



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Disciplina de Culminação de Estudos II

Relatório do Trabalho de Investigação

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

Autor:

Emídio Fernando Nhavoto

Maputo, Setembro de 2024



Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

Licenciatura em Biologia Aplicada

Disciplina de Culminação de Estudos II

Relatório do Trabalho de Investigação

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

Autor:

Emídio Fernando Nhavoto

Supervisores:

Msc. Alda Ester Chongo

Doutor Osvaldo Inlamea

Maputo, Setembro de 2024

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pelo dom de vida e por permitir que chegue até essa fase da jornada acadêmica.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Fernando Nhavoto (em memória) e Ana Paula Uamusse pela educação, esforço, ensinamentos e acompanhamento durante a caminhada da vida. Ao meu avô Bernardo Nhavoto por ter acreditado no meu sonho e participado em cada uma das fases da realização do mesmo. A cada um dos meus irmãos, primos e tios pelo amor, cumplicidade e apoio incondicional durante a formação.

Agradeço em especial a Telma, Argentina, Gizela, Pedro, Paulo, Inácio, Juma, Aline, Jéssica, Rassula, John, Plácida, Bibiana, Sádía, Inocêncio e toda equipe da Vigilância de Doenças Emergentes e Re-emergentes (ViDE) do Instituto Nacional de Saúde pela oportunidade de estágio, pelos dados, pelos vossos comentários, pela amizade e pelos ensinamentos e acompanhamento técnico-científico e laboratorial que foram imprescindíveis na realização deste trabalho.

Expresso a minha imensa gratidão aos meus supervisores (Doutor Osvaldo Inlamea e Msc Alda Ester) pela paciência, orientação e pelos ensinamentos técnico-científicos transmitidos durante a realização do presente trabalho.

Agradeço bastante à Universidade Eduardo Mondlane (UEM) pela bolsa de estudos disponibilizada durante o curso e, em especial aos Docentes do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) pela orientação e ferramentas transmitidos durante a minha formação.

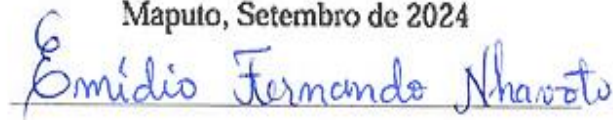
Não me esqueço dos colegas de turma e amigos Edmilson Simango, Kássia Macassa, Nique Nhatsave, Zizina Falé, Pedro Inguane, Dolorte Simbine, Édio Ussivane pelos “debates científicos”, companheirismo e amizade durante a longa caminhada que nos uniu.

À todos que foram mencionados e aos que porventura não foram mencionados e que directa ou indirectamente contribuíram para a concretização desta tese de licenciatura, recebam a minha imensa gratidão. Que nossa jornada continue repleta de aprendizado, crescimento e realizações compartilhadas e que possamos continuar a inspirar uns aos outros.

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Emídio Fernando Nhavoto declaro que este trabalho intitulado “*Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya*”, foi elaborado por mim com base nas fontes bibliográficas citadas ao longo do texto e com base na análise dos resultados obtidos durante a recolha de dados no âmbito da Vigilância de Doenças Emergentes e Re-emergentes. Declaro que esta tese nunca foi apresentada para a obtenção de qualquer grau ou num outro âmbito. Esta tese é apresentada em cumprimento parcial dos requisitos para a obtenção do grau de licenciatura da Universidade Eduardo Mondlane.

Maputo, Setembro de 2024



(Emídio Fernando Nhavoto)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando Moisés Nhavoto (em memória) e Ana Paula Aurélio Uamusse por terem incutido em mim a cada dia o valor dos estudos. Em especial dedico a minha mãe (a mulher que mais admiro) que caminhando sozinha e no meio de todas as certezas e incertezas da vida “moveu até montanhas” para que isso tudo fosse possível. Dedico igualmente a cada um meus irmãos pelo suporte, carinho, apoio e incentivo dado durante a formação. Dedico ainda aos meus avôs (Bernardo Nhavoto e Rosalina Gongolo), por terem aberto a mãos dos seus projectos pessoais para fazer possível a minha formação académica.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus de Chikungunya causa uma doença febril aguda e o seu diagnóstico em Moçambique inclui a detecção de anticorpos específicos pela técnica ELISA. No teste de ELISA, a medida da densidade óptica é um indicador quantitativo da presença da imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). Em amostras positivas para IgM e IgG anti-Chikungunya, os valores de DO_{450nm} variam de positivos fracos à positivos fortes (em relação ao *cut-off*), porém, não se conhece o impacto da variação dos valores de DO_{450nm} na sintomatologia dos participantes. Assim, foi avaliada a influência das densidades ópticas no quadro clínico da infecção do vírus Chikungunya em Moçambique. **Metodologia:** Trata-se de um estudo longitudinal, retrospectivo, com recurso a base de dados do estudo ImmunoCHIKV (2020 – 2021), realizado no centro de saúde de Coalane (Zambézia). Foram analisadas as DO_{450nm} para IgM e IgG anti-Chikungunya em 4 momentos (0, 7, 21 e 60 dias) e sua relação com sinais e sintomas de participantes. A influência das mudanças de DO_{450nm} nos sinais e sintomas foi avaliada usando o teste U de Mann-Whitney, correlação de Spearman e a magnitude do efeito das variáveis significativas foi analisado no modelo de regressão por quantis. **Resultados:** As densidades ópticas dos positivos para IgM em todas as visitas foram baixos [1.1 – 2.5] em relação as densidades ópticas para IgG [2.1 – 4.5] e, quando analisados os sinais e sintomas, houve redução da temperatura axial média de $37 \pm 0.09^\circ C$ para $36.71 \pm 0.11^\circ C$ para IgM e de $37.36 \pm 0.66^\circ C$ para $36.63 \pm 0.92^\circ C$ para IgG ao longo das visitas 1 e 4. Os sintomas comuns nos positivos para Chikungunya na visita 1 foram cefaleia, artralgia, fraqueza, calafrio, mialgia e anorexia, cuja frequência diminuiu ao longo das visitas. Houve uma alteração estatisticamente significativa das DO_{450nm} para IgM em relação aos sintomas cefaleia, dor retro-orbital e dor abdominal ($p < 0.05$) e nenhum sintoma se destacou para IgG ($p > 0.05$), no entanto, no modelo de regressão por quantis a magnitude de efeito desses sintomas na alteração das DO_{450nm} não foi significativo ($p > 0.05$). **Conclusão:** Os sinais e sintomas não foram diretamente influenciados pelas concentrações de IgM e IgG mensurados pelas densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA, no entanto, outros factores podem desempenhar um papel importante na alteração desses valores. **Palavra-Chave:** Imunoglobulina M, Imunoglobulina G, Densidades ópticas, sinais e sintomas, vírus Chikungunya, ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico
AGISA – Agenda de Investigação em Saúde Humana
ARBOMAP – Estudo: Epidemiological, Immunological and Entomological Investigation of Arbovirus in 11 districts in Mozambique
ARN – Ácido ribose nucleico
CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CHIKV – vírus Chikungunya
COVID_19 - Coronavírus Disease 2019/ Doença por Coronavírus 2019
DO_{450nm} – Densidade óptica (comprimento de onda de 450nm)
DENV – vírus Dengue
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EN1 – Estrada Nacional Nr. 1
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN – Interferons
IgM- imunoglobulina M
IgG – Imunoglobulina G
IQR – Amplitude Interquartilico
INE – Instituto Nacional de Estatística
INS – Instituto Nacional de Saúde
MISAU – Ministério de Saúde de Moçambique
NKT – Células T Natural Killers
OCHA – Office for the Coordination of Humanitarian Affairs
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAHO – Pan American Health Organization
PAU – Posto Administrativo Urbano
RT-PCR - Reacção em Cadeia Polimerase por Transcriptase Reversa
PNHs – Primatas não Humanos
PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões
RVFV – Vírus da Febre do vale do Rift
TRLs – Receptores do tipo Toll
ViDE – Vigilância de doenças emergentes e re-emergentes
WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
YFV – vírus da Febre Amarela
ZIKAV – vírus Zika

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

Índice	Pag.
AGRADECIMENTOS	I
DECLARAÇÃO DE HONRA	II
DEDICATÓRIA	III
RESUMO	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	V
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Problema	2
1.2. Justificativa	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Arboviroses	4
2.2. Género Alfavírus: Vírus Chikungunya (CHIKV)	4
2.2.1. Origem de Chikungunya e distribuição	4
2.2.2. Estrutura do vírus Chikungunya	5
2.2.3. Diversidade do vírus Chikungunya (CHIKV)	7
2.2.4. Transmissão de Chikungunya	7
2.2.5. Outras formas de transmissão	8
2.2.6. Epidemiologia do vírus Chikungunya	9
2.3. Fisiopatologia do vírus Chikungunya	11
2.3.1. Imunidade inata do CHIKV	12
2.3.2. Imunidade adaptativa do CHIKV	12
2.3.3. Imunidade mediada por anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV	13
2.4. Principais Sinais e Sintomas de Chikungunya	14
2.5. Diagnóstico do vírus Chikungunya	15
2.5.1. Diagnóstico do CHIKV em Moçambique	16
2.5.2. Densidades Ópticas do teste ELISA e sinais e sintomas	17
3. OBJECTIVOS	19
3.1. Geral:	19
3.2. Específicos:	19
4. HIPÓTESES	20
4.1. Hipótese Nula:	20
4.2. Hipótese alternativa:	20

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

5.	ÁREA DE ESTUDO	21
6.	METODOLOGIA	22
6.1.	Tipo de estudo.....	22
6.2.	Fonte de dados	22
6.3.	População.....	23
6.4.	Tamanho das amostras.....	23
6.5.	Crítérios de inclusão e exclusão dos participantes para o presente estudo	23
6.5.1.	Crítérios de inclusão dos participantes	23
6.5.2.	Crítérios de e exclusão dos participantes.....	24
6.6.	Variáveis de interesse	24
6.7.	Gestão e Análise de dados	24
6.8.	Considerações Éticas	25
7.	RESULTADOS	26
7.1.	Características socio demográficas dos participantes	26
7.2.	Frequência de positividade	26
7.3.	Variação das medidas das DO450 nm para o anticorpo IgM anti-CHIKV	27
7.4.	Variação das medidas de DO450 nm para o anticorpo IgG anti-CHIKV.....	29
7.5.	Sinais e sintomas dos participantes positivos para o anticorpo IgM e IgG anti-Chikungunya ao longo das visitas e relação com DO450nm	30
8.	DISCUSSÃO.....	34
9.	LIMITAÇÕES.....	41
10.	CONCLUSÃO.....	42
11.	RECOMENDAÇÕES.....	43
11.1.	Para a vigilância	43
11.2.	Comunidade científica.....	43
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
13.	ANEXOS	62

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS	Pag.
Figura 1: Origem e distribuição do vírus Chikungunya a nível global.	5
Figura 2: Estrutura do vírus Chikungunya.	6
Figura 3: Representação esquemática do genoma do vírus Chikungunya.....	6
Figura 4: Relações filogenéticas das principais linhagens do vírus chikungunya (CHIKV) baseados em quadros de leitura abertos.....	7
Figura 5: Ciclo de transmissão de Arbovírus.	8
Figura 6: Resumo das etapas da resposta imunológica para o vírus Chikungunya.....	14
Figura 7: Métodos diagnósticos ideais de acordo com o período da infecção por CHIKV.	16
Figura 8: Intervalos de corte referência para determinação dos resultados dos testes IgM e IgG anti-Chikungunya.	17
Figura 9: Ilustração da atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.	18
Figura 10: Localização geográfica do local de estudo.	21
Figura 11: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina M.....	28
Figura 12: Comparação entre densidades ópticas de amostras positivas para a imunoglobulina M anti-CHIKV nas diferentes visitas.....	28
Figura 13: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina G.	29
Figura 14: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina G	30
Figura 15: Frequência dos sintomas em participantes positivos ao IgM anti-Chikungunya durante as 4 visitas.....	31
Figura 16: Frequência dos sintomas em participantes positivos ao IgG anti-Chikungunya durante as 4 visitas.....	34

TABELAS

Tabela 1: Dados da vigilância sentinela de Chikungunya do INS.	10
Tabela 2: Características Sociodemográficas dos participantes recrutados e positividade para o anticorpo IgM e IgG anti-Chikungunya	27
Tabela 3: Influência dos sintomas nas medidas de densidades ópticas nos quartis 25%, 50% e 75% (Análise Regressão quantílica Univariada – Modelo não ajustado).	32
Tabela 4: Influência dos sintomas nas medidas de densidades ópticas nos quartis 25%, 50% e 75% (Análise Regressão quantílica multivariada – Modelo ajustado).....	33
Tabela 5: Relação entre sinais e sintomas com as medidas das densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA IgM anti-Chikungunya vírus	62
Tabela 6: Relação entre sinais e sintomas com as medidas das densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA IgG anti-Chikungunya vírus	64
Tabela 7: Matriz de recolha de dados para o presente estudo	66

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças febris causadas por vírus transmitidos por vectores normalmente artrópodes (arbovírus) como mosquitos, caracças e pulgas (CDC, 2022). A crescente emergência e reemergência dessas doenças constituem um grande problema de saúde pública a nível global, dada a capacidade dos vetores em transmitir agentes infecciosos virais causadores de algumas das doenças infecciosas mais significativas que emergem no mundo (Paixão *et al.*, 2017; Carrillo-Hernández *et al.*, 2018).

Em África, febres de etiologia desconhecida são comuns e este grupo inclui as infecções por arbovírus (Adam e Jassoy, 2021). Pouco se sabe sobre a prevalência de infecções por arbovírus humanos devido a fraca capacidade diagnóstica e a falta de sistemas de vigilância epidemiológica bem estabelecidos para doenças febris (Agboli *et al.*, 2022).

Vários arbovírus são descritos clinicamente e epidemiologicamente importantes em África, causando surtos epidémicos e alguns de forma endémica em muitos países africanos e, dentre as mais comuns consta o vírus da dengue (DENV), o vírus Chikungunya (CHIKV), o vírus Zika (ZIKV), o vírus da Febre Amarela (YFV) e o vírus da Febre do Vale de Rift (RVFV), entre outros (Leta *et al.*, 2018), caracterizadas pelo rápido aumento da frequência de ocorrência do vírus em diversas regiões geográficas, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (Merle *et al.*, 2018).

