da capital. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017, possuía uma população estimada de 798.647 habitantes. No último censo brasileiro, realizado em 2010, havia 83.1% de domicílios com esgotamento sanitário adequado e 53.3% de domicílios urbanos em vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio). O índice de desenvolvimento humano (IDH) era de 0,713, enquanto que a média no Brasil era de 0,699, e no mundo de 0,624 (124).

A Maternidade Mariana Bulhões é a única maternidade pública do município de Nova Iguaçu, atendendo também populações de outros municípios próximos. Realiza 5.000 partos/ano, incluindo de alto risco.

O Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI/MS), instituição de apoio ao presente estudo, é um hospital geral do Ministério da Saúde e conta com 350 leitos. Está localizado próximo à periferia do Rio de Janeiro e serve a uma grande população da Baixada Fluminense, onde é o único hospital público. Nesta unidade funciona um centro de pesquisa clínica associado ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/FIOCRUZ. Os departamentos de Pediatria, Obstetrícia/Ginecologia e Doenças Infecciosas contam com uma equipe treinada, voltada exclusivamente para a assistência integral a gestantes e seus bebês. O serviço conta com uma equipe multiprofissional específica para o atendimento e acompanhamento da gestante portadora de infecção pelo HIV-1. Há 16 anos, o centro de pesquisa participa de ensaios clínicos terapêuticos e em prevenção para a rede IMPAACT/NICHHD do National Institutes of Health (NIH).

O Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (LABAIDS - Fiocruz) foi credenciado em 1991 e, desde então, tem como missão a realização de atividades

de pesquisa, ensino, desenvolvimento tecnológico, inovação, ensaios clínicos e atividades de referência, nos diferentes aspectos da infecção pelo HIV, visando à promoção da saúde. Nosso grupo atua em estreita colaboração com grupos de pesquisa clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ) e do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), de epidemiologia do ICICT/FIOCRUZ, do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (NIH), da Agência Nacional Francesa de Pesquisa em HIV/aids e Hepatite B & C (ANRS), do Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos da América (CDC), dentre outros grupos no país e no exterior. Desde o seu credenciamento, o LABAIDS colabora com o Departamento Nacional de DST, Aids e Hepatites Virais em suas ações de pesquisa e referência em saúde e desde 2011 é laboratório de referência da Organização Mundial da Saúde para vigilância da resistência transmitida do HIV-1 aos antirretrovirais (HIVResNet).

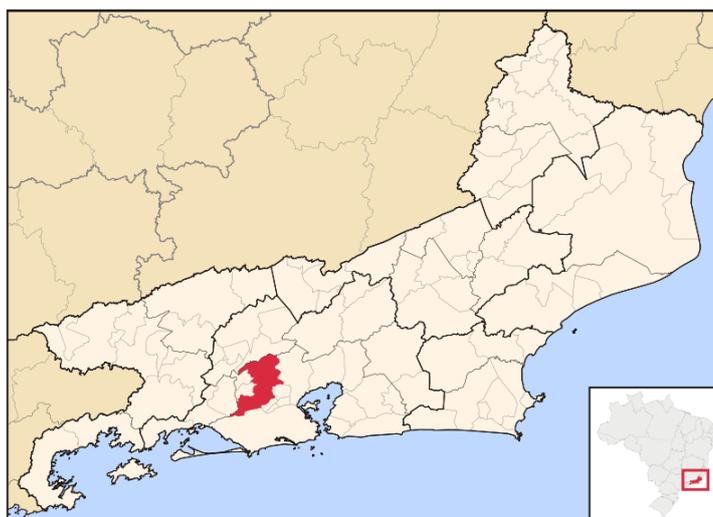


Figura 1. Localização do município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. Autor: Raphael Lorenzeto de Abreu

3.3 População do estudo e seleção dos participantes

A população de estudo compreendeu gestantes atendidas na emergência de uma maternidade pública do município de Nova Iguaçu. Determinou-se como critérios de inclusão aquelas com idade igual ou superior a 18 anos, as quais se apresentavam ao setor de triagem da Maternidade Mariana Bulhões e, após passarem por avaliação médica, eram admitidas na sala de medicação e pré-parto, por qualquer motivo admissional. Foram considerados critérios de exclusão a recusa em assinar o termo de consentimento e a presença de sinais de intoxicação (*i.e.*,

uso de substâncias entorpecentes). O convite para participação no estudo ocorria nos turnos da manhã e da tarde, de segunda a sexta-feira.

O recrutamento das gestantes se deu no período compreendido entre março e agosto de 2017 (seis meses).

3.4 Plano amostral

O cálculo do número de participantes recrutados em 6 meses, tendo em conta o universo amostral (N) de 5.000 partos anuais médios (2.500 partos por 6 meses) e prevalências desconhecidas dos agravos, foi de 334 gestantes (n=334).

3.5 Fluxo, coleta de dados e de espécimes clínicos

Após aplicação do termo de consentimento, a recrutadora treinada do estudo realizava a coleta de dados sumários da gestante, através de ficha padronizada (nome; data de nascimento; cidade e bairro de residência; se realiza acompanhamento pré-natal, com base em relato e/ou presença de cartão pré-natal; idade gestacional; se relata diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya; história de vacinação para febre amarela), a qual se encontra na seção de Anexos. Em seguida, era realizada a coleta de 10 ml de sangue. O resultado dos testes-rápidos de HIV e sífilis eram prontamente liberados, conforme previsto na rotina adotada no serviço.

O quadro clínico suspeito de infecção aguda por arbovírus foi definido como gestantes que apresentassem exantema máculo-papular ou febre, acompanhado de dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: hiperemia conjuntival sem secreção/prurido ou poliartralgia ou edema periarticular ou prurido. Em caso de quadro clínico suspeito de zika ou possível infecção aguda assintomática (*i.e.*, IgM positivo), a gestante/parturiente/puérpera e a criança exposta seriam encaminhadas para avaliação por infectologista, obstetra e pediatra do HGNI. Gestantes com teste-rápido positivo para sífilis e/ou HIV, e suas respectivas crianças, eram conduzidas por obstetras e pediatras da unidade, conforme protocolo clínico do Ministério da Saúde.

3.6 Avaliações e técnicas laboratoriais

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados nas amostras de sangue das gestantes: teste-rápido para HIV, teste-rápido para sífilis, sorologia para DENV, sorologia para ZIKV e sorologia para CHIKV.

3.6.1 Diagnóstico de Dengue, Zika e Chikungunya

Todas as amostras foram submetidas à técnica de ELISA, através de testes comerciais autorizados para uso no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), visando à detecção de anticorpos das classes IgM e IgG contra DENV, ZIKV e CHIKV, bem como, antígenos NS1 de DENV.

A seguir, são listados os testes comerciais utilizados no presente estudo:

- Anti-DENV IgM (Serion Elisa Classic - Virion\Serion, Germany)
Para detecção de anticorpos da classe IgM contra DENV. Baseia-se em técnica de ELISA indireta, cujas microplacas são revestidas por lisado viral inativado. Baseado em três estudos descritos pela bula, o fabricante reportou uma sensibilidade de 99-100% e uma especificidade de 92,7-100% (125).
- Anti-DENV IgG (Euroimmun, Germany)
Para detecção de anticorpos da classe IgG contra DENV. Baseia-se em técnica de ELISA indireta, cujas microplacas são revestidas por uma mistura de antígenos virais purificados. Baseado em dois estudos descritos pela bula, o fabricante reportou sensibilidade e especificidade de 100% (126).
- Antígeno NS1 de DENV (Panbio Dengue Early ELISA, South Korea)
Para detecção de antígeno NS1 de DENV. Baseia-se em técnica de ELISA sanduíche, cujas microplacas são revestidas por anticorpos anti-NS1, associando o uso sequencial de anticorpo monoclonal (mAb) Anti-NS1 conjugado. Segundo o fabricante, sua sensibilidade variou de 76% a 77,7% e sua especificidade de 93,6% a 98,4%, em dois estudos (127).
- Anti-ZIKV IgM capture (Novagnost, Germany)
Para detecção de anticorpos da classe IgM contra ZIKV. Baseia-se em técnica de ELISA de captura, cujas microplacas são revestidas por anticorpos anti-IgM humano, associando o uso sequencial de uma mistura de antígenos de ZIKV conjugados. Segundo a bula do fabricante, sua sensibilidade é de 100% e especificidade de 98,5% (128).

- Anti-ZIKV ELISA IgG (Euroimmun, Germany)

Para detecção de anticorpos da classe IgG contra ZIKV. Baseia-se em técnica de ELISA indireta, cujas microplacas são revestidas por proteína não-estruturais (NS1) recombinantes. A sensibilidade do teste reportada pela bula é de 76%, aumentando para 97% quando combinado a IgM. A especificidade seria de 100% (129).

- Anti-CHIKV ELISA IgM e Anti-CHIKV ELISA IgG (Euroimmun, Germany)

Para detecção de anticorpos das classes IgM e IgG contra CHIKV. Baseiam-se em técnica de ELISA indireta, cujas microplacas são revestidas por uma mistura de proteínas estruturais recombinantes do vírus. De acordo com a bula, no que se refere a IgM, a sensibilidade variou de 99,7% a 100% e a especificidade de 99% a 100%, baseado em três estudos (130). Já para IgG a sensibilidade e especificidade foram de 100%, baseado em um estudo (131).