Evidências entomológicas têm demonstrado que as fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são os principais vectores que simultaneamente são capazes transmitir DENV, CHIKV, ZIKV e YFV em humanos no sector urbano (Guiérrez-Bugallo, *et al.*, 2020; Sánchez-Arcila *et al.*, 2020). Em Moçambique a espécie *Aedes aegypti* está presente em todo o território nacional (Abílio *et al.*, 2018) e, a sua presença em uma região pode evidenciar uma cocirculação silenciosa de arbovírus nessa região (Muianga *et al.*, 2018; Guiérrez-Bugallo, *et al.*, 2020).

Associados a isso, já foram registados em Moçambique casos de Dengue e Chikungunya em diferentes períodos epidemiológicos demonstrando assim a endemicidade destas doenças (António *et al.*, 2018; Muianga *et al.*, 2018; Mugabe *et al.*, 2018; António *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2022; Mugabe *et al.*, 2023), o que ressalva a importância de fortalecimento da vigilância destes patógenos e o entendimento de uma possível cocirculação com outras arboviroses em Moçambique.

O CHIKV causa uma série de complicações na saúde do participante infectado, que podem variar de sinais leves a graves, que geralmente são inespecíficos (comuns com outras arbovirose): febre, dor de cabeça, artralgia e erupção cutânea, até sintomas raros e específicos como o caso de artralgias graves e incapacitantes (Merle *et al.*, 2018).

Existem vários métodos de diagnóstico do CHIKV, mas geralmente é por meio da combinação do diagnóstico clínico, através de sinais e sintomas do participante e, laboratorial por meio de testes sorológicos imunoenzimático, moleculares e isolamento viral (Kabir *et al.*, 2021; PAHO, 2023). No entanto, uma das vantagens dos testes sorológicos imunoenzimáticos é (1) serem mais acessíveis em África, (2) não requererem uma infraestrutura complexa e nem técnicos especializados e (3) a possibilidade de uma ampla janela de diagnóstico desde a data do início dos sintomas (Kabir *et al.*, 2021).

Em Moçambique, o diagnóstico tem sido essencialmente por métodos sorológico, especificamente pelo teste de diagnóstico imunoenzimático ELISA. Os testes de diagnóstico ELISA, capturam os anticorpos específicos IgM e IgG como resposta imunológica do organismo a infecção pelo vírus ou a detecção do antígeno – uma proteína estrutural do vírus (Mugabe *et al.*, 2018; Kabir *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2022).

Os resultados da infecção por vírus Chikungunya pelo teste imunoenzimático ELISA comerciais são expressos pelo cálculo de densidades ópticas (DO_{450nm}) de cada anticorpo – uma medida quantitativa do espectrofotômetro que indica a concentração dos anticorpos, onde dependendo do intervalo de valores de corte (*cut-off*) referenciados pelo fabricante, as amostras são consideradas negativas, indeterminadas e ou positivas para cada anticorpo anti-IgM ou anti-IgG (Skoog *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2016).

1.1. Problema

O Instituto Nacional de Saúde, tem estado a gerar evidências da existência de CHIKV e outros arbovírus através de diversas pesquisas no âmbito do sistema de vigilância sentinela instalado (ViDE – Vigilância de Doenças (Re)Emergentes). Através desta, ocorrência de Chikungunya, co-ocorrência e coinfeções com outros arbovírus é evidenciada por meio de testes de diagnóstico imunoenzimático ELISA comerciais (Oludele *et al.*, 2017; Mugabe *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2022; Mugabe *et al.*, 2023).

A partir desses testes é verificado laboratorialmente que os valores das DO_{450nm} de amostras testadas positivas por ELISA variam, sendo alguns fracos positivos (próximo

ao *cut-off*) e outros fortes positivos (distantes do *cut-off*). Apesar disso, os valores das DO_{450nm} resultantes das corridas laboratoriais, são usados apenas para definir o resultado da testagem da amostra de forma qualitativa em negativo, indeterminado e positivo.

De forma equivocada, tem-se associado as alterações das medidas de DO_{450nm} com severidade da doença em termos de sinais e sintomas. Portanto, não se sabe qual é (1) o significado biológico das diferenças de DO_{450nm} entre participantes com resultados IgM e IgG positivos (2) o padrão de evolução das DO_{450nm} em amostras positivas ao longo do tempo e, (3) o que realmente a diferença dessas medidas revela quando associados aos sinais e sintomas dos participantes em específico para Moçambique. Por isso surge a seguinte questão de pesquisa: *“Será que existe alguma relação entre os valores das DO_{450nm} do teste imunoenzimático ELISA com os sinais e sintomas do participante ao longo do tempo?”*

1.2. Justificativa

Autores como Chatterjee *et al.*, (2016), Jain *et al.*, (2020), Lima *et al.*, (2021), e outros já analisaram as DO_{450nm} e mostraram-se importantes para o diagnóstico de arbovírus, porém, poucos analisam o estado sorológico do participante, o nível de DO_{450nm} e a sua relação com quadro clínico do participante. Até onde se sabe, este estudo é único que descreve em detalhes a evolução sorológica e clínica de participantes ambulatoriais com Chikungunya em Moçambique e, para além disso, o acompanhamento clínico dos participantes foi realizado por 2 meses em participantes suspeitos para Chikungunya.

Resultados deste estudo irão fortalecer ainda mais (1) os conhecimentos sobre as DO_{450nm} em Moçambique e sua aplicabilidade em participantes com Chikungunya, (2) melhorar a interpretação de resultados do teste de diagnóstico por ELISA para Chikungunya pelos clínicos. Para além disso, poderão evidenciar a (3) duração e intensidade da resposta imunológica mediante a análise da quantidade de imunoglobulinas/ anticorpos IgM e IgG e, (4) os sinais e sintomas associados a cada estágio da doença.

Portanto, a presente pesquisa visa buscar ao detalhe o significado biológico das DO_{450nm} dos participantes testados por ELISA para os vírus Chikungunya em um país com evidências de circulação de arboviroses. Esse estudo enquadra-se como prioridade na Agenda de Investigação em Saúde Humana (AGISA) (2024 - 2028) em vigor em Moçambique na medida em que visa melhorar a interpretação das ferramentas de diagnóstico em pesquisas na área de doenças emergentes, re-emergentes e negligenciadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Arboviroses

Arboviroses referem-se a doenças causadas por vírus transmitidos biologicamente por artrópodes (arbovírus). Essa transmissão ocorre entre hospedeiros vertebrados e é conduzida por vectores artrópodes hematófagos (alimentadores de sangue) como mosquitos, carrapatos, flebotomíneos e moscas picadoras (Alonso-Palomares *et al.*, 2018). Até o momento, mais de 500 arbovírus foram categorizados, dos quais quase 100 causam doenças em humanos e outros restantes em animais domésticos e selvagens, causando um grande impacto na saúde pública (Alonso-Palomares *et al.*, 2018).

Os arbovírus incluem uma ampla variedade de vírus de ARN que podem ser classificados de acordo com as relações antigênicas, morfologia e mecanismos replicativos (Harapan *et al.*, 2020), em: alfavírus (família *Togaviridae*); os flavivírus (*Flaviviridae*); os bunyavírus (*Bunyaviridae*), nairovírus (*Bunyaviridae*) e flebovírus (*Bunyaviridae*); os orbivírus (*Reoviridae*); os vesiculovírus (*Rhabdoviridae*) e os thogotovírus (*Orthomyxoviridae*) (Weaver e Reisen, 2010; Harapan *et al.*, 2020).

Desses, os vírus dos géneros *Flavivirus* e *Alfavírus* são mais importantes, sobretudo nas regiões de clima tropical e subtropical (do qual Moçambique faz parte), conferindo rol de enfermidades e ameaças a saúde humana e animal dessas regiões (da Silva, 2019; Harapan *et al.*, 2020). No presente estudo, o foco é com o vírus CHIKV, um Alfavírus.

2.2.Género Alfavírus: Vírus Chikungunya (CHIKV)

2.2.1. Origem de Chikungunya e distribuição

O nome “Chikungunya” deriva do dialeto Makonde (África), que significa “*aquilo que se dobra*”, derivado da raiz do verbo “*kungunyala*” – secar ou ficar contorcido (Lumsden, 1955). Na região norte de Moçambique, uma descrição de uma doença com as mesmas características clínicas até aos anos 90, era reconhecido como “*Chingwingwinda*”, palavra que deriva de *gingwindar*, que significa “*dobrar para cima*” para descrever a flexão articular característica da doença (Gudo *et al.*, 2016).

A sua origem não é bem conhecida, algumas evidências revelam a sua origem na África (1952) e na Ásia (1958 – 1960) (Khongwichit *et al.*, 2021). Porém, um estudo mais abrangente de cepas históricas de CHIKV indicou que o vírus se originou na África e se espalhou para a Ásia em intervalos de aproximadamente 50 anos (fig.1) (Zeller *et al.*, 2016).

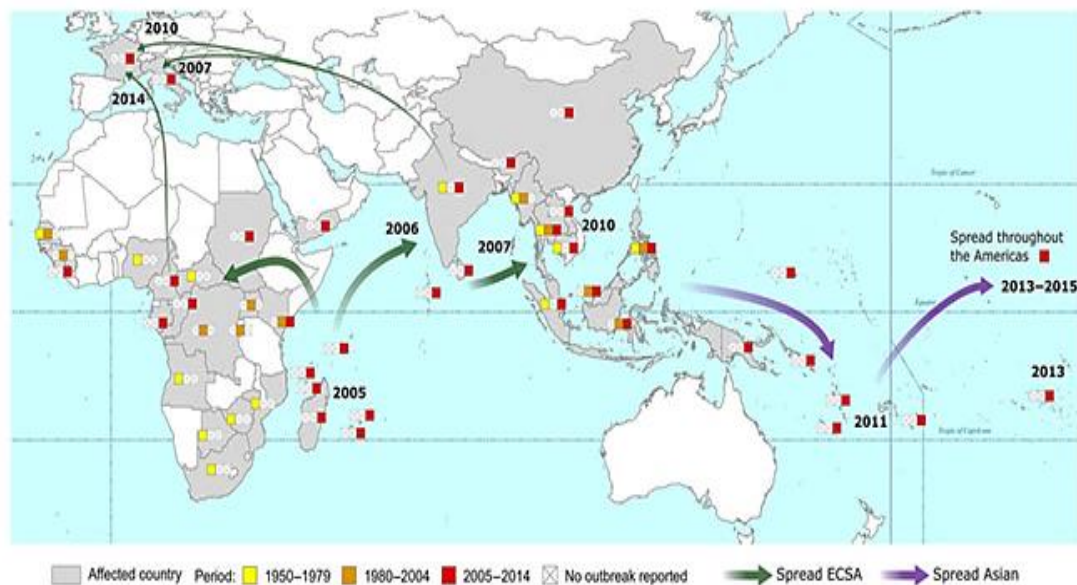


Figura 1: Origem e distribuição do vírus Chikungunya a nível global. **Fonte:** Zeller *et al.*, (2016).

O CHIKV foi isolado pela primeira vez na África Oriental em 1952/53 durante uma epidemia da doença não fatal semelhante à dengue que se desenvolveu ao longo da fronteira entre a Tanzânia e Moçambique (Paixão *et al.*, 2017; Majumdar e Jana, 2022). Tudo indica que esse vírus escapou de um complexo ciclo zoonótico africano para um ciclo urbano em intervalos de 40 a 50 anos desde 1823, causando grandes epidemias em todo o mundo (Paixão *et al.*, 2017).

A reconstrução histórica revela que durante anos os surtos de CHIK ocorreram nas Índias Ocidentais, estados do sul dos Estados Unidos em 1827-1828, mas eram confundidos com surtos de dengue antes do advento das técnicas confirmatórias baseadas em laboratório (Kuno, 2015). Dados médicos dessa época na sua maioria indicavam uma doença com artralgia muito grave, muito antes do isolamento do vírus na Tanzânia, o que sugere que o vírus já existia circulando em várias regiões do Mundo, inclusive em Moçambique só não era distinguido como Chikungunya (Kuno, 2015; Gudo *et al.*, 2016).

2.2.2. Estrutura do vírus Chikungunya

O Vírus de Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus, membro da família *Togaviridae*, pequeno (cerca de 60-70 nm de diâmetro), esférico, envelopado, com o genoma de fita simples (ARN) de cadeia positiva (fig. 2) (Owolabi *et al.*, 2016; da Silva, 2019).

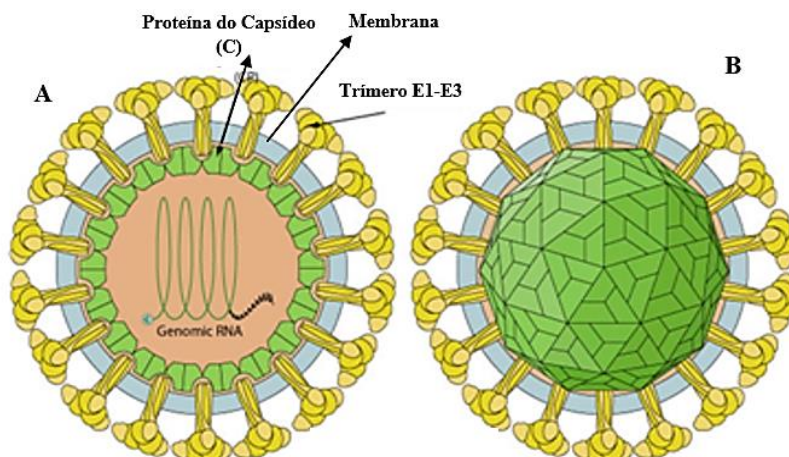


Figura 2: Estrutura do vírus Chikungunya: **A** – representação esquemática de um corte transversal do vírus; **B** – estrutura da superfície tridimensional do vírus. **Fonte:** [<https://viralzone.expasy.org/625>]

O genoma do vírus tem aproximadamente 11.805 nucleotídeos de comprimento e, está disposto em dois quadros de leitura abertos (*Open Reading Framework*) de 7.424 e 3.732 nucleotídeos, separados um do outro por uma pequena região não codificante (J) de 76 nucleotídeos (fig.3) (da Silva, 2019; Calvo *et al.*, 2021). O primeiro quadro de leitura aberta codifica uma poliproteína de 2.424 aminoácidos, da qual são liberadas quatro (4) proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que direcionam a replicação do genoma. O segundo quadro de leitura aberta codifica uma poliproteína de 1.244 aminoácidos, da qual são liberadas seis (6) proteínas estruturais (Capsídeo [C]; proteínas do envelope E3, E2, 6K, E1 e proteínas transframe [TF]) (fig.3) (Owolabi *et al.*, 2016; Calvo *et al.*, 2021; Khongwichit *et al.*, 2021).