3.6.2 Diagnóstico de HIV e Sífilis

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 seguiu o fluxograma estabelecido pelo Ministério da Saúde, tendo se baseado na pesquisa de anticorpos anti-HIV-1 no sangue através de teste-rápido (Alere Determine™ HIV-1/2, USA). Nos casos positivos, a confirmação foi realizada por teste-rápido de segunda marca (Teste Rápido HIV-1/2 - Bio-Manguinhos, Brasil). Por sua vez, o diagnóstico de sífilis baseou-se na realização de teste rápido treponêmico (Determine™ Syphilis, USA).

3.7 Variáveis do estudo

Dispondo como fonte os dados preenchidos pela recrutadora na ficha padronizada, o presente estudo estabeleceu as seguintes variáveis demográficas, obstétricas e anamnéticas: idade; idade gestacional à admissão; cidade e bairro de residência; se realiza acompanhamento pré-natal (sim/não); relato de diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya (sim/não); relato de vacinação para febre amarela (sim/não).

No que se refere à avaliações sorológicas, foram definidos como resultado (i) "positivo" aqueles definidos como positivo e (ii) "negativo" aqueles definidos como negativo e "borderline", segundo os limites de absorbância e cálculos especificados pela bula de cada teste comercial (ELISA). "Positividade combinada", ou "sorologia positiva", foi definida como ELISA IgG e/ou IgM positivos para o vírus de interesse.

3.8 Aspectos éticos

As mulheres convidadas a participar do estudo receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) com informações gerais sobre os objetivos e os procedimentos do estudo (ver Anexos).

Os pesquisadores envolvidos no projeto pautaram-se pelos Termos das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Foram levadas em consideração as normas para uso de amostras estocadas de acordo com a Resolução CNS No 411, de 2011, a qual regula o uso de amostras estocadas e uso de biorrepositório. O presente trabalho teve sua realização respaldada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), sob o parecer de número CAAE: 56852416.0.0000.5254.

3.9 Análise estatística

As proporções de soropositivos foram descritas em forma de percentuais. O teste qui-quadrado foi empregado para a análise cruzada de variáveis categóricas. Resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o p-valor foi inferior a 0,05. O intervalo de confiança usado foi de 95%. Para a análise estatística, utilizamos o programa R 3.3.2.

4 RESULTADOS

De março a agosto de 2017, foi recrutado um total de 349 gestantes. A média de idade foi de 26,9 anos, com mediana de 26 anos. A média de idade gestacional (em semanas) foi de 38,8 e mediana de 39. A seguir, encontram-se os gráficos com dados demográficos e relativos à gestação (Tabela 1).

A análise da amostra recrutada revela que a Maternidade Mariana Bulhões atende a gestantes de diferentes partes do município de Nova Iguaçu, com destaque para as regiões mais populosas e centrais. Além disso, cerca de 36% das gestantes arroladas provêm de municípios vizinhos, o que reflete a importância de Nova Iguaçu na oferta de serviços e equipamentos de saúde para a população da Baixada Fluminense (Figura 2 e Quadro 1).

A maior parte das gestantes admitidas encontrava-se em idade gestacional avançada e em trabalho de parto (81%). Não houve gestantes apresentando quadro clínico agudo suspeito de arbovirose, refletindo a redução das incidências das três doenças no primeiro semestre do ano de 2017. Perguntadas se já tiveram diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya, as participantes deram respostas afirmativas em, respectivamente, 6%, 12% e 9% dos casos. Por sua vez, a pergunta acerca de vacinação prévia para febre amarela só foi incluída no questionário quando o recrutamento já estava em andamento; sendo assim, das 349 gestantes, 168 foram inqueridas e somente uma gestante respondeu afirmativamente.

Tabela 1. Dados demográficos e obstétricos relativos às gestantes recrutadas em maternidade pública de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, de março a agosto de 2017 (n=349)

Variáveis	Categorias	n (%)
Idade das participantes	18-24 anos	141 (40,4)
	25-29 anos	100 (28,7)
	29-47 anos	108 (30,9)
Município de residência	Nova Iguaçu	222 (64)
	Belford Roxo	36 (10)
	Mesquita	12 (3)
	Queimados	38 (11)
	Japeri	17 (5)
	Outros municípios	19 (6)
	Dados ausentes	5 (1)
Trimestre da gestação	Primeiro trimestre	2 (<1)
	Segundo trimestre	2 (<1)
	Terceiro trimestre	332 (95)
	Indeterminada/sem dados	13 (4)
Pré-natal	Sim	310 (89)
	Não	12 (3)
	Ausência de dados	27 (8)
Motivo da admissão	Trabalho de parto	282 (81)
	Suspeita de arboviroses	0 (0)
	Outros motivos	58 (17)
	Dados ausentes	9 (2)



Fig. 2a - Município de Nova Iguaçu (RJ) e arredores.

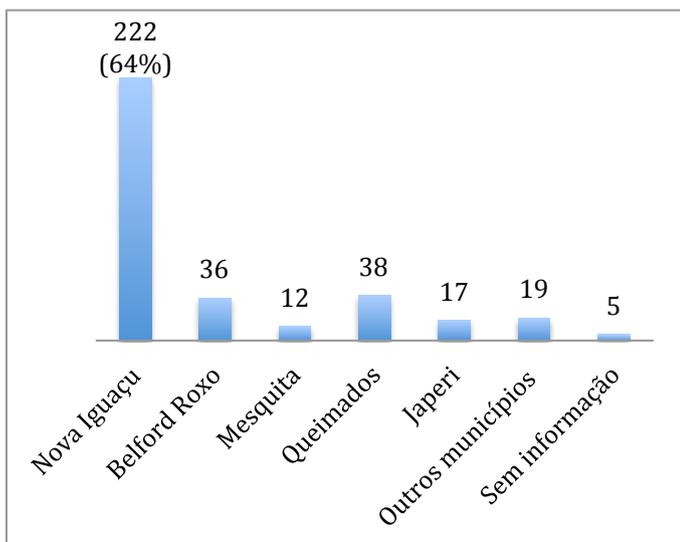
Fonte: <https://pt.map-of-rio-de-janeiro.com>



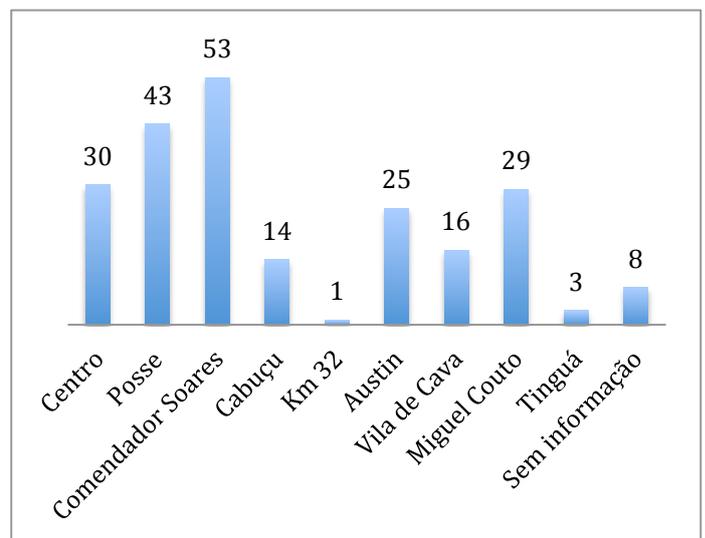
Fig. 2b - Regiões administrativas do município de Nova Iguaçu (RJ)

Fonte: Prefeitura de Nova Iguaçu

Figura 2. Mapas do município de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.



3a. Distribuição de gestantes por municípios de origem (n=349)



3b. Distribuição de gestantes moradoras de Nova Iguaçu por bairros de origem (zonas administrativas) (n=222)

Figura 3. Locais de moradia das gestantes recrutadas em maternidade pública de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, de março a agosto de 2017

Das 349 amostras submetidas aos diferentes testes comerciais de ELISA, 308 apresentaram IgG DENV positivo e 32 IgM DENV positivo. A positividade combinada (IgG e/ou IgM positivos) para DENV totalizou 310, o que corresponde a 88,8% (IC 95%: 85,5 a 92,1) das amostras. Todas as amostras foram negativas para o antígeno NS1 de DENV. Para ZIKV, houve 163 espécimes IgG positivos e 6 IgM positivos, com positividade combinada de 165/349, perfazendo 47,2% (IC 95%: 42,0 a 52,5) das amostras. Já em relação ao CHIKV, 99 das amostras apresentaram IgG positivo e nenhuma apresentou IgM positivo. Com isso, houve positividade de 28,3% (IC 95%: 23,6 a 33,1) das amostras para CHIKV (Tabela 2 e 3).