As proteínas não estruturais, são importantes na multiplicação e montagem de novas partículas virais. E, as proteínas estruturais medeiam a entrada, permanência e liberação da progênie do vírus na célula do hospedeiro (Calvo *et al.*, 2021).

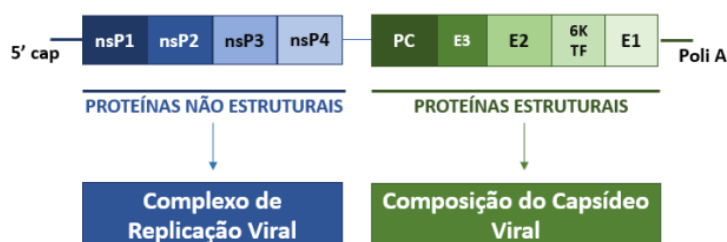


Figura 3: Representação esquemática do genoma do vírus Chikungunya. **Fonte:** da Silva (2019).

2.2.3. Diversidade do vírus Chikungunya (CHIKV)

A partir das análises filogenéticas realizadas de forma parcial com o gene E1 ou com o genoma completo do vírus Chikungunya, foram identificadas três principais linhagens que foram nomeados de acordo com sua origem geográfica (fig.4): (1) África Oriental/Central/Sul (ECSA), que corresponde o primeiro vírus isolado na Tanzânia em 1952; (2) linhagem Asiática, encontrado na Tailândia em 1960 e durante essa década em países como Vietnã, Camboja, Filipinas e no subcontinente indiano e, (3) África Ocidental, isolado na Nigéria em 1969, posteriormente, no Senegal e na Costa de Marfim; (Langsjoen *et al.*, 2018; Khongwichit *et al.*, 2021; Hakim *et al.*, 2022).

Além disso, são relatadas também duas principais sublinhagens dos vírus Chikungunya, destacando (1) a sublinhagem do Oceano Índico (IOL ou ECSA-IOL) é uma evolução da linhagem ECSA do vírus e (2) a sublinhagem Asiática/Americana surgiu dentro do clado Asiático (fig. 4) (Langsjoen *et al.*, 2018; Khongwichit *et al.*, 2021).

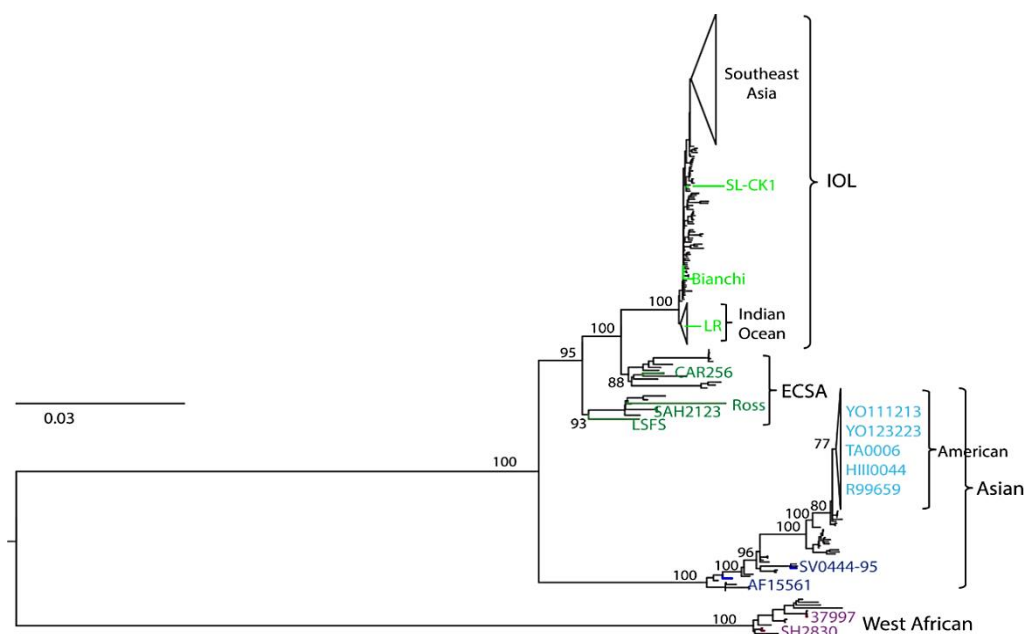


Figura 4: Relações filogenéticas das principais linhagens do vírus chikungunya (CHIKV) baseados em quadros de leitura abertos. **Fonte:** Langsjoen *et al.*, (2018).

2.2.4. Transmissão de Chikungunya

A principal forma de transmissão dos vírus Chikungunya e a maioria das arboviroses é feita principalmente pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes*, um vector com maquinaria fisiológica que permite ser infectado pelo vírus, replicar no seu interior e transmitir o vírus através da saliva para o hospedeiro (Harapan *et al.*, 2020).

A transmissão ocorre em dois diferentes ciclos: ciclo silvestre e urbano (fig.5). O ciclo urbano, refere-se a transmissão entre humanos e mosquitos, enquanto o ciclo silvestre é a transmissão entre animais vertebrados selvagens, primatas não humanos (PNHs) e mosquitos (Harapan *et al.*, 2020; Hakim *et al.*, 2022).

A transmissão urbana em vários países tem como vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, enquanto a transmissão silvestre ocorre em ambientes selvagens no sudeste da Ásia e Este de África, sendo os principais vetores *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. Taylori* (fig.5) (Harapan *et al.*, 2020; Hakim *et al.*, 2022).

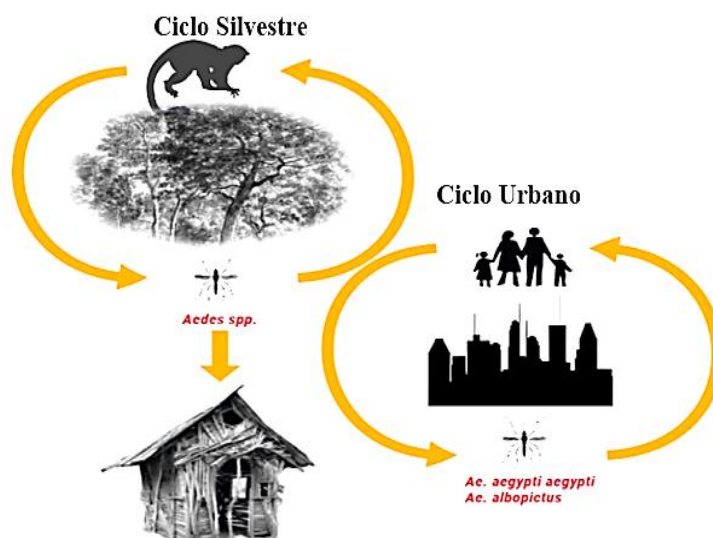


Figura 5: Ciclo de transmissão de Arbovírus **Fonte:** Hakim *et al.*, (2022).

Em Moçambique, evidências entomológicas indicam a circulação das espécies *Aedes aegypti* (larvas e adultos) em todo território nacional e *Aedes albopictus* de forma limitada, evidenciando a transmissão e co-transmissão de arbovirose no país (Abílio *et al.*, 2018; Neto *et al.*, 2022).

Do princípio, os arbovírus utilizam hospedeiros animais para amplificação e vetores artrópodes para transmissão, mas, ocasionalmente escapam (por acidente) e se espalham para humanos ou animais domésticos, onde podem causar doenças, sobretudo em regiões onde a população vive perto de florestas (Harapan *et al.*, 2020; Hakim *et al.*, 2022).

2.2.5. Outras formas de transmissão

Outras formas de transmissão não frequentes é a transmissão não vectorial, durante a transfusão sanguínea, transplante de órgãos humanos de indivíduos virêmicos e ainda tem se reportado a transmissão intrauterina (Harapan *et al.*, 2020).

2.2.6. Epidemiologia do vírus Chikungunya

A situação global do vírus Chikungunya e outros arbovírus é desconhecida devido a limitações nos dados sobre surtos da doença, falta de padronização nos procedimentos de estudo, subnotificação de casos de Chikungunya misturados com outras doenças febris, desigualdade na capacidade de diagnóstico entre países, falta de clareza na definição de surtos, e sistemas de vigilância que só detectam casos sintomáticos atendidos clinicamente, sem incluir casos comunitários não atendidos (Bettis *et al.*, 2020).

Em África, a capacidade de detecção, identificação, monitoria e notificação de arboviroses é limitada e, por conta disso, pouco se sabe sobre a situação epidemiológica do CHIKV e outros arbovírus (Gainor *et al.*, 2022). Apesar disso, já foram registados vários surtos causados pelo CHIKV em diversos pontos de África, como Maiote (2005 – 2006), Gabão (2005 – 2006), Ilhas da Reunião (2005 – 2006), Camarão (2006), Madagascar (2006), Senegal (2009), Sierra Leone (2012 – 2013), Sudão (2015), República Democrática de Congo (1999, 2011 e 2019) e Etiópia (2019) e ambos associados ao genótipo ou linhagem ECSA (Bettis *et al.*, 2020).

Moçambique em específico, também enfrenta desafios no diagnóstico de arbovírus, incluindo a falta de políticas e estratégias nacionais voltadas para essas doenças, contribuindo para a negligência em casos de Síndrome febril (Gudo *et al.*, 2018; WHO, 2022). Como resultado, a carga de Chikungunya e outros arbovírus e seu impacto epidemiológico são desconhecidos no país, levando à subnotificação e tratamento inadequado em outras doenças febris (Gudo *et al.*, 2018). Além disso, um outro desafio observado em Moçambique é a alta taxa de perda de participantes para consultas de acompanhamento, o que limita o conhecimento sobre as reais causas da febre e o comportamento da infecção pelo CHIKV ao longo do tempo, já que os participantes febris agudos raramente retornam para consultas de convalescença (Gudo *et al.*, 2015).

Apesar disso, evidências sorológicas sobre o vírus Chikungunya em Moçambique, revelam uma ocorrência contínua de infecções causadas pelo vírus Chikungunya em participantes com febre aguda desde 2013 (tabela 1), co-ocorrência e coinfeção com outros arbovírus (Dengue e Zika), malária e leptospirose, destacando a necessidade de uma vigilância continua dessas doenças (António *et al.*, 2018; António *et al.*, 2019; Mugabe *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2022; Mugabe *et al.*, 2023).

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

As infecções pelo vírus Chikungunya ocorrem em todas as faixas etárias, sexo e em todas regiões (norte, centro e sul), com maior expressão nas zonas centro e norte do país onde verifica-se maior ocorrência de arboviroses no geral (tabela 1) (António *et al.*, 2018; Mugabe *et al.*, 2018; António *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2022; Mugabe *et al.*, 2023).

Tabela 1: Dados da vigilância sentinela de Chikungunya do INS.

Fonte	Origem da amostra	Período de estudo	Região	IgM+ (%)	IgG+ (%)
Mugabe <i>et al.</i> , 2023	Investigação de surto	2019	Norte, Centro	14.1% (43/305)	-
Ali <i>et al.</i> , 2022	Vigilância sentinela	Jan 2017 a Dez 2018	Norte, Centro e Sul	14.8% (134/906)	-
Mugabe <i>et al.</i> , 2018	Investigação de surto	Fev a Jun 2016	Centro	10.4% (17/163)	63.2% (103/163)
Antonio <i>et al.</i> , 2018	Investigação serológica	Março 2015 – Maio 2016	Centro e Norte	1.5% (6/392)	28.6% (112/392)
Antonio <i>et al.</i> , 2019	Investigação serológica	2009 – 2015	Norte, Centro e Sul	6% (54/895)	17.9% (160/895)
Muianga <i>et al.</i> , 2018	Investigação de surto	Mar a Abr 2014	Norte	7% (8/114)	31.5% (46/146)
Gudo <i>et al.</i> , 2015	Investigação serológica	Janeiro a Setembro 2013	Sul	-	24.4% (38/156)

2.2.7. Factores que influenciam a ocorrência e distribuição do CHIKV

A ocorrência e distribuição dos arbovírus é atribuída a uma combinação de uma série de factores, principalmente:

- **Factores socio-demográficos:** o aumento da urbanização e viagens globais que são responsáveis pela transferência de virêmicos de uma área endémica de arbovírus para uma área não endémica (Robert *et al.*, 2022; Ngouanet *et al.*, 2022).
- **Factores ambientais:** o aumento da temperatura global, mudanças nos padrões de precipitação e ocorrência de eventos extremos climáticos, são responsáveis pelo surgimento, distribuição e abundância dos vectores competentes para transmissão de CHIKV e outros arbovírus em regiões que não havia ocorrência dos mesmos (Leta *et al.*, 2018; Jing *et al.*, 2019; Giesen *et al.*, 2022)
- **Factor biológico:** Ocorrência do vector transmissor do vírus Chikungunya e do vírus Chikungunya na região (Ngouanet *et al.*, 2022).

A nível global, vários países combinam a existência do vector, condições climáticas e ambientais ideais para ocorrência de arbovírus que variam consideravelmente entre os países (Leta *et al.*, 2018). Os países de África Subsaariana, sofrem bastante por mudanças climáticas (Giesen *et al.*, 2022) e apresentam maior risco de vectores estejam infectados e com capacidade de causar surtos comparativamente outros países (Leta *et al.*, 2018).

Moçambique em específico combina a existência de (1) condições climáticas e ambientais ideais para ocorrência e reprodução do vector transmissor de arbovírus no território nacional, (2) presença do vector transmissor (Abílio *et al.*, 2018), (3) desastres relacionados a mudanças climáticas e deslocamento populacional como por exemplo – eventos extremos climáticos como cheias e ciclones (Mugabe *et al.*, 2021; Muleia *et al.*, 2024), e (4) viagens internacionais para negócios e ou a busca de graus académicos.

2.3.Fisiopatologia do vírus Chikungunya

Após a transmissão, o CHIKV entra na pele, infecta e se replica em células locais, como fibroblastos, macrófagos e células epiteliais (Schwartz e Albert, 2010). A entrada do vírus na célula do hospedeiro é por endocitose, mediada por um receptor desconhecido, que resulta na fusão da membrana da célula do hospedeiro com o vírus causando a liberação do nucleocapsídeo contendo o genoma viral (Lum e Ng, 2015).

Após isso, subsequentes eventos são desencadeados a nível do citoplasma e do aparelho de golgi que permitem a replicação do genoma viral, montagem do capsídeo, heterodimerização e maturação do virião (Lum e Ng, 2015). Subsequentemente, os viriões são transportados pelo sistema linfático para os órgãos linfoides secundários, onde continuam a replicar-se nas células migratórias e a espalhar-se para o sistema sanguíneo, onde o CHIKV pode disseminar-se e infectar células-alvo do fígado, músculos, articulações e o cérebro (Silva e Dermody, 2017; Taylor e Rayner, 2023).

A infecção viral é caracterizada por um período de incubação seguido pela fase aguda durante a qual ocorre um rápido aumento da viremia que geralmente dura de 4 a 6 dias após o início de sintomas (Vairo *et al.*, 2019). Na fase de viremia, é caracterizado pelo aparecimento sintomas clínicos como dores nas articulações, febre, erupção cutânea maculopapular e petequial. A medida que a carga viral aumenta, as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro também são desencadeadas para eliminar o vírus do organismo e assim recuperar da infecção (Srivastava *et al.*, 2020).

2.3.1. Imunidade inata do CHIKV

A resposta imune inata contra CHIKV em uma infecção aguda consiste na activação e infiltração de monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), células T natural killer (NKTs) e elaboração de substâncias antivirais e moléculas pró-inflamatórias (citocinas, quimiocinas) (Silva e Dermody, 2017; Tanabe *et al.*, 2018; Poh *et al.*, 2020).

Inicia na fase aguda da doença (2 – 4 dias de infecção) e, é marcada pelo reconhecimento do vírus por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) geralmente conhecidas como receptores do tipo Toll (TRLs), das células da imunidade inata (Her *et al.*, 2015). Esse reconhecimento, é responsável pela secreção de sinais pró-inflamatório nas articulações (citocinas e quimiocinas) que potencializam a quimio-atração de outras células imunitárias para o local da infecção (Poh *et al.*, 2020)

Um dos grupos de citocinas mais produzidas nesta fase é o interferon tipo I (IFNs), especialmente IFN- α e IFN- β (fig.6), que desencadeiam vias de sinalização que estimulam a expressão de centenas de genes envolvidos na síntese de múltiplas proteínas antivirais (Schwartz e Albert, 2010). Para além disso, são também responsáveis pela activação das células da imunidade inata como os macrófagos e células NKTs, que fagocitam partículas virais no organismo e destroem células infectadas pelo CHIKV, potencializando a resposta imunológica (Schwartz e Albert, 2010).

2.3.2. Imunidade adaptativa do CHIKV

A resposta imune adaptativa é mediada por linfócitos B e T e geração subsequente de células de memória que levam a uma resposta específica à infecção viral que protege contra reinfeção (Tanabe *et al.*, 2018). Inicia em um período de aproximadamente uma semana após a infecção, com apresentação de epítomos virais aos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nos órgãos linfoides pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) da imunidade inata (células dendríticas) (Poh *et al.*, 2020).

Os linfócitos TCD4⁺ específicas do CHIKV são o principal mediador da inflamação durante a patogénese da infecção por CHIKV e da activação de células B, causando inchaços nas articulações (Teo *et al.*, 2013). A sua actividade é regulada pelas células T-reguladoras, que aquando da sua interação com APCs, suprime a acção das células TCD4⁻ específicas do CHIKV e vice-versa (Poh *et al.*, 2020).

Por outro lado, as células T CD8⁺ (designadas de células T citotóxicas) tem como principal função induzir a morte celular em células infectadas por CHIKV através da indução de lise celular para controlar a replicação viral na fase inicial da infecção (Teo *et al.*, 2013). Os linfócitos T CD8⁺ desencadeiam uma resposta antiviral precoce citotóxica para controlar a replicação do vírus, seguida de uma mudança para respostas de células T CD4⁺ para facilitar a produção de anticorpos neutralizantes pelas células B (Teo *et al.*, 2013).

Após a apresentação dos antígenos as células TCD4⁺ e TCD8⁺ pelas APCs, verifica-se um aumento da proliferação e migração das células TCD4⁺ e TCD8⁺ para as articulações inchadas e, contribuem para a inflamação através da secreção de IFN- γ . Fora isso, as células TCD4⁺ e TCD8⁺ específicas do CHIKV podem reconhecer as células endoteliais infectadas no local da infecção, levando à ruptura da barreira e agravando o inchaço das articulações (Poh *et al.*, 2020).

2.3.3. Imunidade mediada por anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV

Inicia com a activação dos linfócitos B pelas células TCD4⁺. Uma vez activados, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos – uma célula com maquinaria suficiente para a produção de anticorpos específicos anti-CHIKV, principalmente IgM e IgG, para neutralizar o vírus e facilitar sua eliminação no hospedeiro (Srivastava *et al.*, 2020).

Os anticorpos IgM são produzidos na fase da viremia, geralmente nos primeiros dias de início de sinais e sintomas após a infecção pelo CHIKV e representam a fase aguda de infecção por CHIKV e pode persistir por 2 – 3 meses (Srivastava *et al.*, 2020), embora que outros estudos demonstram uma persistência do anticorpo IgM contra o vírus por mais tempo (10 meses ou mais) (Chelluboina *et al.*, 2019). O anticorpo IgG é produzido no final da infecção, representa a fase convalescente da infecção pelo CHIKV, é produzido geralmente após a eliminação do vírus e pode persistir no organismo por meses a anos (Srivastava *et al.*, 2020).

Os anticorpos IgM e IgG reconhecem três (3) proteínas estruturais (proteína do capsídeo e glicoproteínas E2 e E3) e uma proteína não estrutural (nsP3) como epítomos lineares para ligação com vírus Chikungunya para desencadearem a sua actividade de neutralização contra o CHIKV. No entanto, a glicoproteína E2 é o principal alvo da resposta de anticorpos anti-CHIKV durante todo o curso da doença (desde a fase de convalescença até a fase de recuperação) (Kam *et al.*, 2012).

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

Todas as etapas da imunidade contra o vírus Chikungunya desde a infecção ou inoculação do material viral, a resposta imunológica do organismo até a eliminação do vírus no hospedeiro, encontram-se resumidas na figura abaixo (fig.6).

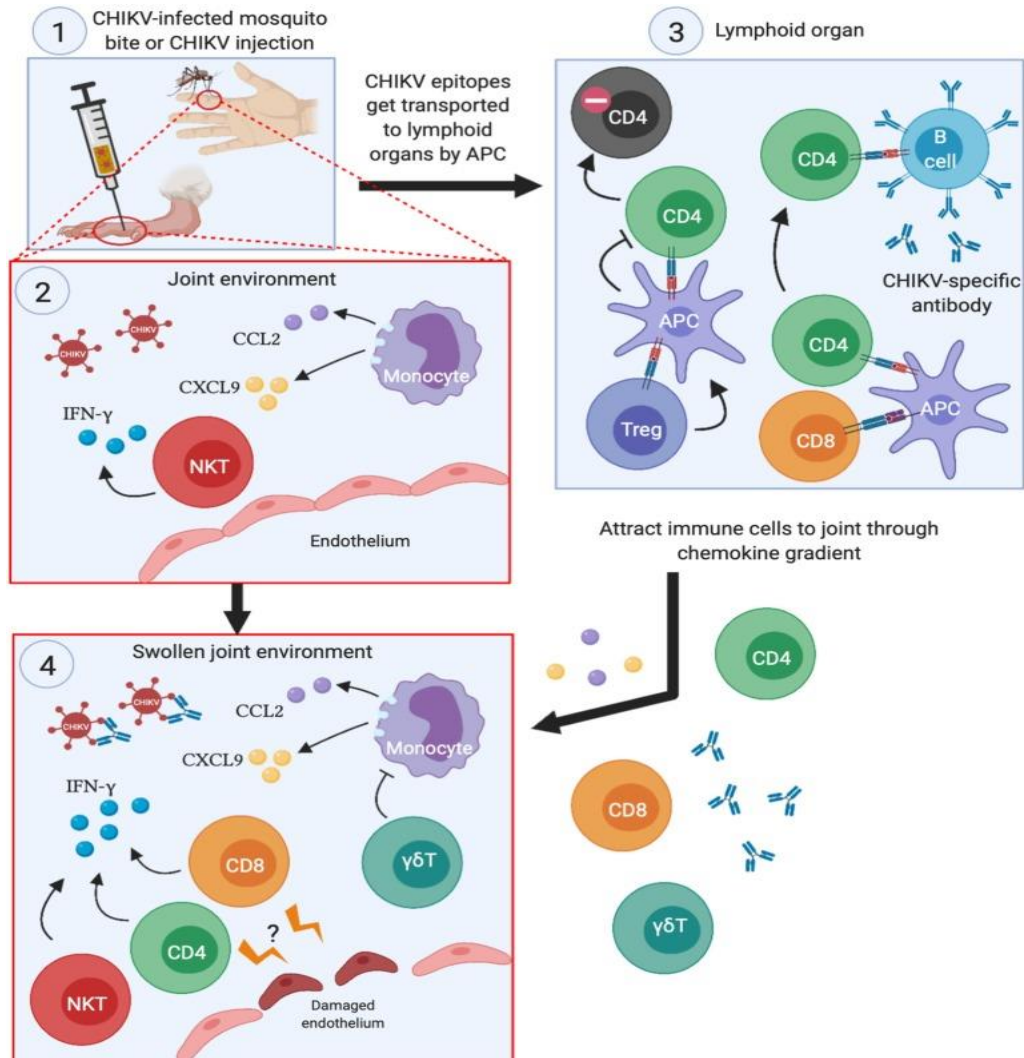


Figura 6: Resumo das etapas da resposta imunológica para o vírus Chikungunya. **Fonte:** Poh *et al.*, (2020).

2.4.Principais Sinais e Sintomas de Chikungunya

Uma boa parte dos participantes infectados por Chikungunya desenvolvem sintomas e na sua maioria estão associados a altos títulos de viremia durante a fase aguda de infecção por CHIKV, porém, 3 – 28% dos participantes podem permanecer participantes assintomáticos (Appassakij *et al.*, 2013; Staples *et al.*, 2023; Sagar *et al.*, 2024).

Os sinais e sintomas evoluem em 3 principais fases: fase aguda, pós-aguda e crônica e a evolução de uma fase para outra depende organismo para organismo (Simon *et al.*, 2015):

- **Na fase aguda** (uma semana de início de sintomas), a febre é um dos primeiros sinais da infecção por Chikungunya, geralmente acompanhada por dores nas articulações (atralgia) que podem ser bastante intensas (Merle *et al.*, 2018). Outros sintomas comuns incluem cefaleia, astenia, erupção cutânea, artrite, mialgia, náuseas e calafrios (Gudo *et al.*, 2018; WHO, 2022). Nesta fase, os sintomas são inespecíficos, geralmente se sobrepõe com outras infecções, incluindo aquelas causadas por outros arbovírus (zika e dengue), limitando o diagnóstico clínico da infecção por Chikungunya (Gudo *et al.*, 2018; WHO, 2022).
- **Na fase pós-aguda**, que dura até cerca de três meses após o início dos sintomas, persistem manifestações como dores articulares e artrite (inflamação). Esses sintomas podem diminuir gradualmente, mas podem ocorrer surtos inflamatórios, especialmente em resposta ao frio. Muitas vezes pode haver fraqueza intensa na fase pós-aguda, bem como alterações neuropsicológicas, principalmente quando a dor é intensa (Simon *et al.*, 2015).
- **Na fase crônica**, que começa por volta do quarto mês, é caracterizada pela persistência de sintomas como dores articulares e artrite, geralmente induzido pela persistência do CHIKV no organismo em locais como células endoteliais no fígado e outros órgãos, células mononucleares no baço, macrófagos no líquido sinovial e tecidos circundantes e células satélites no músculo (Genderen *et al.*, 2016 e Silva e Dermody, 2017). Pode haver recorrência de dores nas articulações mais utilizadas. A evolução dos sintomas da doença pode variar de paciente para paciente, com alguns pacientes se recuperando sem sequelas, enquanto para outros os sintomas são persistentes e podem piorar ao longo do tempo, resultando em inflamação ou degeneração das articulações resultando na curvatura que caracteriza a doença (Simon *et al.*, 2015).

2.5. Diagnóstico do vírus Chikungunya

Para o diagnóstico dos arbovírus existem três (3) principais métodos de diagnósticos: Isolamento do vírus, detecção do RNA viral por Reacção em Cadeia Polimerase por Transcriptase Reversa – RT-PCR (Vairo *et al.*, 2019; Kabir *et al.*, 2021; PAHO, 2023) e métodos sorológico que incluem o Ensaio imunoenzimático de captura de anticorpo (ELISA) e teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT) para determinação das imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG) anti-Chikungunya (PAHO, 2017; Kabir *et al.*, 2021).

O uso de cada método é condicionado aos dias do início de sintomas após a picada do mosquito infectado pelo vírus Chikungunya (fig. 7) (Tanabe *et al.*, 2018; Vairo *et al.*, 2019). O isolamento viral, pode ser feito até ao terceiro dia (PAHO, 2017), a RT-PCR pode detectar o vírus durante a primeira semana da doença, mas, com maior rendimento até o 5º dia de sintomatologia e, os testes sorológicos são ideais a partir de 4 dias do início sinais e sintomas e seu desempenho aumenta com os dias de sintomas (Tanabe *et al.*, 2018; De Weggheleire *et al.*, 2021).