Na presunção de que positividade dupla para DENV e ZIKV poderia representar tanto infecção prévia por ambos os vírus quanto reação-cruzada (*i.e.*, falso-positivo para um ou para outro), foi realizado um cruzamento dos resultados. Observou-se dupla positividade em 163 amostras, o que corresponde a 52,6% das 310 positivas para DENV e 98,7% das 165 positivas para ZIKV.

Tabela 2. Resultado dos testes de ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017

Sorologia	Teste comercial	Positivo n (%)	"Borderline" n (%)	Negativo n (%)
DENV IgM	Virion\Serion	32 (9,2)	39 (11,1)	278 (79,7)
DENV IgG	Euroimmun	308 (88,3)	4 (1,1)	37 (10,6)
NS1 DENV	Panbio	0 (0,0)	-	349 (100,0)
ZIKV IgM	Novagnost	6 (1,7)	8 (2,3)	335 (96,0)
ZIKV IgG	Euroimmun	163 (46,7)	39 (11,2)	147 (42,1)
CHIKV IgM	Euroimmun	0 (0,0)	3 (0,9)	346 (99,1)
CHIKV IgG	Euroimmun	99 (28,4)	4 (1,1)	246 (70,5)

Legenda: DENV - dengue vírus; ZIKV- zika vírus; CHIKV - chikungunya vírus

Tabela 3. Total de amostras com positividade combinada (IgG e/ou IgM positivos) em ELISA para DENV, ZIKV e CHIKV, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017

	Positividade combinada n (%)	IC (95%)
DENV ELISA	310/349 (88,8)	85,5% - 92,1%
ZIKV ELISA	165/349 (47,2)	42,0% - 52,5%
CHIKV ELISA	99/349 (28,4)	23,6% - 33,1%

Legenda: DENV - dengue vírus; ZIKV- zika vírus; CHIKV - chikungunya vírus

A Tabela 4, a seguir, exhibe os resultados dos testes-rápidos para HIV e sífilis, com destaque para a alta soroprevalência de sífilis (8,9%).

Tabela 4. Testes-rápidos para HIV e Sífilis, entre 349 gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017

	Positivo	Negativo	Sem dado
Teste-rápido HIV	2 (0,6%)	333	14
Teste-rápido	31	304	14
Sífilis	(8,9%)		

Após testarmos a hipótese de um aumento progressivo de sorologia positiva para DENV de acordo com a idade das participantes – refletindo maior tempo de exposição durante a vida aos ciclos epidêmicos –, não encontramos dados que a corroborassem em nossa amostra. Isto, provavelmente, se deve à estreita faixa de idade das participantes.

Quando analisada a soropositividade de acordo com os municípios de origem, houve uma tendência de aumento geral do risco estimado em relação às gestantes que moravam em Nova Iguaçu vs. gestantes que moravam em municípios adjacentes. Contudo, somente para zika houve significância estatística (OR: 1,74; IC 95%: 1,22 a 2,73). Já no subgrupo de gestantes residentes em Nova Iguaçu, uma análise comparativa entre as regiões administrativas de origem não redundou em diferenças de chances com significância estatística para nenhuma das três arboviroses. Alternativamente, a ideia de agrupar as regiões administrativas em categorias socioeconômicas bem definidas seria pouco adequada, visto que elas englobam, cada qual, diversos bairros com condições geográficas bastante variadas entre si.

Ao compararmos os resultados das sorologias na amostra, observamos uma razão de chances de 3,69 (IC 95%: 2,24 a 6,07) entre as positivities para ZIKV e CHIKV, com significância estatística. Tal achado pode ser traduzido desta forma: indivíduos com sorologia positiva para ZIKV tiveram uma chance de 3,69 de ter sorologia positiva para CHIKV, e vice-versa. O mesmo ocorreu, em menor medida, entre DENV e CHIKV (OR 2,95; IC 95%: 1,12 a 7,80). Embora também associadas, as positivities para DENV e ZIKV podem representar mera reatividade-cruzada, limitando sua interpretação, razão pela qual não estão aqui apresentadas.

A acurácia da informação oral acerca de diagnóstico anterior foi avaliada através de indicadores de validade, tendo como padrão-ouro suas respectivas

soroprevalências (Tabela 5). As especificidades dos relatos foram relativamente altas para o relato de dengue, zika e chikungunya prévias (97,4%, 93,9% e 96,7%, respectivamente), em contraste com as baixas sensibilidades.

Tabela 5. Indicadores de validade para informação oral referente a diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya, tendo como padrão-ouro soroprevalência, em gestantes de uma maternidade pública de Nova Iguaçu (RJ), de março a agosto de 2017 (n = 349).

	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Relato de dengue	0,06	97,4	95,0	0,11
Relato de zika	20,1	93,9	75,0	56,7
Relato de chikungunya	24,7	96,7	75,0	76,7

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

Até o momento de submissão desta dissertação, quatro das seis participantes com IgM positivo para ZIKV haviam sido localizadas, visando ao acompanhamento de suas respectivas crianças. Das crianças avaliadas pela pediatra (anamnese, exame físico e marcos do desenvolvimento), somente uma, já com um ano de idade, apresentava leve atraso de desenvolvimento. Para todas elas, foram solicitados exames complementares - seguindo o Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central do MS (132) - tais como tomografia computadorizada de crânio, fundo de olho, exame auditivo e sorologia para ZIKV, ainda com resultados pendentes. O serviço de pediatria do centro de pesquisa do HGNI irá acompanhá-las até os dois anos de idade. Das duas participantes restantes, uma foi localizada, porém, até o momento, mostra-se reticente em comparecer à unidade; a outra ainda não foi localizada (endereço e número de telefone não correspondentes).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou valores marcantes de prevalência sorológica para as três arboviroses de interesse na amostra de gestantes testadas, refletindo o contexto epidemiológico no qual estão inseridas.

Em relação à dengue, encontramos uma soroprevalência que rivaliza com os achados mais expressivos de outros inquéritos sorológicos, tanto envolvendo gestantes mundo afora, quanto naqueles de base-populacional realizados no Brasil (Quadros 1 e 2). Uma vez que não tivemos a capacidade de realizar ensaios de neutralização para DENV, há maior possibilidade de terem ocorrido falso-positivos por reações-cruzadas (*i.e.*, eventuais gestantes previamente infectadas por ZIKV e DENV-não-imunes). Com isso, a taxa de 88,8% poderia estar superestimada. Salienta-se que o fabricante do teste de IgG ELISA (Euroimmun) não revela os antígenos de DENV nele empregados. Embora a bula (133) descreva sensibilidade e especificidade de 100% em estudos iniciais, a mesma também reporta reações-cruzadas com outros flavivírus (vírus do Oeste do Nilo e vírus da febre do carrapato). Felix et al. (2017) já descreveram reações-cruzadas deste teste em soros de pacientes com infecção recente por ZIKV (75). Se, oportunamente, excluirmos as amostras positivas para ZIKV na amostra de nosso estudo, temos uma soroprevalência para dengue ainda alta, correspondendo a 79,9%.

Da mesma forma, os resultados sorológicos para zika merecem cuidadosa interpretação, em face das possíveis reações-cruzadas. Aqui, cabe uma breve revisão dos dados publicados envolvendo os testes comerciais para ZIKV empregados. Para o teste de IgM de captura/MAC-ELISA (Novagnost, Siemens), a composição dos antígenos utilizados pelo fabricante não é revelada. Segundo descrito em sua bula (128), a especificidade do teste é de 98,5% e sensibilidade de 100%. O Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dos Estados Unidos, emprega outro ELISA por captura para IgM (MAC-ELISA), no diagnóstico de infecção aguda. Todavia, também este órgão não revela a composição precisa dos antígenos de seus ensaios. No que se refere ao teste de IgG ELISA indireta (Euroimmun), são utilizadas proteínas NS1 recombinantes. Segundo sua bula (129), em uma análise de 29 amostras de pacientes com infecção comprovada por ZIKV, a sensibilidade combinada (IgM/IgG) foi de 97%, com 86% para IgM e 76% para IgG, isoladamente; não há descrição do tempo do início dos sintomas em que foram

coletadas as amostras. O mesmo documento reporta que soros de pacientes com outras infecções por flavivírus foram testados, com quase ausência de reações-cruzadas, a saber: DENV (n=120), vírus da encefalite do carrapato (TBEV) (n=15), vírus da febre amarela (n=12), JEV (n=25) e WNV (n=34). Dentre todos os soros, apenas um paciente com infecção aguda por JEV foi positivo.

Com o propósito de avaliar a especificidade do teste IgG ELISA indireta (Euroimmun), Huzly et al. (2016) o utilizaram em amostras de pacientes com diferentes diagnósticos/condições (81). Demonstrou-se alta especificidade, tendo contudo envolvido um número pequeno de pacientes com infecção aguda por DENV comprovada por teste molecular. Para testagem do Anti-ZIKV IgG foram utilizados um total de 126 amostras - infecção por DENV (n=10), infecção por TBEV (n=21), vacinação para TBEV (n=52), vacinação para febre amarela (n=15), infecção pelo vírus da hepatite C (n=16), infecção aguda por ZIKV (n=11) e infecção passada por ZIKV (n=1). Já para testagem do Anti-ZIKV IgM foram utilizadas 132 amostras - infecção por DENV (n=16), infecção por TBEV (n=38), vacinação para febre amarela (n=15), IgM policlonal (n=52) e infecção por ZIKV (n=11). As amostras de pacientes com "infecção por ZIKV" provieram do Brasil e foram definidas assim por IFI positiva. Para o Anti-ZIKV IgG houve especificidade de 100% (IC 95%: 95,9 a 100). Para o Anti-ZIKV IgM houve alta especificidade, com somente um falso-positivo e dois "borderline" (amostras de paciente com IgM policlonal).

Por sua vez, Steinhagen et al. (2016), em estudo patrocinado pelo fabricante do referido teste, utilizaram 27 amostras de pacientes com infecção aguda por ZIKV (confirmados por PCR) e 85 amostras de pacientes com infecção suspeita por ZIKV (critérios clínico-epidemiológicos e IFI positiva), provindas tanto de viajantes quanto de residentes de zonas endêmicas (134). Tais amostras foram comparadas com 252 amostras de pacientes com infecção confirmada por outros patógenos, incluindo: DENV (n=93), WNV (n=34), JEV (n=25), CHIKV (n=19) e *Plasmodium* spp. (n=69), além de pós-vacinação para febre amarela (n=12). Dentre as amostras confirmadas para ZIKV, coletadas após 6 dias do início dos sintomas, a sensibilidade foi de 58,8% (95% IC: 26,0 a 7,4) para ELISA IgM, 88,2% (95% IC: 64,4 a 98,0) para ELISA IgG e 100% (IC 95%: 78,4 a 100) para o combinado IgM/IgG, com especificidade de 99,8% (IC 95%: 99,2 a 100). Entre todas as amostras testadas referentes a outros patógenos, possível reação-cruzada ocorreu em 0,8% (95% CI: 0 a 3,0) e 0,4% (95% CI: 0 a 2,4) para IgM e IgG, respectivamente. Não foi detectada reação-cruzada em amostras com altos títulos de anticorpos para DENV. Já em

outro estudo, desenhado para avaliar a sensibilidade do mesmo teste, Lustig et al. (2017) utilizaram 105 amostras de 63 viajantes israelenses, europeus e chilenos, em retorno de zona endêmica e com infecção comprovada por ZIKV (por PCR ou teste de neutralização), demonstrando uma sensibilidade combinada IgM/IgG menor (88%), para amostras coletadas após cinco dias de doença (135).

Utilizando espécimes de pacientes com infecção suspeita por ZIKV, Granger et al. (2017) compararam o grau de concordância entre três testes de IgM para ZIKV - MAC-ELISA IgM do CDC, InBios ZIKV Detect™ e anti-ZIKV IgM ELISA Euroimmun (84). Os dois primeiros apresentaram uma performance comparável, com concordância positiva, concordância negativa e valor de kappa variando, respectivamente, entre 87.5-93.1%, 95.7-98.5% e 0.52-0.83. Em contraste, a comparação de ambos com o teste de IgM ELISA Euroimmun resultou em concordância positiva, concordância negativa e valor de kappa variando, respectivamente, entre 17.9-42.9%, 91.7-98.6% e 0.10-0.39. Uma vez que o trabalho teve como notável limitação o uso de poucas amostras com infecção comprovada por ZIKV, os autores supõem que a baixa concordância positiva do teste de IgM ELISA Euroimmun, em relação aos dois primeiros, poderia ser explicada por menor sensibilidade do mesmo ou, de outro modo, por sua maior especificidade. A especificidade aumentada, reportada pelos estudos descritos acima, estaria relacionada ao antígeno NS1 usado no ensaio. Ressalta-se que não foram pesquisados anticorpos da classe IgG no referido estudo.

Tomados em conjunto, os estudos acima apontam para elevada especificidade do ensaio imunoenzimático baseado no antígeno NS1 de ZIKV. Já os dados reportados de sensibilidade, em especial para IgM, são mais variados. No presente estudo, isto poderia se traduzir em baixa ocorrência de reações-cruzadas, isto é, de falso-positivos para zika em participantes com exposição prévia somente a DENV. Entretanto, até o momento, testes de neutralização ainda são considerados padrão-ouro para tal diferenciação - em que pesem suas próprias limitações, discutidas anteriormente.

Apesar das limitações relacionadas à amostragem e espacialidade, nota-se uma grande diferença entre a soroprevalência de zika aqui reportada (47,2%) e a proporção (0,01%) de casos suspeitos notificados (84.957) sobre a população estimada média do estado do Rio de Janeiro (6.498.837) para o triênio 2015-2017, isto é, desde o princípio da epidemia no estado (136). Presume-se que este fato se deva não só à enorme proporção de casos assintomáticos, já descrita, como à

significativa subnotificação de casos sintomáticos. Além disso, admite-se ter havido silenciosa circulação do vírus desde pelo menos 2014, a qual escapou ao sistema de notificações. Netto et al. (2017) encontraram soroprevalência ainda maior em Salvador (63,3%), com destaque para um subgrupo de 273 gestantes (69,3%) (104).

Por seu turno, os resultados apresentados para chikungunya não padecem, teoricamente, do risco de reações-cruzadas significativas, admitindo-se que não haja cocirculação de outros alfavírus. Segundo bula (131) do teste ELISA empregado, em 22 amostras examinadas, houve sensibilidade e especificidade de 100%. Admitindo-se que os casos autóctones de chikungunya iniciaram-se em 2015 no estado do Rio de Janeiro, aqui também se percebe a grande distância entre a soroprevalência encontrada (28,4%) na amostra e a proporção (0,003%) de casos suspeitos/população estimada média (19.497/6.498.837), referente ao triênio 2015-2017 (136). A exemplo do referido para zika, isto sugere larga ocorrência de subnotificações. Salienta-se que, em comparação com outros dois inquéritos sorológicos realizados no Brasil, nosso achado é superior ao de Netto et al. (2017) em Salvador (7,4%), e ao de Cunha et al. (2017) em Riachão do Jacuípe (20%), ambas cidades do estado da Bahia (104, 123). Para fins comparativos, o Quadro 1 lista outros achados de inquéritos sorológicos em gestantes pelo mundo. Notadamente, Gérardin et al. (2008) também lançaram mão de uma amostra acessível de gestantes da Ilha Reunião para convenientemente estimar o alcance da epidemia de CHIKV entre 2006-2007, durante o seu pico. Neste caso, demonstraram que a sondagem entre as gestantes (18,2%) aproximou-se à taxa de ataque obtida pelo sistema de vigilância local (16,5%), até aquele momento. Findada a epidemia, realizaram um inquérito de base-populacional demonstrando uma soroprevalência de 38,2% (IC 95%: 35,9 a 40,6%) (58).

No que se refere à análise das soroprevalências segundo os locais de residência das gestantes, os resultados não lograram significância estatística, exceto por discreto aumento de sorologia positiva para zika em participantes que moravam em Nova Iguaçu, comparadas com as que moravam em outros municípios. Em contraste, observamos interessante associação entre sororreatividades para ZIKV e CHIKV, a qual tem como provável explicação o grau de exposição ao vetor comum, isto é, indivíduos mais expostos aos mosquitos *Ae. aegypti* teriam risco aumentado para ambas as infecções. Já a disparidade entre o relato oral de dengue, zika ou chikungunya prévias e as soroprevalências encontradas demonstra o poder bastante limitado que tal inquérito possui em refletir infecção passada. Dentre os prováveis

fatores que explicariam a baixa sensibilidade e VPN do mesmo, estão quadros assintomáticos, baixa procura e/ou dificuldade de acesso aos serviços de saúde impedindo o devido diagnóstico, e médicos pouco treinados em reconhecer os critérios de definição de caso suspeito. A sensibilidade ainda menor para dengue pode se dever, além disso, a um viés de memória das participantes (e.g., quadros remotos não memorados). Por outro lado, a especificidade maior que 90% do inquérito sugere que, uma vez diagnosticados, a maior parte dos quadros é distinguível por suas características clínico-epidemiológicas, especialmente em vigência dos surtos.

Dentre as limitações do presente estudo, está a reduzida quantidade de dados socioeconômicos e epidemiológicos das participantes, justificada pela necessidade de simplificar o processo de entrevista. Outra importante e já exposta limitação foi a não realização de ensaios de neutralização para DENV e ZIKV, o que pode ter superestimado suas respectivas soroprevalências devido a reações-cruzadas. Baseado nos estudos referidos anteriormente, este risco pode ter sido maior em relação aos resultados de dengue, que de zika. Além disso, a variável acerca de vacinação prévia para febre amarela foi somente avaliada em pouco mais da metade das gestantes, com somente uma delas afirmando ter sido vacinada. No entanto, acreditamos que este fato não produziu impacto significativo em termos de possíveis reações-cruzadas, tendo-se em conta que, durante décadas, o estado do Rio de Janeiro não fazia parte da zona de risco para febre amarela e, portanto, a vacina não estava incluída no calendário vacinal básico da região. Somente em 2017, com a reemergência desta arbovirose em estados do sudeste brasileiro, a vacina passou a ser recomendada, todavia com contraindicação relativa para gestantes. Finalmente, salienta-se que os resultados obtidos em nosso estudo se referem a uma população-específica (*i.e.*, gestantes), recrutadas sob forma de amostragem não-probabilística, tornando assim limitada a validade externa dos mesmos.