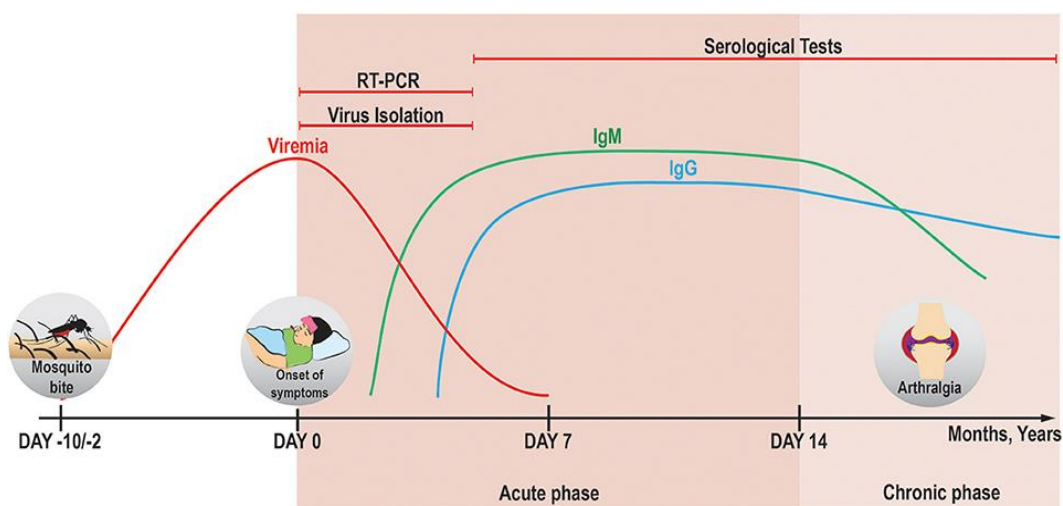


Figura 7: Métodos diagnósticos ideais de acordo com o período da infecção por CHIKV.
Fonte: Tanabe *et al.*, (2018).

O algoritmo de teste de diagnóstico para detecção da infecção pelo vírus chikungunya consiste em testar todos os pacientes que atendem à definição de caso clínico de febre e artralgia e que retornaram de uma região onde o CHIKV é endêmico ou onde a infecção pelo CHIKV é epidêmica com RT-PCR. As amostras com resultados positivos por RT-PCR são consideradas amostras positivas confirmadas para CHIKV e, as negativas serão submetidas a testagem por ELISA onde as positivas ou indeterminadas serão confirmadas como positivas se produzirem resultados positivos por PRNT (CDC, 2024).

2.5.1. Diagnóstico do CHIKV em Moçambique

Em Moçambique, o diagnóstico de Chikungunya tem sido essencialmente por método sorológico ELISA sem nenhum teste confirmatório adicional. Isso acontece em parte porque o isolamento viral, o RT-PCR e o PRNT requerem equipamentos caros, pessoal qualificado, tem procedimentos sensíveis a contaminação por substâncias externas e os kits usados são relativamente mais caros (Kabir *et al.*, 2021).

O teste ELISA é usado para investigar a presença de anticorpos específicos contra o vírus Chikungunya (IgM ou IgG) através de uma reação enzimática (PAHO, 2017; Kabir *et al.*, 2021). Pelas definições do fabricante, os kits de ELISA Euroimmun usados para o presente estudo na detecção de IgM e IgG anti-Chikungunya, tem uma sensibilidade e especificidade que variam entre 98.1% - 99.2% e 98.2% - 99.2%, respectivamente.

Embora os fabricantes garantam alta sensibilidade e especificidade dos ensaios ELISA, estudos revelam que a sensibilidade e especificidade deste ensaio depende da marca em causa (Lee *et al.*, 2019), da ocorrência e ou co-ocorrência com outras arboviroses (Lima *et al.*, 2021) e do período de colecta da amostra (agudo ou convalescência) (PAHO, 2017; Kikuti *et al.*, 2020; Andrew *et al.*, 2022).

Os anticorpos IgM específicos para CHIKV detectados na primeira semana de sintomas representam a infecção recente pelo vírus e o IgG uma exposição ao vírus. O diagnóstico recente de CHIKV pode ainda ser confirmado por IgG se houver um aumento de quatro vezes no título de anticorpos IgG em um par de soro das amostras com intervalo mínimo de 15 dias (fase aguda e convalescência) (Vairo *et al.*, 2019; PAHO, 2023).

2.5.2. Densidades Ópticas do teste ELISA e sinais e sintomas

A interpretação do teste ELISA comercial usado para o presente estudo (Eurommun Anti-Chikungunya ELISA IgM ou IgG), baseia-se no cálculo da razão entre as medidas de densidades ópticas da amostra e do calibrador. Os valores da razão correspondente a cada amostra, são comparados com valores de corte (*cut-off*) referência padronizados pelo fabricante, onde dependendo do valor da razão calculada, a amostra pode ser classificada qualitativamente em negativa (0 – 0.9), indeterminado (0.9 – 1.1) e positiva (>1.1), como ilustra a figura 8 abaixo.

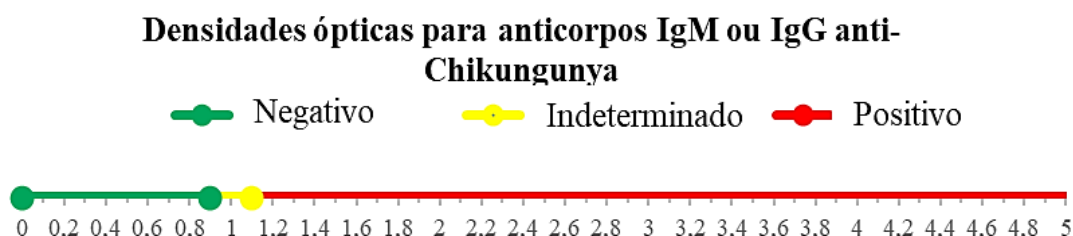
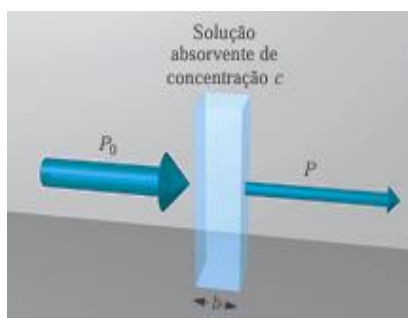


Figura 8: Intervalos de corte referência para determinação dos resultados dos testes IgM e IgG anti-Chikungunya. **Fonte:** Adaptado pelo autor

A densidade óptica é uma medida espectrofotométrica das absorvâncias que quantifica a luz monocromática absorvida pela amostra em um comprimento de onda específico (Skoog *et al.*, 2009). Pelas definições do fabricante, o kit ELISA Euroimmun em uso no presente estudo, as medidas de densidade ópticas representam a luz absorvida pela cor resultante da reacção entre o conjugado enzimático e o substrato cromogéneo em um comprimento de onda de 450 nm.

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, a medida da absorvância (densidade óptica) espectrofotométrica correspondente a uma substância é directamente proporcional ao caminho óptico e a concentração da substância em causa (Skoog *et al.*, 2009). Assim, quanto maior for a densidade óptica em um teste ELISA IgM ou IgG anti-Chikungunya, maior será a concentração de anticorpos IgM ou IgG anti-Chikungunya presentes no organismo do participante indicando uma resposta imunológica mais robusta e, vice-versa (fig.9) (Chatterjee *et al.*, 2016).



Onde: $A = \log(P_0/P) = \epsilon bc$

- A – absorvância;
- P_0 – radiação incidente;
- P – radiação transmitida;
- ϵ – absorvidade;
- b – caminho óptico (cm);
- c – concentração da substância.

Figura 9: Ilustração da atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente.

Fonte: Skoog *et al.*, (2009).

Embora as densidades ópticas estejam relacionadas à resposta imunológica para os anticorpos IgM e IgG anti-Chikungunya, nada se sabe sobre a sua influência no aparecimento e ou eliminação de sinais e sintomas em participantes infectados pelo vírus Chikungunya. Assim, no presente estudo pretende-se avaliar de forma quantitativa as medidas de resposta imunológica das imunoglobulinas M e G (densidades ópticas) e a sua influência na presença e ou ausência de sinais e sintomas ao longo das visitas.

3. OBJECTIVOS

3.1.Geral:

- Avaliar quantitativamente o teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya.

3.2.Específicos:

- Descrever as características sociodemográficas e a frequência de sintomas em participantes positivos para IgM e IgG anti-Chikungunya vírus.
- Comparar os padrões de densidades ópticas e dos sinais e sintomas em participantes IgM e IgG positivos pelo vírus Chikungunya ao longo do tempo;
- Identificar os sinais e sintomas que influenciam na intensidade da resposta imunológica dos anticorpos anti-IgM e anti-IgG em participantes infectados pelo vírus Chikungunya ao longo das visitas;

4. HIPÓTESES

4.1.Hipótese Nula:

- Não há relação entre densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA e a biologia do participante (o aparecimento de sinais e sintomas do participante);

4.2.Hipótese alternativa:

- Existe uma relação entre densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA e a biologia do participante (o aparecimento sinais e sintomas do participante).

5. ÁREA DE ESTUDO

Amostras usadas para o estudo foram colhidas no Centro de Saúde de Coalane, situado a 17° 51' 36" Sul de latitude e 36° 54' 24" Leste de longitude na cidade de Quelimane na província da Zambézia (fig.10), no âmbito do estudo ImmunoCHIKV. O centro de saúde é especializado em múltiplos serviços de atendimento de pacientes.

A população da cidade de Quelimane (região de cobertura da unidade sanitária) segundo os dados do Anuário Estatístico 2019 da província da Zambézia é de 392 031 habitats, numa área de 684 km² e uma densidade populacional de 573 habitats/km² (INE, 2019). A cidade está administrativamente dividida em cinco (5) Postos Administrativos Urbanos (PAU), que por sua vez subdividem-se em 52 Bairros (MAEFP, 2020).

O centro de saúde de Coalane cobre vários bairros e 4 Postos Administrativos Urbanos, nomeadamente PAU 1, 2, 3 e 4. O processamento das amostras foi conduzido nos Laboratórios de Referência Nacional do Instituto Nacional de Saúde – Moçambique, situado na EN1 na vila de Marracuene, província de Maputo.

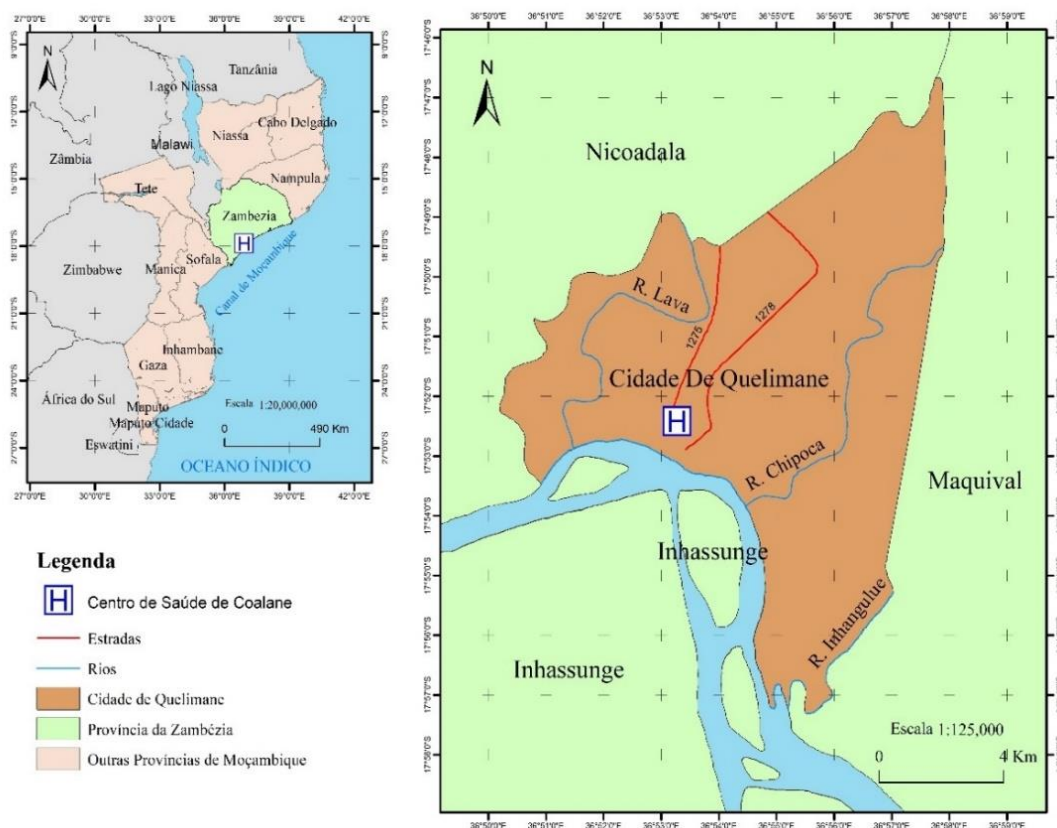


Figura 10: Localização geográfica do local de estudo. **Fonte:** Autor (ArcGis)

6. METODOLOGIA

6.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional longitudinal, de carácter retrospectivo, de abordagem quantitativa, que teve como objectivo, medir o nível de resposta dos anticorpos IgM e IgG específicos contra CHIKV através das medidas das densidades ópticas do teste de ELISA e a sua relação com os sinais e sintomas dos pacientes.

6.2. Fonte de dados

A fonte de dados foi secundária, com recurso aos dados referentes ao estudo ImmunoCHIKV (*Estudo Epidemiológico-Imunológico do vírus Chikungunya*) implementado no ano 2020 – 2021 na província da Zambézia no âmbito da vigilância de doenças emergentes e re-emergentes (ViDE). Neste estudo, para a inclusão dos participantes foi usado a definição de caso da vigilância de doenças emergentes que permite captar participantes suspeitos de arboviroses. Deste modo, foram incluídos participantes atendidos no ambulatório com idade maior ou igual a 12 anos de idade, com febre relatada ou medida no momento da consulta, com duração máxima de 7 dias, com diagnóstico negativo para malária e cuja causa da febre não é evidente (todos os participantes com pneumonia, bronquite, celulite, amigdalite e outros foram excluídos).

A todos casos suspeitos de arboviroses dentro dos critérios da vigilância de doenças emergentes, foram administrados um consentimento informado e, os participantes que consentiram foram colhidas amostras de sangue (soro e plasma) e recolhidos os respectivos dados clínicos e epidemiológicos, transportadas para o laboratório central do INS – Sede para o processamento. As amostras e dados dos participantes recrutados foram colhidas em 4 momentos: visita 1 (dia do recrutamento), visita 2 (7 dias após o recrutamento), visita 3 (30 dias após o recrutamento) e visita 4 (60 dias após o recrutamento). Para consultas de seguimento, os participantes eram oferecidos 60Mts por visita para custear as despesas de transporte e contactados via número de celular para recordar ou alertar sobre a consulta.