Apesar das limitações de amostragem, inquéritos sorológicos envolvendo gestantes recrutadas em serviços de saúde - a exemplo de doadores em bancos de sangue - são comumente realizados como sondagens de situações epidemiológicas. Isto é válido para determinados agravos, para os quais esses grupos encerram riscos próximos à população geral. A depender da distribuição dos vetores, podemos incluir as arboviroses no rol desses agravos. Assim, é provável que nossos achados de soroprevalência aproximem-se dos vigentes em mulheres em idade fértil de

mesmo perfil socioeconômico e, em alguma medida, para a população geral. Isto é reforçado pelo fato de que a maior parte da população da Baixada Fluminense é usuária do sistema público de saúde, tal como as participantes de nosso estudo.

Por fim, os resultados de soroprevalência sugerem um cenário de hiperendemicidade de dengue na Baixada Fluminense, apontando para a deficiência das políticas de controle vetorial nas últimas décadas. Não sem razão, este contexto tornou propícia a emergência de novas arboviroses, como atestado pelas recentes epidemias de zika e chikungunya, de grande impacto sobre a saúde pública. Seus respectivos achados de soroprevalência ilustram o alcance significativo dessas epidemias na Baixada Fluminense e, ao mesmo tempo, sugerem a possibilidade de novas e iminentes ondas epidêmicas, tendo-se em conta a proporção observada de suscetíveis em nossa amostra.

6 PERSPECTIVAS

As soroprevalências encontradas para zika e chikungunya na amostra de gestantes revestem-se de especial importância neste trabalho, tendo em conta a escassez de inquéritos sorológicos para essas arboviroses emergentes no Brasil. No que tange ao primeiro, ainda que alguns estudos demonstrem alta especificidade de ELISA coberto por antígeno NS1 de ZIKV, a possibilidade de reações-cruzadas com DENV não pôde ser seguramente afastada. Espera-se, pois, que isso seja brevemente dirimido através de ensaio de detecção de anticorpos neutralizantes. Desta forma, elencamos como passo seguinte e iminente a realização de FRNT para ZIKV nas amostras que apresentaram positividade dupla para ZIKV e DENV. Visando a cumprir este fim, já firmamos parceria com o Laboratório de Tecnologia Viroológica (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

7 CONCLUSÕES

- Houve expressiva soroprevalência (88,8%) para dengue na amostra de gestantes. Em vista do risco de reatividade-cruzada em eventuais participantes com infecção prévia para ZIKV e DENV-não-imunes, um resultado mais acurado demandaria a realização de teste de neutralização, considerado mais específico. Ainda assim, a sororreatividade para DENV nas gestantes com teste negativo para ZIKV (79,9%) ainda demonstra elevada soroprevalência na amostra.
- A soroprevalência de 47,2 % para zika sugere significativo número de infecções prévias na amostra de participantes. Apesar de alguns estudos demonstrarem alta especificidade de ELISA baseado no antígeno NS1 de ZIKV utilizado, um resultado mais acurado demandaria a realização de teste de neutralização, ainda considerado padrão-ouro. De todo modo, o achado sugere o risco especial oferecido ao estrato populacional representado por nossa amostra, isto é, de mulheres em idade reprodutiva.
- A soroprevalência de 28,4% para chikungunya demonstra que mais de 1/4 das gestantes da amostra foram infectadas entre 2015 e 2017.
- Foi observada significativa associação (OR 3,69; IC 95%: 2,24 a 6,07) entre soropositividade para CHIKV e ZIKV, bem como entre CHIKV e DENV. Uma provável explicação seria que o grau de exposição aos mosquitos *A. aegypti*, seu transmissor comum, atue como fator de risco para as três arboviroses.
- A informação oral acerca de diagnóstico prévio de dengue, zika e chikungunya mostrou, como esperado, baixa sensibilidade e VPN. Quadros assintomáticos e subdiagnóstico de quadros sintomáticos poderiam explicar isso. Por outro lado, a especificidade maior que 90% do inquérito para as três arboviroses sugere que, uma vez diagnosticadas, seus quadros costumam ser distinguíveis por suas características clínico-epidemiológicas, especialmente em vigência dos surtos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Organização Mundial da Saúde; 2009.
2. SVS. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2015. In: Saúde SdVe, editor. Ministério da Saúde 2015.
3. SVS. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a sSemana Epidemiológica 51, 2015. In: Epidemiológica SdV, editor. Boletim Epidemiológico - MS: Ministério da Saúde; 2016.
4. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1981-7.
5. Chan JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect*. 2016;72(5):507-24.
6. Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, do Carmo GM, Henriques CM, Coelho GE, et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(9):242-7.
7. França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*. 2016;388(10047):891-7.
8. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo TV, et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med*. 2017;14(1):e1002203.
9. Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res*. 2013;99(3):345-70.
10. Arroyo-Ávila M, Vilá LM. Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection. *P R Health Sci J*. 2015;34(2):71-7.
11. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1760.
12. OMS. Global strategy for dengue prevention and control.: Organização Mundial da Saúde; 2012.
13. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7.
14. Shepard DS, Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Guzmán MG, Halstead SB, Harris E, et al. Approaches to refining estimates of global burden and economics of dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3306.
15. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25(1):53-4.

16. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6.
17. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):938-40.
18. Paixão ES, Costa MaC, Rodrigues LC, Rasella D, Cardim LL, Brasileiro AC, et al. Trends and factors associated with dengue mortality and fatality in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):399-405.
19. Fares RC, Souza KP, Añez G, Rios M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. *Biomed Res Int.* 2015;2015:321873.
20. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet.* 2015;385(9966):453-65.
21. Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(1):172-80.
22. Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, et al. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):566-72.
23. Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984;120(5):653-69.
24. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;38(2):411-9.
25. Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiol Spectr.* 2014;2(6).
26. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(8):532-43.
27. Snow GE, Haaland B, Ooi EE, Gubler DJ. Review article: Research on dengue during World War II revisited. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(6):1203-17.
28. Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses.* 2011;3(12):2374-95.
29. Paixão ES, Teixeira MG, Costa MDCN, Rodrigues LC. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(7):857-65.
30. Xiong YQ, Mo Y, Shi TL, Zhu L, Chen Q. Dengue virus infection during pregnancy increased the risk of adverse fetal outcomes? An updated meta-analysis. *J Clin Virol.* 2017;94:42-9.
31. Nascimento LB, Siqueira CM, Coelho GE, Siqueira JB. Symptomatic dengue infection during pregnancy and livebirth outcomes in Brazil, 2007-13: a retrospective observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(9):949-56.
32. Pouliot SH, Xiong X, Harville E, Paz-Soldan V, Tomashek KM, Breart G, et al. Maternal dengue and pregnancy outcomes: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2010;65(2):107-18.
33. Machado CR, Machado ES, Rohloff RD, Azevedo M, Campos DP, de Oliveira RB, et al. Is pregnancy associated with severe dengue? A review of data from the

- Rio de Janeiro surveillance information system. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(5):e2217.
34. Shu PY, Huang JH. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(4):642-50.
 35. Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol*. 2004;31(3):185-9.
 36. Nishiura H, Kinoshita R, Mizumoto K, Yasuda Y, Nah K. Transmission potential of Zika virus infection in the South Pacific. *Int J Infect Dis*. 2016;45:95-7.
 37. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2636.
 38. Petersen LR, Jamieson DJ, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 2016;375(3):294-5.
 39. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885-6.
 40. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569-72.
 41. Faria NR, Azevedo Rdo S, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 2016;352(6283):345-9.
 42. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):411-5.
 43. Massad E, Burattini MN, Khan K, Struchiner CJ, Coutinho FAB, Wilder-Smith A. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. *Epidemiol Infect*. 2017;145(11):2303-12.
 44. SVS. Boletim Epidemiológico - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. In: Saúde SdVe, editor. 2017.
 45. Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):880-2.
 46. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(14):372-4.
 47. Venturi G, Zammarchi L, Fortuna C, Remoli ME, Benedetti E, Fiorentini C, et al. An autochthonous case of Zika due to possible sexual transmission, Florence, Italy, 2014. *Euro Surveill*. 2016;21(8).
 48. Coelho FC, Durovni B, Saraceni V, Lemos C, Codeco CT, Camargo S, et al. Higher incidence of Zika in adult women than adult men in Rio de Janeiro suggests a significant contribution of sexual transmission from men to women. *Int J Infect Dis*. 2016;51:128-32.

49. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004636.
50. Franca GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*. 2016.
51. Costello A. Defining the syndrome associated with congenital Zika virus infection. WHO: WHO; 2016.
52. SVS. Boletim Epidemiológico - Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 20/2017 In: Saúde SdVe, editor. 2017.
53. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 2016;387(10027):1531-9.
54. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29(3):487-524.
55. Harrison SC. Immunogenic cross-talk between dengue and Zika viruses. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1010-2.
56. Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(12):925-32.
57. Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun*. 2014;5:4084.
58. Gérardin P, Guernier V, Perrau J, Fianu A, Le Roux K, Grivard P, et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis*. 2008;8:99.
59. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008;5(3):e60.
60. Leparç-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet*. 2014;383(9916):514.
61. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015;13:102.
62. Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol*. 2014;88(11):6294-306.
63. Madariaga M, Ticona E, Resurrecion C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. *Braz J Infect Dis*. 2016;20(1):91-8.
64. Powers AM. Chikungunya. *Clin Lab Med*. 2010;30(1):209-19.
65. Dash M, Mohanty I, Padhi S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: do we really need it? *Indian J Med Sci*. 2011;65(3):83-91.

66. Kam YW, Pok KY, Eng KE, Tan LK, Kaur S, Lee WW, et al. Sero-prevalence and cross-reactivity of chikungunya virus specific anti-E2EP3 antibodies in arbovirus-infected patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e3445.
67. Allwinn R, Doerr HW, Emmerich P, Schmitz H, Preiser W. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? *Med Microbiol Immunol*. 2002;190(4):199-202.
68. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 1989;70 (Pt 1):37-43.
69. Posen HJ, Keystone JS, Gubbay JB, Morris SK. Epidemiology of Zika virus, 1947-2007. *BMJ Glob Health*. 2016;1(2):e000087.
70. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:23-61.
71. Dowd KA, Pierson TC. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view. *Virology*. 2011;411(2):306-15.
72. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*. 2016;17(9):1102-8.
73. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(28):7852-7.
74. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232-9.
75. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol*. 2017;89(8):1477-9.
76. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016;353(6301):823-6.
77. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. 2016;536(7614):48-53.
78. Swanstrom JA, Plante JA, Plante KS, Young EF, McGowan E, Gallichotte EN, et al. Dengue Virus Envelope Dimer Epitope Monoclonal Antibodies Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *MBio*. 2016;7(4).
79. Collins MH, McGowan E, Jadi R, Young E, Lopez CA, Baric RS, et al. Lack of Durable Cross-Neutralizing Antibodies Against Zika Virus from Dengue Virus Infection. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(5):773-81.
80. Priyamvada L, Hudson W, Ahmed R, Wrammert J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. *Emerg Microbes Infect*. 2017;6(5):e33.
81. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill*. 2016;21(16).

82. L'Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2462-71.
83. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(31):8384-9.
84. Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2127-36.
85. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP, Kramer LD, et al. A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis. *EBioMedicine.* 2017;16:136-40.
86. Rockstroh A, Moges B, Barzon L, Sinigaglia A, Palù G, Kumbukgolla W, et al. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(11):e99.
87. Sam IC, Kümmerer BM, Chan YF, Roques P, Drosten C, AbuBakar S. Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015;15(4):223-30.
88. Litzba N, Schuffenecker I, Zeller H, Drosten C, Emmerich P, Charrel R, et al. Evaluation of the first commercial chikungunya virus indirect immunofluorescence test. *J Virol Methods.* 2008;149(1):175-9.
89. Yap G, Pok KY, Lai YL, Hapuarachchi HC, Chow A, Leo YS, et al. Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e753.
90. Prat CM, Flusin O, Panella A, Tenebray B, Lanciotti R, Leparco-Goffart I. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(12):2129-32.
91. Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1952;38(8):747-52.
92. Halstead SB, Sukhavachana P, Nisalak A. Assay of mouse adapted dengue viruses in mammalian cell cultures by an interference method. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;115:1062-8.
93. Sukhavachana P, Nisalak A, Halstead SB. Tissue culture techniques for the study of dengue viruses. *Bull World Health Organ.* 1966;35(1):65-6.
94. Roehrig JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123-32.
95. Nisalak A. Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2015;46 Suppl 1:55-76.
96. Vaidya SR, Brown DW, Jin L, Samuel D, Andrews N, Brown KE. Development of a focus reduction neutralization test (FRNT) for detection of mumps virus neutralizing antibodies. *J Virol Methods.* 2010;163(1):153-6.
97. Perret C, Chanthavanich P, Pengsaa K, Limkittikul K, Hutajaroen P, Bunn JE, et al. Dengue infection during pregnancy and transplacental antibody transfer in Thai mothers. *J Infect.* 2005;51(4):287-93.

98. Collenberg E, Ouedraogo T, Ganamé J, Fickenscher H, Kynast-Wolf G, Becher H, et al. Seroprevalence of six different viruses among pregnant women and blood donors in rural and urban Burkina Faso: A comparative analysis. *J Med Virol.* 2006;78(5):683-92.
99. Schwarz NG, Girmann M, Randriamampionona N, Bialonski A, Maus D, Krefis AC, et al. Seroprevalence of antibodies against Chikungunya, Dengue, and Rift Valley fever viruses after febrile illness outbreak, Madagascar. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(11):1780-6.
100. Wood H, Drebot MA, Dewailly E, Dillon L, Dimitrova K, Forde M, et al. Seroprevalence of seven zoonotic pathogens in pregnant women from the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(3):642-4.
101. Khamim K, Hattasingh W, Nisalak A, Kaewkungwal J, Fernandez S, Thaisomboonsuk B, et al. Neutralizing dengue antibody in pregnant Thai women and cord blood. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2):e0003396.
102. Laoprasopwattana K, Suntharasaj T, Petmanee P, Suddeaugrai O, Geater A. Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: seroprevalence, seroincidence and maternal-fetal transmission, southern Thailand, 2009-2010. *Epidemiol Infect.* 2016;144(2):381-8.
103. Yen TY, Trovoada dos Santos MeJ, Tseng LF, Chang SF, Cheng CF, Carvalho AV, et al. Seroprevalence of antibodies against dengue virus among pregnant women in the Democratic Republic of Sao Tome and Principe. *Acta Trop.* 2016;155:58-62.
104. Netto EM, Moreira-Soto A, Pedroso C, Höser C, Funk S, Kucharski AJ, et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. *MBio.* 2017;8(6).
105. Sissoko D, Malvy D, Giry C, Delmas G, Paquet C, Gabrie P, et al. Outbreak of Chikungunya fever in Mayotte, Comoros archipelago, 2005-2006. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(8):780-6.
106. Bacci A, Marchi S, Fievet N, Massougbdji A, Perrin RX, Chippaux JP, et al. High seroprevalence of chikungunya virus antibodies among pregnant women living in an urban area in Benin, West Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(6):1133-6.
107. Mohamed Ismail NA, Wan Abd Rahim WE, Salleh SA, Neoh HM, Jamal R, Jamil MA. Seropositivity of dengue antibodies during pregnancy. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:436975.
108. Figueiredo LT, Cavalcante SM, Simões MC. Dengue serologic survey of schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, in 1986 and 1987. *Bull Pan Am Health Organ.* 1990;24(2):217-25.
109. Figueiredo LT, Owa MA, Carlucci RH, dal Fabbro AL, de Mello NV, Capuano DM, et al. Dengue serologic survey in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Bull Pan Am Health Organ.* 1995;29(1):59-69.
110. da Cunha RV, Dias M, Nogueira RM, Chagas N, Miagostovich MP, Schatzmayr HG. Secondary dengue infection in schoolchildren in a dengue endemic area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1995;37(6):517-21.
111. da Cunha RV, Maspero RC, Miagostovich MP, de Araújo ES, Luz DaC, Nogueira RM, et al. Dengue infection in Paracambi, State of Rio de Janeiro, 1990-1995. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(5):379-83.

112. Vasconcelos PF, Lima JW, da Rosa AP, Timbó MJ, da Rosa ES, Lima HR, et al. [Dengue epidemic in Fortaleza, Ceará: randomized seroepidemiologic survey]. *Rev Saude Publica*. 1998;32(5):447-54.
113. Vasconcelos PF, Lima JW, Raposo ML, Rodrigues SG, da Rosa JF, Amorim SM, et al. [A seroepidemiological survey on the island of São Luis during a dengue epidemic in Maranhão]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(2):171-9.
114. Vasconcelos PF, Mota K, Straatmann A, Santos-Torres S, da Rosa AP, Tavares Neto J. [A dengue epidemic in Ipubiara and Prado, Bahia. A seroepidemiologic survey]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(1):61-7.
115. Teixeira MaG, Barreto ML, Costa MaC, Ferreira LD, Vasconcelos PF, Cairncross S. Dynamics of dengue virus circulation: a silent epidemic in a complex urban area. *Trop Med Int Health*. 2002;7(9):757-62.
116. Siqueira JB, Martelli CM, Maciel IJ, Oliveira RM, Ribeiro MG, Amorim FP, et al. Household survey of dengue infection in central Brazil: spatial point pattern analysis and risk factors assessment. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71(5):646-51.
117. Lima VL, Rangel O, Andrade VR, Silveira NY, Oliveira SS, Figueiredo LT. [Dengue: sero-epidemiological survey and virological surveillance in Campinas, São Paulo, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2007;23(3):669-80.
118. da Silva-Nunes M, de Souza VA, Pannuti CS, Sperança MA, Terzian AC, Nogueira ML, et al. Risk factors for dengue virus infection in rural Amazonia: population-based cross-sectional surveys. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(4):485-94.
119. Honório NA, Nogueira RM, Codeço CT, Carvalho MS, Cruz OG, Magalhães MeA, et al. Spatial evaluation and modeling of Dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(11):e545.
120. Braga C, Luna CF, Martelli CM, de Souza WV, Cordeiro MT, Alexander N, et al. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. *Acta Trop*. 2010;113(3):234-40.
121. Pessanha JE, Caiaffa WT, Kroon EG, Proietti FA. [Dengue fever in three sanitary districts in the city of Belo Horizonte, Brazil: a population-based seroepidemiological survey, 2006 to 2007]. *Rev Panam Salud Publica*. 2010;27(4):252-8.
122. Teixeira MG, Morato V, Barreto FR, Mendes CM, Barreto ML, Costa MaC. Risk factors for the incidence of dengue virus infection in preschool children. *Trop Med Int Health*. 2012;17(11):1391-5.
123. Cunha RV, Trinta KS, Montalbano CA, Sucupira MV, de Lima MM, Marques E, et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus in a Rural Community in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005319.
124. IBGE. Censo Demográfico 2010. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011.
125. SERION ELISA classic Dengue Virus IgG/IgM. V 114.3 ed: Institut Virion \ Serion GmbH.
126. Anti-Dengue Virus ELISA (IgG) Teste instruction. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG; 2016.
127. Panbio Dengue Early ELISA. Panbio Diagnostics; 2016.

128. Novagnost Zika Virus IgM μ - capture. 2016 05 03 ed: Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.
129. Anti-Zika Virus ELISA (IgG) Test instruction. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG; 2017.
130. Anti-Chikungunya Virus ELISA (IgM) Test Instruction. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG; 2017.
131. Anti-Chikungunya Virus ELISA (IgG) Test Instruction. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG; 2017.
132. Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central (SNC). 2.1 ed: Ministério da Saúde; 2016.
133. Anti-Dengue Virus ELISA (IgG) Test instruction. Euroimmun Medizinische Labordiagnostik AG; 2016.
134. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(50).
135. Lustig Y, Zelena H, Venturi G, Van Esbroeck M, Rothe C, Perret C, et al. Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. *J Clin Microbiol.* 2017;55(6):1894-901.
136. Giordano C. Boletim Epidemiológico - Arboviroses 03/2017. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro; 2017.

9 ANEXOS

9.1 Ficha de Entrevista das Participantes

Registro: [__|__|__|__|__|__|__|__] Data do atendimento: [__/__/____]

1. Nome: [_____]
2. DN: [__|__|. __|__|. __|__|__|__]
3. Cidade onde mora:
 Nova Iguaçu Rio de Janeiro Belford Roxo Duque de Caxias São João de Meriti Mesquita
 Nilópolis Queimados Japeri Outros municípios do RJ Outro estado
4. Bairro (se em Nova Iguaçu):
 Centro Posse Comendador Soares Cabuçu Km 32 Austin Vila de Cava Miguel Couto
 Tinguá outro
5. Número Tel 1: [_____] Número Tel 2: [_____]
6. Faz pré-natal? Sim Não
7. Idade gestacional: [__|__] semanas / [__|__] dias Desconhecida
Cálculo pela: DUM USG
8. Motivo da admissão:
 Trabalho de parto (ou pródromos) Queixas urinárias
 Suspeita de arbovirose (zika/dengue/chikungunya)
 Outro motivo
9. Já teve Zika? Sim Não Se sim, ano [_____] Não lembra
10. Já teve Chikungunya? Sim Não Se sim, ano [_____] Não lembra
11. Já teve Dengue? Sim Não Se sim, ano(s) [_____] [_____] Não lembra
12. Já vacinou para Febre Amarela? Sim Não Não sabe

Preencher somente em caso de suspeita de arboviroses. Gestante deve ser agendada para visita com médico do estudo.

Caso suspeito de arboviroses (Zika/Chikungunya/Dengue):

Febre aferida ou relatada E/OU Exantema

+ dois dos seguintes: Odor de cabeça Odor atrás dos olhos Odor nos músculos Oprostração/corpo mole Odor nas juntas/articulações Onáuseas e vômitos

Coceira no corpo Inchaço/edema nos membros Olhos vermelhos sem secreção/coceira

9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo de prevalência sorológica de Zika, Chikungunya e Dengue em gestantes atendidas numa maternidade pública do município de Nova Iguaçu, Baixada Fluminense, com avaliação clínico-laboratorial de casos suspeitos sintomáticos.

INTRODUÇÃO

Este estudo é patrocinado pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Os médicos responsáveis pelo estudo neste centro são os Drs. Bernardo Bastos Wittlin e José Henrique da Silva Pilotto.

Este documento é um formulário de consentimento, o qual lhe fornece informações sobre este estudo. A equipe do estudo conversará com você sobre estas informações. Sinta-se à vontade para fazer perguntas sobre este estudo a qualquer momento. Se você concordar em participar desse estudo e permitir que seu bebê também seja acompanhado, pediremos que assine este formulário que é elaborado em 2 (duas) vias de igual teor e que serão assinadas por você e um dos pesquisadores envolvidos no estudo. Uma via ficará retida com o Pesquisador responsável e a outra será entregue a você.

Caso decida não participar deste estudo, você e seu bebê não terão qualquer prejuízo no atendimento prestado nesta unidade.

Caso, por qualquer razão, você decida desistir de participar deste estudo, você poderá fazê-lo em qualquer momento, mesmo já tenha assinado o termo.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Com a chegada de novas arboviroses ao Brasil (doenças transmitidas por mosquitos), como Zika e Chikungunya, além da Dengue, muitas pesquisas estão sendo realizadas para entender mais sobre como são os vírus, como são transmitidos, quais as características das doenças nos pacientes e quais são as melhores maneiras de preveni-las, diagnosticá-las e tratá-las. Sabe-se até agora que o vírus da Zika pode afetar os bebês de mulheres grávidas. Por isso, há uma maior preocupação com gestantes apresentando suspeita dessa doença.

O QUE EU TEREI QUE FAZER SE PARTICIPAR DESTES ESTUDO?

SITUAÇÃO 1

Caso você não apresente no momento os sintomas e sinais sugestivos de Zika e outras arboviroses, somente colheremos amostra de seu sangue com o objetivo de sabermos se você já teve contato com esses vírus no passado (você provavelmente já está curada, sem riscos).

Neste caso, colheremos uma amostra de 10ml de seu sangue, que corresponde a mais ou menos duas colheres de sobremesa, para pesquisar anticorpos para as seguintes condições: Zika, Chikungunya, Dengue. Também faremos testes-rápidos para o HIV, sífilis, Hepatites B e Hepatite C.

Você receberá o resultado dos testes-rápidos para HIV, sífilis, Hepatites B e Hepatite C, no mesmo dia e receberá todas as orientações necessárias sobre os resultados, além de tratamento e acompanhamento, caso necessário. Para saber o resultado dos exames sorológicos para Zika, Chikungunya e Dengue (que dizem se você já teve alguma dessas doenças no passado) você poderá retornar após 30 dias. Procure a bióloga Adriana Roriz de segunda à sexta-feira, no mesmo local onde você está sendo atendida agora, e ela entrará em contato com um dos médicos responsáveis pelo estudo.

SITUAÇÃO 2

Caso você apresente no momento os sintomas e sinais sugestivos de Zika e outras arboviroses, colheremos amostras de seu sangue (20ml), que corresponde a uma colher de sopa de sangue, e urina para testes que poderão dizer se você está infectada com uma dessas arboviroses ou tem outros possíveis diagnósticos.

Neste caso, colheremos uma amostra de 20ml de seu sangue, além de urina, com o objetivo de testar as seguintes condições: Zika, Chikungunya, Dengue, Sífilis, Rubéola, Toxoplasmose, Citomegalovírus, Epstein-Barr, HIV, Hepatites B e C. Você receberá o resultado dos testes-rápidos para HIV, sífilis e Hepatites B e C, no mesmo dia. Para os demais, assim que estiverem disponíveis, você receberá os resultados e todas as orientações necessárias, além de tratamento e acompanhamento, caso necessário

Neste caso, você será agendada para avaliação e consulta com um dos médicos da equipe do nosso estudo. Se houver suspeita/confirmação para infecção recente pelo vírus da Zika, você e seu bebê serão acompanhados no ambulatório de gestantes com Zika da Maternidade Mariana Bulhões.