As amostras foram processadas no laboratório de serologia do INS – Sede (Maputo) usando kits comerciais para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-Chikungunya. Para o efeito, foi usado o kit Anti-Chikungunya Vírus ELISA IgM ou IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika, Lübeck, Alemanha, Ref: EI 293a-9061 M) que fornece um ensaio in vitro semi-quantitativo para a detecção de IgM e IgG anti-CHIKV humano

em soro ou plasma para o diagnóstico de Chikungunya, usando as instruções do fabricante.

6.3. População

A população do estudo foi constituída por todos indivíduos febris com resultado negativo para malária suspeitos de infecção por arbovirose com especial atenção a Chikungunya recrutados no âmbito do estudo ImmunoCHIKV (2020 – 2021).

6.4. Tamanho das amostras

A população da cidade de Quelimane (local de colheita de amostra) foi estimada em cerca de 392 031 habitantes (INE, 2019), com proporções actuais de Chikungunya no país que variam entre 14.1% (Mugabe *et al.*, 2023) a 14.8% (Ali *et al.*, 2022). Assim, considerando $p=14.8\%$ foi aplicada a fórmula abaixo para determinar o tamanho mínimo de amostras necessárias para o presente estudo (nível de confiança de 95% e $E=5\%$).

$$n = \frac{N \cdot (Z_{\alpha/2})^2 \cdot p \cdot q}{(N - 1) \cdot E^2 + p \cdot q \cdot (Z_{\alpha/2})^2}$$

$$n=193.7 \text{ amostras}$$

O tamanho da amostra mínimo calculado para o presente estudo foi de 194, no entanto foram usados todos dados da base de dados em análise (208 participantes) que obedecem os critérios de inclusão para o presente estudo como forma de obter maior representatividade dos dados em estudo.

6.5. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes para o presente estudo

6.5.1. Critérios de inclusão dos participantes

A seleção dos dados para análises no presente estudo foi mediante os seguintes critérios de inclusão:

- Obedeceram os critérios de inclusão para o estudo mãe (ImmunoCHIKV) e que tenham diagnóstico ELISA IgM e IgG para o vírus Chikungunya;
- Participantes com pelo menos uma (1) visita e que não devem ter mais de 7 dias de início de sinais e sintomas na visita 1;
- Participantes com o registo das densidades ópticas correspondente aos resultados IgM e IgG do teste de diagnóstico ELISA CHIKV.

6.5.2. Critérios de e exclusão dos participantes

- Todos os participantes que não tem resultado do laboratório e ou dados demográficos e clínicos, foram excluídos do estudo;
- Todos com datas de admissão e data de colheita de amostra e dados não preenchida.

6.6. Variáveis de interesse

Foram consideradas as seguintes variáveis para o estudo:

- Dados sociodemográficos: sexo, idade, escolaridade, bairro e posto administrativo;
- Resultado do diagnóstico ELISA para captura IgG e IgM anti-CHIKV nas visitas 1, 2, 3 e 4: Positivo, Negativo e Indeterminado;
- O valor da medida das densidades ópticas (DO_{450nm}) correspondentes a todos os resultados do laboratório das amostras testadas;
- Data da colheita da amostra;
- Informação clínica do participante: os sinais e sintomas das visitas 1, 2, 3 e 4.

6.7. Gestão e Análise de dados

Os dados selecionados criteriosamente, foram organizados em uma planilha no Microsoft Office Excel 2016, com base nas variáveis de interesse (tabela 7 em anexo). Todas as análises descritivas e inferenciais foram conduzidas utilizando o pacote estatístico SPSS, versão 26 (IBM SPSS Statistics, 2019, Armonk, Nova Iorque, Estados Unidos), em um nível de confiança de 95%.

- **Variável dependente:** medidas das densidades ópticas de participantes positivos para ELISA IgM e IgG anti-Chikungunya
- **Variáveis independentes:** sinais e sintomas observados nos participantes.

As análises descritivas realizadas compreendem o resumo das frequências (1) dos dados sociodemográficos dos participantes (pessoa, tempo e lugar), (2) da positividade de IgM e IgG anti-Chikungunya ao longo das visitas. Para além dessas, foi examinada (3) a distribuição das densidades ópticas do teste ELISA para IgM e IgG anti-Chikungunya e (4) a frequência dos sinais e sintomas dos participantes ao longo das 4 visitas.

Para comparar as medianas das medidas de densidades ópticas entre os participantes seropositivos para IgM e IgG anti-Chikungunya em diferentes visitas (1, 2, 3 e 4), foi

realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. Além disso, para comparar a temperatura axial média entre os participantes positivos para IgM e IgG anti-Chikungunya nas quatro visitas, foram aplicados os testes Anova One Way e o teste de Tukey, considerando os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância.

Adicionalmente, foi realizado uma análise bivariada empregando o teste de Spearman para determinar a correlação entre as DO_{450nm} com a duração da febre e temperatura axial dos participantes em diferentes visitas em participantes positivos no teste ELISA para IgM e IgG anti-Chikungunya. Para além disso, foi realizado o teste não paramétrico U de Mann-Whitney para verificar a associação entre a presença ou ausência de cada um dos sintomas dos participantes e a alteração das medidas de DO_{450nm} em diferentes visitas em participantes positivos no teste ELISA para IgM e IgG anti-Chikungunya.

Por fim, foi feita uma análise univariada e multivariada, usando regressão por quantis nos quartis de 25%, 50% e 75%, para avaliar o impacto dos sinais e sintomas significativos na alteração das densidades ópticas pela análise bivariada. O modelo foi ajustado com base nas medidas de densidade óptica do teste ELISA em participantes positivos para IgM e IgG anti-Chikungunya, considerando também os sinais e sintomas desses participantes.

6.8.Considerações Éticas

O estudo ImmunoCHIK foi conduzido usando o protocolo do estudo principal ARBOMAP (*Epidemiological, Immunological and Entomological Investigation of Arbovirus in 11 districts in Mozambique*), que teve aprovação pela Comissão Nacional de Bioética de Moçambique, com a sua última renovação em 2021 durante o estudo ImmunoCHIKV (Ref: 220/CNBS/21). O consentimento informado foi obtido para cada participante do estudo ou seu representante legal, no caso de crianças menores de 18 anos, de acordo com os requisitos do sistema de vigilância sentinela de rotina para síndrome febril de causa desconhecida, no âmbito da Vigilância de Doenças (Re)-emergentes em Moçambique. Para proteção da identidade do participante, cada participante recebeu um código unitário de acesso restrito apenas ao investigador principal do estudo, e a base de dados foi partilhada com os dados de identidade dos participantes (como nomes) devidamente mascarados.

7. RESULTADOS

7.1. Características socio demográficas dos participantes

No âmbito do estudo ImmunoCHIK, foram recrutados 208 participantes com síndrome febril de causa desconhecida, dentre os quais 53.8% (112/208) foram do sexo feminino e 45.2% (94/208) do sexo masculino e 1.0% (2/208) sem informação do sexo, com idade mediana de 27 (IQR, 37.4 – 21.0) anos. Desses participantes, a maior parte frequentavam o ensino secundário 49.0% (102/208) e, eram residentes nos postos administrativos urbanos 1 e 2 (PAU 1 e 2), com 46.2% (96/208) e 43.3% (90/208) de frequências, respectivamente (tabela 2).

Do total de participantes recrutados, a frequência do retorno ao longo das visitas reduziu gradualmente de visita 1 a 4, com 72.1% (150/208), 52.4% (109/208) e 32.7% (68/208) nas visitas 2, 3 e 4, respectivamente (tabela 2).

7.2. Frequência de positividade

Do total dos participantes recrutados, 26.0% (54/208) foram positivos para IgM anti-Chikungunya (visita 1), dos quais a sua frequência de positividade foi variando ao longo das visitas de retorno, com 21.1% (32/150) 41.3% (45/109) e 35.5% (24/68) nas visitas 2, 3 e 4 respectivamente. Por outro lado, para o anticorpo IgG anti-Chikungunya foi observado que do total dos recrutados somente 63.9% (133/208) foram positivos para IgG anti-Chikungunya e essa positividade também variou entre as visitas com 48.7% (73/150) 60.6% (66/109) e 58.8% (40/68), respectivamente nas visitas 1, 2 e 3 (tabela 2).

Dos participantes do sexo feminino recrutados para o estudo (visita 1), 23.2% (26/112) foram positivos para o anticorpo IgM anti-Chikungunya e 66.9% (75/112) foram positivos para o anticorpo IgG anti-Chikungunya. Em contrapartida, nos participantes do sexo masculino, 29.8% (28/94) e 59.6% (56/94) foram positivos para os anticorpos IgM e IgG anti-Chikungunya, respectivamente.

Nos participantes recrutados (visita 1), a maior positividade foi observada em participantes com ensino secundário 31.4% (32/102) e técnico profissional 43.8% (7/16), com idade mediana de 27.5 (IQR, 36.75 - 20) anos e na sua maioria eram residentes no PAU2 22.9% (22/96) e PAU3 25.6% (23/90) para IgM anti-Chikungunya. Para IgG anti-Chikungunya, participantes com ensino primário 81.8% (45/55) e secundário 51.9% (53/102), com idade compreendida em 34 (IQR, 45 - 25) e na sua maioria residentes no

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

PAU2 62.5% (60/96) e PAU3 68.9% (62/90) apresentaram maior frequência de positividade (tabela 2 abaixo).

Tabela 2: Características Sociodemográficas dos participantes recrutados e positividade para o anticorpo IgM e IgG anti-Chikungunya

Características	Geral n (%) N=208	Positivos IgM n (%) N=54	Positivos IgG n (%) N=133
Visitas			
Visita 1	208 (100%)	54 (26.0%)	133 (63.9%)
Visita 2	150 (72.1%)	32 (21.3%)	73 (48.7%)
Visita 3	109 (52.4%)	45 (41.3%)	66 (60.6%)
Visita 4	68 (32.7%)	24 (35.3%)	40 (58.8%)
Gênero			
Feminino	112 (53.8%)	26 (23.2%)	75 (66.9%)
Masculino	94 (45.2%)	28 (29.8%)	56 (59.6%)
Sem Informação	2 (1.0%)	----	2 (100%)
Idade: Mediana (IQR) anos	27 (37.4 - 21)	27.5 (36.75 - 20)	34 (45 - 25)
Escolaridade			
Nenhum	17 (8.2%)	2 (11.8%)	14 (82.4%)
Primário	55 (26.4%)	10 (18.2%)	45 (81.8%)
Secundário	102 (49.0%)	32 (31.4%)	53 (51.9%)
Técnico Profissional	16 (7.7%)	7 (43.8%)	11 (68.8%)
Universitário	13 (6.3%)	3 (23.1%)	6 (46.2%)
Sem Informação	5 (2.4 %)	---	4 (80.0%)
Postos Administrativos Urbanos (PAU)			
PAU 1	4 (1.9%)	1 (25.0%)	2 (75%)
PAU 2	96 (46.2%)	22 (22.9%)	60 (62.5%)
PAU 3	90 (43.3%)	23 (25.6%)	62 (68.9%)
PAU 4	14 (6.7%)	6 (42.9%)	6 (42.9%)
Fora da área	5 (1.9%)	2 (40.0%)	3 (60.0%)

7.3.Variação das medidas das DO450 nm para o anticorpo IgM anti-CHIKV

De forma geral, as medidas de densidades ópticas do anticorpo IgM anti-Chikungunya do teste imunoenzimático ELISA a 450nm distribuem-se de forma assimétrica ($p < 0.05$). No geral os casos mais frequentes de densidades ópticas em ambas as visitas se concentram nas densidades ópticas mais baixas, que perfazem o intervalo de OD_{450nm} [1.1 – 2.5], considerando a divisão dos intervalos de classes em 40 partes iguais, como ilustra o histograma abaixo (fig. 11).

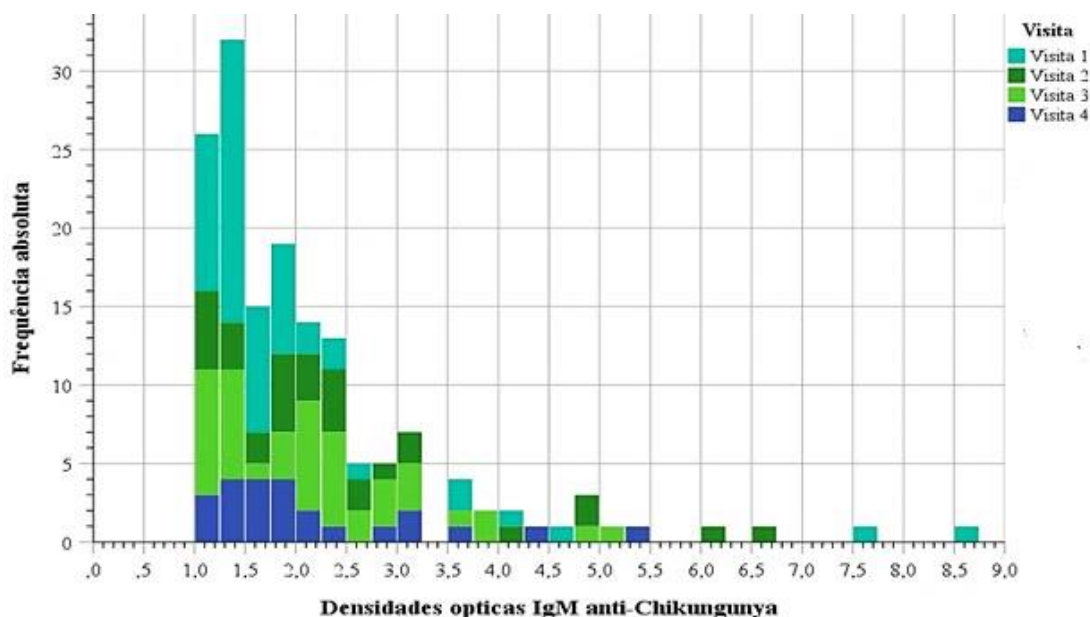


Figura 11: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina M.