SEGUIMENTO APÓS O TÉRMINO DE SUA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Se os testes indicarem que você está infectada no momento pelo vírus da Zika, você será acompanhada com consultas mensais no ambulatório de Zika da Maternidade Mariana Bulhões até o término da gravidez e seu bebê será encaminhado para serviço de doenças infecciosas do Hospital Geral de Nova Iguaçu – HGNI, especializado em pediatria após nascer. Se algum(ns) dos outros testes der(em) positivo(s) e isso tiver impacto para a sua saúde e/ou de seu bebê, realizaremos um encaminhamento ao serviço médico especializado, nos certificando de que serão atendidos e acompanhados no HGNI.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Após a realização dos testes previstos nesse estudo, a parte remanescente das amostras do seu sangue serão enviadas a um centro de armazenamento na FIOCRUZ para serem encaminhadas a laboratórios especializados, onde serão feitos os testes do estudo. Todas as suas amostras serão utilizadas para fins previstos no estudo.

Suas amostras não serão identificadas com o seu nome, elas receberão um código especial do estudo, idêntico ao código que você recebeu para o estudo, chamado de número PID. Os documentos que permitem ligar este código especial aos seus dados pessoais serão mantidos em um local seguro na clínica de pesquisa, e separado do seu prontuário médico, preservando assim a sua privacidade.

As suas amostras de sangue que forem guardadas em um biobanco desse laboratório especial só poderão ser acessadas por pesquisadores autorizados. Outros funcionários da instituição também terão acesso às amostras para guardá-las, mas essas pessoas não terão acesso a nenhuma informação capaz de revelar a sua identidade. As suas amostras de sangue não serão vendidas nem utilizadas diretamente para fabricar produtos comerciais.

Se um pesquisador(a) desejar fazer um novo estudo nas amostras do biobanco no futuro, ele ou ela deverá redigir um projeto, que passará pela análise e aprovação dos membros da FIOCRUZ. Esses membros conhecem as regras e procedimentos de controle de amostras armazenadas e eles serão responsáveis por garantir que seus direitos e privacidade sejam protegidos e que nenhum desses estudos futuros aconteça sem a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz e, se necessário, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Brasil (CONEP), garantindo que a pesquisa seja relevante e assegurando que o projeto corresponde ao mesmo tipo de pesquisa com o qual você concordou, ou seja, relacionada a arboviroses, ressaltando que cada nova pesquisa realizada

pelo patrocinador ou por outros pesquisadores está condicionada à apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/CONEP.

De acordo com as regras brasileiras as suas amostras ficarão guardadas por até 5 (cinco) anos, podendo haver renovação deste prazo mediante solicitação dos pesquisadores responsáveis, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material.

As suas amostras serão usadas somente quando solicitadas por um pesquisador que tiver um estudo aprovado. Nós não sabemos quando isso acontecerá, mas você tem o direito de saber o que foi feito com a sua amostra e o resultado, principalmente se isso puder resultar em benefícios para a sua saúde. Entraremos em contato para dar notícias sobre os resultados de testes futuros ou novos estudos. Para poder receber, você deve notificar a equipe de estudo de qualquer mudança em seu endereço e número de telefone.

Você também pode negar autorização para que as suas amostras sejam armazenadas para estudos futuros. Mesmo se você não permitir o armazenamento, você ainda poderá participar do estudo.

Você pode retirar seu consentimento para armazenamento e utilização das suas amostras, e isto não interromperá sua participação no estudo ou te trará qualquer outro prejuízo. Se você retirar o consentimento, as amostras serão destruídas e para isso você deverá fazer uma solicitação por escrito e assinada.

Leia cuidadosamente a declaração abaixo e escreva as suas iniciais no espaço apropriado.

Dou permissão para que as minhas amostras de sangue sejam armazenadas para uso em estudos futuros sobre HIV aprovados pelo NIH

() SIM () NÃO

Iniciais _____ Data: ____/____/____

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Riscos sociais

Se você participar deste estudo e tiver um diagnóstico positivo para qualquer uma das condições testadas, alguns integrantes da equipe hospitalar e toda a equipe do estudo poderão saber este diagnóstico. Esses trabalhadores levam a sua privacidade muito a sério. A equipe do estudo empenhará todos os esforços possíveis para se certificar de que outras pessoas não saibam qual o diagnóstico. Entretanto, às vezes, se você receber tratamento especial ou for a uma clínica especial, isso pode fazer com que os outros se perguntem se você e seu filho tem/teve determinada infecção.

Riscos da coleta de sangue

A coleta de sangue pode causar desconforto, sangramento ou hematomas no local da picada da agulha. Um pequeno coágulo pode se formar no local onde o sangue foi coletado e pode haver inchaço na região. Há um pequeno risco de infecção leve no local da picada. Também podem ocorrer vertigem e desmaios.

Riscos em relação aos dados

Toda a equipe do estudo e todos os procedimentos previstos da pesquisa são destinados a manter a privacidade e confidencialidade dos seus dados. O vazamento inadvertido de seus dados seria uma excepcionalidade incomum, mas teoricamente possível.

HÁ BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Nosso estudo realiza testes que não são, em sua totalidade, oferecidos ainda na rede pública. Os resultados também são liberados de modo mais rápido que o habitual na rede pública. Portanto, em caso de você e/ou seu bebê apresentarem uma das infecções testadas, você poderá ter o diagnóstico, o que facilitará o acompanhamento e cuidado médicos. Para algumas dessas infecções, como as arboviroses, incluindo a Zika, não há ainda tratamentos específicos (remédios que combatam o vírus). Os tratamentos atuais são de suporte, com medicações de suporte. Bebês que por acaso nasçam com malformações, decorrentes ou não da infecção, recebem cuidados especiais e são estimulados por equipe especializada, de acordo com suas condições. As informações aprendidas neste estudo podem ajudar outras mulheres grávidas no futuro, com os avanços no conhecimento decorrentes de estudos como este.

E SOBRE CONFIDENCIALIDADE?

O pesquisador se compromete a assegurar a garantia do sigilo e da confidencialidade dos dados de pesquisa, de acordo com as normas brasileiras e internacionais, com garantia do anonimato por meio da substituição de toda e qualquer identificação pessoal por um número de identificação no estudo, chamado de número de identificação do paciente. Dessa maneira, toda vez que houver necessidade de acesso aos dados da pesquisa por monitores ou auditores, os seus dados e os do seu bebê serão substituídos por um código que não permitirá identificar que aqueles dados são seus ou do seu bebê. Portanto, qualquer publicação desse estudo não usará o seu nome ou o nome do seu bebê ou os identificará pessoalmente.

Pessoas que podem rever os seus registros e do seu bebê (sem identificação do nome) e vir a ter acesso aos dados do histórico médico incluem o Comitê de Ética em Pesquisa do HGNI, Maternidade Mariana Bulhões e da FIOCRUZ, a equipe do estudo, os monitores do estudo, desde que haja a anuência do médico responsável e do Pesquisador responsável, assim como da autoridade responsável pelo Centro de Pesquisa do HGNI e respeitadas as regulamentações do Código de Ética do Conselho Federal de Medicina, as resoluções do mesmo órgão sobre auditorias médicas e a legislação brasileira, que visam proteger o sujeito da pesquisa.

QUANTO CUSTARÁ PARA MIM?

Nada será cobrado de você pelas visitas realizadas à clínica ou pelos exames de laboratório que serão realizados devido ao estudo.

Nem você nem a criança receberão nenhum tipo de pagamento por participar deste estudo. Você receberá vales para o seu transporte e para suas refeições em quantidade suficiente para permitir que você não gaste nada comparecendo às consultas. Será garantido o ressarcimento de qualquer outra despesa decorrente da sua participação e do seu bebê no estudo.

O QUE DEVO FAZER SE TIVER DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Para questões sobre esse estudo ou sobre lesões e danos decorrentes direta ou indiretamente da sua participação no estudo, entre em contato com o médico responsável por esse estudo no Hospital Geral de Nova Iguaçu, Dr. Bernardo Bastos Wittlin pelo telefone (21) 2667-3022 e, em caso de urgência, pelo telefone (21) 99764-2517 (Dr. Bernardo) ou (21) 981829797 (Dr. Pilotto)

Ao entrar no estudo, você receberá um cartão contendo os telefones para contato de urgência. Para questões sobre os seus direitos como participante da pesquisa, contate:

Dr. Luis Henrique Claro, coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral de Nova Iguaçu no telefone (21) 3779 9900 ramal 108. O endereço é Av. Henrique Duque Estrada Mayer, 953. Posse, Nova Iguaçu, RJ. CEP: 26030-380 – Horário de funcionamento de segunda à sexta-feira de 9:00 às 12:00 horas.

O CEP é um comitê que analisa e aprova os estudos científicos para garantir que os estudos estejam de acordo com as normas brasileiras de proteção ao sujeito de pesquisa e que os direitos dos participantes estejam sendo respeitados durante e após o estudo.

PÁGINA DE ASSINATURA

Se você leu este formulário de consentimento (ou lhe explicaram), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar deste estudo, assine seu nome abaixo e rubrique todas as folhas.

_____ Nome do participante (em letra de forma)	_____ Assinatura do participante	_____ Data
_____ Nome da testemunha (se necessário, em letra de forma)	_____ Assinatura da testemunha	_____ Data
_____ Nome do pesquisador responsável pela obtenção do TCLE (em letra de forma)	_____ Assinatura pesquisador responsável	_____ Data