As medidas de densidades ópticas do teste ELISA a 450nm para amostras IgM anti-Chikungunya positivas apresentaram uma distribuição variada dentro de cada visita e entre as visitas. O gráfico abaixo (fig. 12), demonstra que a medida de densidades ópticas tende a aumentar da visita 1 para 3, e reduz da visita 3 para visita 4, com a mediana das densidades ópticas de 1.48 (IQR, 1.91–1.27); 2.11 (IQR, 2.77–1.52); 2.19 (IQR, 2.63–1.41); e 1.77 (IQR, 2.56–1.36) nas visitas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

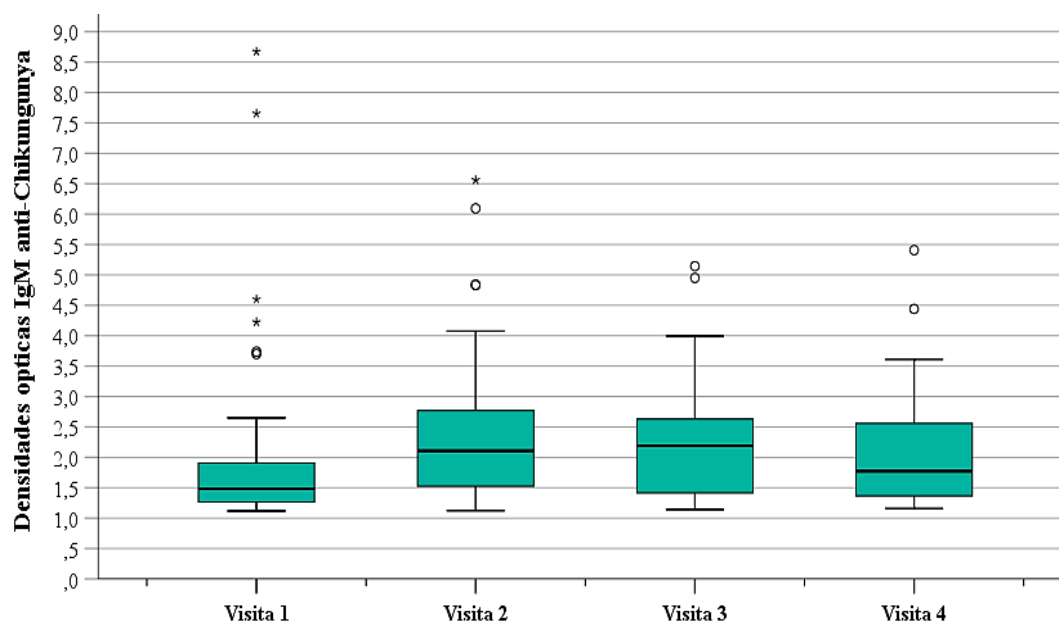


Figura 12: Comparação entre densidades ópticas de amostras positivas para a imunoglobulina M anti-CHIKV nas diferentes visitas.

A diferença na distribuição das medidas das densidades ópticas foi significativa apenas entre as visitas 1 e 2 ($p=0.007$) e visitas 1 e 3 ($p=0.01$), não sendo significativa em outras comparações cruzadas das visitas ($p>0.05$). Para além disso, alguns participantes apresentaram valores de medidas de densidades ópticas fora do padrão esperado (*outliers*), alguns com densidades ópticas moderadas (visitas 2 e 3) e outros com densidades ópticas extremamente altos (visitas 1 e 2), conforme ilustra a figura 12.

7.4. Variação das medidas de DO_{450 nm} para o anticorpo IgG anti-CHIKV

De forma geral, as medidas de densidades ópticas do anticorpo IgG anti-Chikungunya do teste imunoenzimático ELISA distribuem-se de forma assimétrica ($p<0.05$). No geral os casos mais frequentes de densidades ópticas, concentraram-se no intervalo de DO_{450 nm} [2.1 – 4.7] visita 1, [2.0 – 2.8] visita 2, [2.3 – 2.9] visita 3 e [2.1 – 2.6] na visita 4, considerando a divisão dos intervalos de classes em 40 partes, como ilustra o histograma abaixo (fig.13).

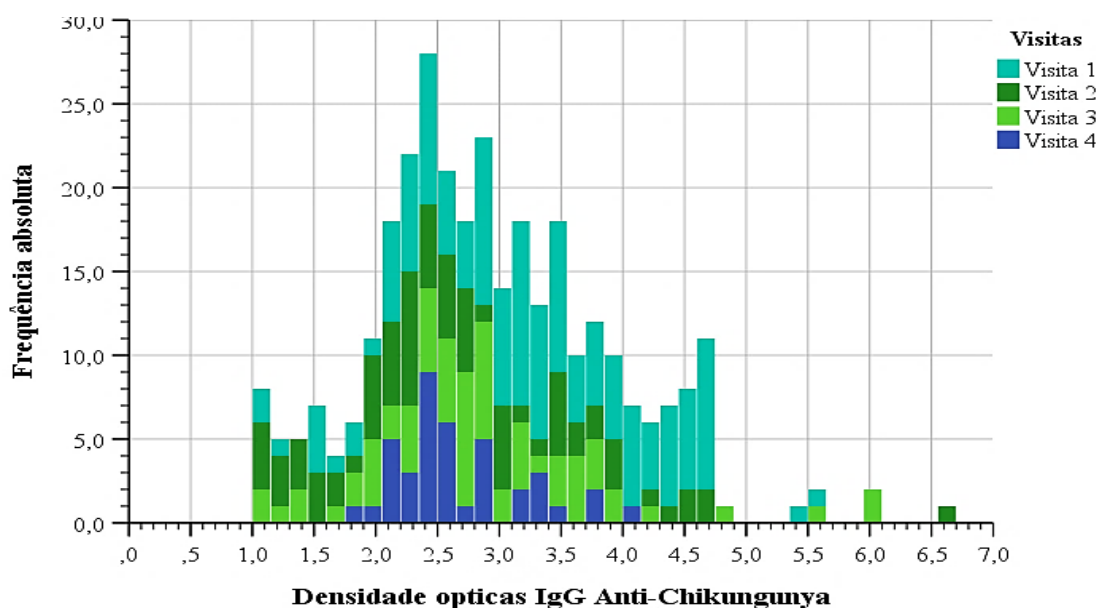


Figura 13: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina G.

Por outro lado, as medidas de densidades ópticas das amostras positivas para o anticorpo IgG anti-Chikungunya pelo teste ELISA, também apresentaram uma distribuição variada dentro de cada visita e entre as visitas, tal como o observado na análise das densidades ópticas de amostras IgM anti-Chikungunya positivas.

Entretanto, a variação mediana das densidades ópticas entre as visitas teve um outro padrão diferente do observado na medição com o anticorpo IgM anti-Chikungunya. A

figura abaixo (fig.14), mostra-nos que a densidade óptica reduziu da visita 1 [3.23 (IQR, 3.97 – 2.5)] para a visita 2 [2.45 (IQR, 3.40 – 1.99)] e, segue aumentando para a visita 3 [2.74 (IQR, 3.42 – 2.33)] e retorna a reduzir para a visita 4 [2.55 (IQR, 2.94 – 2.34)].

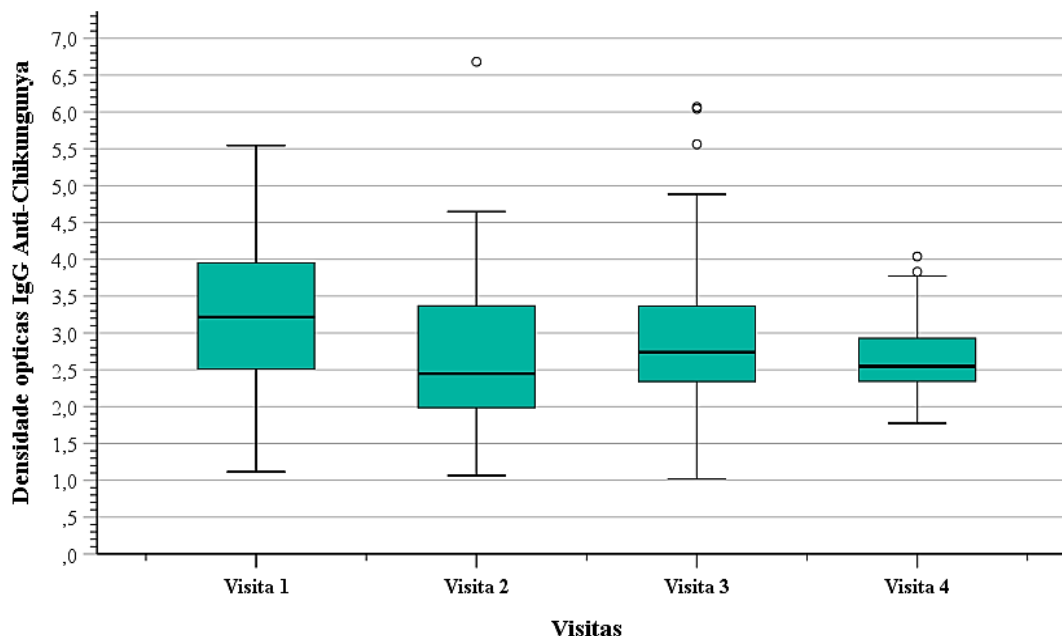


Figura 14: Frequência de ocorrência de densidades ópticas em todas as visitas em participantes positivos para a imunoglobulina G. **Legenda:** o – DO_{450nm} moderados;

Comparações múltiplas entre as visitas, revelam diferenças significativas entre as medidas das densidades ópticas das visitas 1 e 2 ($p=0.000$), visita 1 e 3 ($p=0.024$) e visitas 1 e 4 ($p=0.03$). Porém, essas diferenças não foram significativas em outras combinações de visitas, usando o teste Kruskal-Wallis a 5% de significância estatística.

Para além disso, foi igualmente observado que alguns participantes apresentaram valores de medidas de densidades ópticas fora do padrão esperado (*outliers*), ambos com densidades ópticas moderadas (figura 14) nas visitas 2, 3 e 4.

7.5.Sinais e sintomas dos participantes positivos para o anticorpo IgM e IgG anti-Chikungunya ao longo das visitas e relação com DO_{450nm}

A duração mediana da febre em participantes que testaram positivo para IgM anti-Chikungunya foi de 2 dias (IQR, 3 – 1.75) dias e, para participantes positivos para IgG anti-CHIKV, a duração mediana da febre foi de 3 dias (IQR, 4 – 2) dias. Tanto para participantes positivos IgM anti-Chikungunya assim como para IgG anti-Chikungunya, esta variável não está relacionada com aumento ou redução de densidade óptica de participantes em todas as visitas ($p>0.05$), conforme ilustram as tabelas 5 e 6 em anexo.

A temperatura axial em participantes IgM anti-Chikungunya positivos variou entre as diferentes visitas (tabela 5 em anexo), reduzindo da visita 1 com temperatura axial média 37.75 ± 0.09 °C para 36.71 ± 0.11 °C na visita 4 e, a diferença média entre a temperatura nas diferentes visitas foi estatisticamente significativa pelo teste Anova One way ($p < 0.01$). Essa diferença foi relevante apenas quando comparada a temperatura média da visita 1 com as outras restantes visitas pelo teste de Tukey ($p < 0.01$).

Tal como verificado para o IgM anti-Chikungunya, a temperatura dos participantes reduziu entre as visitas nos participantes reactivos para IgG anti-Chikungunya, com temperatura axial média de 37.36 ± 0.66 °C na visita 1 para 36.63 ± 0.92 °C na visita 4 e, a diferença média entre elas foi estatisticamente significativa ($p < 0.01$). Essa diferença é verificada quando comparada a temperatura da visita 1 com as restantes visitas (Tukey, $p < 0.01$), conforme ilustra a tabela 6 em anexo. Tanto para participantes positivos IgM anti-Chikungunya assim como para IgG anti-Chikungunya, a temperatura axial dos participantes não está relacionada com aumento ou redução de densidade óptica de participantes em todas as visitas ($p > 0.05$), tabela 5 e 6 em anexo.

Os sintomas mais frequentes em participantes positivos para IgM recrutados foram a cefaleia 96.2% (51/53), artralgia 66.0% (35/53), fraqueza 60.4% (32/53), calafrio 56.6% (30/53), mialgia 45.3% (24/53) e anorexia 34.0% (18/53). Desses, sintomas como a cefaleia, fraqueza e artralgia foram persistentes até na 4ª visita, com frequência dos sintomas 16.7% (4/24), 8.3% (2/24) e 8.3% (2/24), respectivamente (fig. 15).

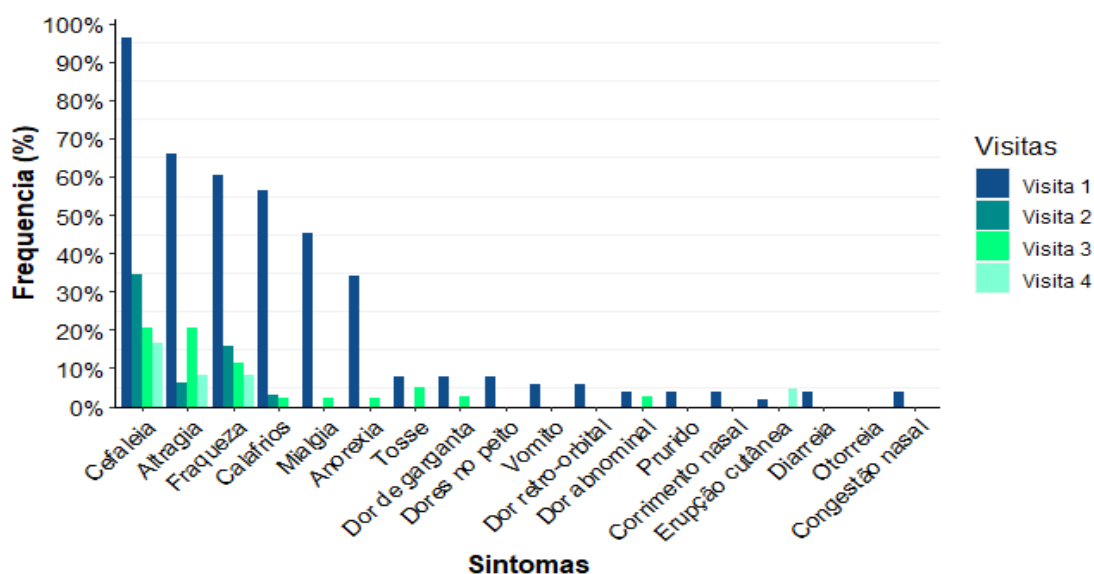


Figura 15: Frequência dos sintomas em participantes positivos ao IgM anti-Chikungunya durante as 4 visitas.

Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya

No entanto, a presença ou não de cefaleia ($p=0.044$), dor retro-orbital ($p=0.002$) e dor abdominal ($p=0.044$) são os únicos sintomas que demonstraram ser importantes na alteração de medidas de densidades ópticas para IgM anti-Chikungunya apenas na visita 1 (tabela 5, em anexo). Outros sintomas na visita 1 assim como em outras visitas não foram importantes na alteração de densidades ópticas.

A análise individual dos sintomas associados em diferentes níveis de densidades ópticas (baixas – Q1, medianas – Q2 e altas – Q3) em participantes IgM anti-CHIKV positivos observado na visita 1 está apresentada na tabela 3 (modelo não ajustado). As chances de participantes IgM anti-CHIKV positivos apresentarem cefaleia aumenta com o aumento do valor das densidades ópticas quando comparado a participantes que não apresentaram esse sintoma tanto em densidades ópticas mais baixas (coef = 0.161), medianas (coef = 0.391) assim como nas altas (coef = 0.707). Participantes que apresentaram dor retro-orbital e dor abdominal demonstraram ser um factor protector na alteração de densidades ópticas (tanto em níveis de densidades ópticas baixas, medianas e altas), quando comparado a participantes que não apresentaram esses sintomas (coeficiente de regressão negativa), conforme ilustra a tabela 3.

Apesar de verificado o efeito adverso dos sintomas em diferentes níveis de densidades ópticas (baixos, medianos e altos), a magnitude do efeito de participantes com cefaleia, dor retro-orbital, assim como participantes com dor-abdominal (individualmente) na alteração de densidades ópticas não foi possível estimar (tabela 3), pois os coeficientes de regressão não foram significativos ($p>0.05$).

Tabela 3: Influência dos sintomas nas medidas de densidades ópticas nos quartis 25%, 50% e 75% (Análise Regressão quantílica Univariada – Modelo não ajustado).

Sintomas	Q1=25%		Q2=50%		Q3=75%	
	Coef.	P-valor	Coef.	P-valor	Coef.	P-valor
Cefaleia	0.16	0.548	0.39	0.457	0.71	0.746
Dor Retro-orbital	-0.23	0.221	-0.40	0.343	-0.71	0.688
Dor abdominal	-0.16	0.565	-0.39	0.436	-0.73	0.740

A análise em simultâneo dos sintomas associados em diferentes níveis de densidades ópticas, em participantes IgM anti-CHIKV positivos observado na visita 1 está apresentada na tabela 4 (modelo ajustado). Neste modelo, participantes que apresentaram cefaleia, dor retro-orbital e dor abdominal apresentaram um cenário diferente do observado na análise univariada (modelo não ajustado) em relação com as densidades ópticas. Participantes com esses sintomas mostraram ter um efeito protector na alteração das densidades ópticas em participantes IgM anti-CHIKV positivos tanto em valores mais baixos de densidades ópticas (Q1=25%), medianos (Q2=50%) e altos (Q3=75%) quando comparado a participantes que não apresentaram simultaneamente esses sintomas (os valores dos coeficientes de regressão nos diferentes quartis de ambos sintomas foram negativos).

Apesar disso, também não foi possível medir a magnitude do efeito do parâmetro de estimação uma vez que não houve significância estatística do coeficiente de regressão ($P_{adj} > 0.05$), conforme ilustra a tabela 4.

Tabela 4: Influência dos sintomas nas medidas de densidades ópticas nos quartis 25%, 50% e 75% (Análise Regressão quantilíca multivariada – Modelo ajustado).

Sintomas	Q1=25%		Q2=50%		Q3=75%	
	Coef.	P-valor	Coef.	P-valor	Coef.	P-valor
Cefaleia	-0,01	0,969	-0.01	0,989	-0.08	0,981
Dor Retro-orbital	-0.25	0,301	-0.47	0,478	-0.87	0,773
Dor abdominal	-0.24	0,179	-0.46	0,339	-0.75	0,711

Portanto, tanto na análise univariada assim como a múltipla, a cefaleia, dor retro-orbital e dor abdominal não tem influência na alteração das medidas de densidades ópticas, tanto em níveis de densidades ópticas baixos, medianos e assim com altos ($p > 0.05$).

Por outro lado, os sintomas mais frequentes em participantes recrutados positivos para IgG foram a cefaleia 97.8% (131/134), atralgia 76.9% (103/134), calafrio 62.7% (84/134), fraqueza 61.9% (83/134), anorexia 47.0% (63/134) e mialgia 33.6% (45/134). Desses, sintomas como a cefaleia, altragia, fraqueza, e mialgia foram persistentes até na 4 visita, com frequência dos sintomas 10.0% (4/40), 5.0% (2/40), 2.5% (1/40), e 2.5% (1/40) respectivamente (fig.16).

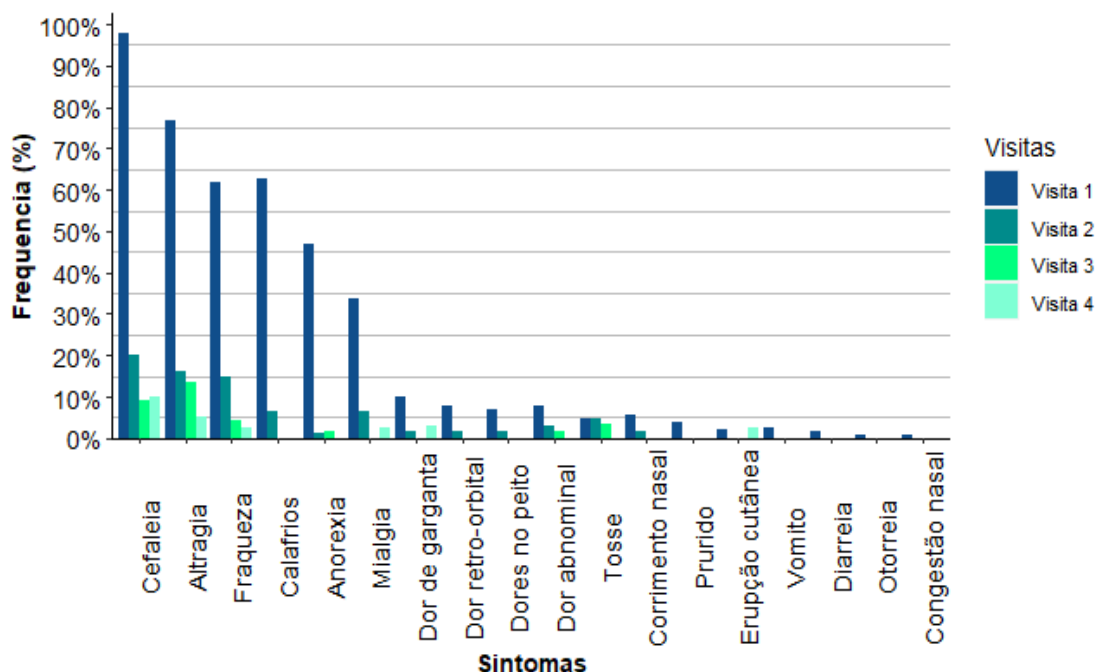


Figura 16: Frequência dos sintomas em participantes positivos ao IgG anti-Chikungunya durante as 4 visitas.

A presença ou não de qualquer um dos sintomas analisados não teve impacto na alteração das medidas das densidades ópticas (DO_{450nm}) do teste imunoenzimático ELISA IgG anti-Chikungunya nas 4 visitas analisadas ($p > 0.05$), ilustrado na tabela 6 (anexo). Portanto, para IgG anti-Chikungunya não foi realizado o teste de regressão quantílica uma vez que nenhum dos sintomas foi significativo quando relacionada com medidas de DO_{450nm} em todas as visitas.

8. DISCUSSÃO

Moçambique é um dos países mais afectados pelos eventos extremos climáticos e este facto tem desafiado vários sectores incluindo o sector da saúde, intensificados em parte pela intensidade assim como pelos impactos sociais que frequentemente se fazem sentir em vários pontos do país (MISAU, INS e OMS, 2019; Mugabe *et al.*, 2021). Estudos indicam que em períodos pós-ciclones (Idai e Kenneth em 2019) houve o reporte da co-ocorrência e coinfeção de arbovírus e outros patógenos em participantes impactados nas províncias de Sofala e Cabo delgado. A carga de participantes soropositivos para IgM anti-Chikungunya foi de 14.1% (43/305) na população costeira e afectadas por estes dois eventos climáticos extremos que se dirigiram as unidades sanitárias com síndrome febril (Mugabe *et al.*, 2023).

O presente estudo foi implementado no Centro de Saúde de Coalane, cidade Quelimane, um ano depois da ocorrência do ciclone Idai e Kenneth, como estratégia para medir o impacto dos eventos extremos climáticos na dinâmica da infecção pelo vírus Chikungunya em períodos pós-ciclones. Através disso, notou-se um aumento da positividade para o anticorpo IgM anti-Chikungunya de 14.1% (43/305) em 2019 (Mugabe *et al.*, 2023) para 26.0% (54/208) nos períodos 2020 – 2021 em participantes recrutados (visita 1) com síndrome febril de causa desconhecida. A Chikungunya é endêmica em Moçambique, e os eventos extremos climáticos possibilitam a disseminação da doença para novas áreas e assim como agravamento da incidência e gravidade da doença. Note que em um espaço de 5 anos, foi verificado o aumento da frequência de casos positivos tanto para IgM assim como para IgG, isto é, em um estudo anterior realizado em 2016 em Quelimane foi verificado anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV em 10,4% (17/163) e 63,2% (103/163) participantes respectivamente contra 26.0% (54/208) para IgM e 63.9% (133/208) no presente estudo (Mugabe *et al.*, 2018, Mugabe *et al.*, 2021).

Apesar de tratar-se de áreas de estudos diferentes, ambas as províncias de estudo (Sofala, Zambézia e Cabo-delgado) são costeiras, e já presenciaram pelo menos um (1) ciclone tropical (MISAU, INS e OMS, 2019), evidenciando uma possível influência de eventos extremos climáticos na intensificação das doenças sensíveis à clima como arbovírus em períodos pós exposição a eventos extremos climáticos.

Em Abril de 2023 foi registado ainda o ciclone tropical Freddy que foi mais severo na zona centro, sobretudo nas províncias de Sofala e Zambézia (área de estudo para este estudo), onde houve registo de maior ocorrência de cólera (OCHA, 2023) mas nenhuma investigação foi feita sobre o impacto desse ciclone na dinâmica de infecção pelo vírus Chikungunya e outros arbovírus durante e após a ocorrência desse evento climático, o que significa que possivelmente possam ocorrer transmissões mais frequentes de Chikungunya nesse ponto de país, havendo necessidade de monitoria contínua dos impactos das mudanças climáticas neste país (Mugabe *et al.*, 2021).

Foi observado ainda o baixo retorno dos participantes para as consultas de acompanhamento (visitas 2, 3 e 4), de 208 participantes na visita 1 retornaram apenas 32.7% (68/208) na visita 4. Este é um cenário comum em Moçambique e foi também observado pelo Gudo *et al.*, (2015) em um estudo sobre evidência sorológica do vírus

Chikungunya realizado em Maputo (2013), onde apenas 52.3% (209/400) dos participantes febris agudos retornaram a consultas de convalescença e, foi associado a perda de interesse dos participantes após a redução de sinais e sintomas em cerca de 7 dias.

Comparativamente ao cenário observado por Gudo *et al.*, (2015), no presente estudo houve melhorias na taxa de retorno de participantes, até 30 dias após a primeira consulta (visita 3), 52.4% (109/208) dos participantes retornaram à consulta de acompanhamento no entanto, há necessidade de fortalecimento do seguimento de participantes em vigilâncias de síndrome febril, adaptando para metodologias participativas com engajamento e participação comunitária, pós mesmo compensando os participantes no dinheiro de transporte na visita de seguimento ou ligação periódica para os participantes de seguimentos não se mostrou eficaz na retenção e redução da perda dos participantes no seguimento. A adopção de estratégias de retenção deve ter atenção com os aspectos antropológicos de cada região pois estratégias podem não ser aplicáveis em diferentes contextos. Por exemplo, no Suriname adoptou-se estratégias compatíveis com o estado socioeconómico da população num surto de CHIKV em Suriname, onde os participantes infectados foram seguidos em suas casas e monitorados os sinais e sintomas via chamadas celular até 180 dias (Genderen *et al.*, 2016). Neste estudo, metade dos participantes não tinham números de celulares para busca activa ou não forneciam alegando desconfiança uma vez que a pandemia da COVID_19 acelerou os estigmas relacionados ao rastreio de casos e busca activa e os participantes relacionavam este facto. Por outro lado, apenas 46% da população Moçambicana é alfabetizada e os níveis de iliteracia em saúde pública é assustador (INE e IFC, 2024).

Este é um desafio que limita o diagnóstico de participantes suspeitos para arbovírus, sobretudo em um país onde o teste de diagnóstico utilizado para detecção e confirmação de Chikungunya em participantes febris é essencialmente serológico pelo método ELISA para captura de anticorpos IgM ou IgG anti-Chikungunya (sem nenhum teste de identificação do antígeno viral), onde dependendo do nível de produção dos mesmos pelo organismo até ao momento de colheita da amostra podem não ser detectáveis.

Neste contexto, é crucial a consulta de acompanhamento para medir o nível de DO_{450 nm} pois, sabe-se que infecções agudas pelo vírus Chikungunya na ausência de reacção para IgM podem ser confirmadas verificando o aumento em 4 vezes o título de anticorpos IgG

(soroconversão) em um par de amostras de soro com diferença de 15 dias de colheita (Vairo *et al.*, 2019; PAHO, 2023). Assim, possíveis casos de infecção aguda por CHIKV para este estudo com anticorpos IgM anti-CHIKV em um nível não detetável pelo teste ELISA na visita 1 podem ter sido perdidos, limitando ainda mais a identificação de surtos e o conhecimento das medidas de morbidade e da epidemiologia real da doença em Moçambique e em África e no mundo conforme descrito por Bettis *et al.*, (2020).

De acordo com Bettis *et al.*, (2020), para além da limitação na capacidade diagnóstica e na identificação de surtos, o conhecimento da epidemiologia do CHIKV é também condicionado pela falta de procedimentos padronizados para estudar a doença (diversidade de metodologia, desenhos de estudos e populações), negligência e ou subnotificação de participantes febris e o sistema de vigilância que é essencialmente a base clínico-hospitalar ignorando participantes assintomáticas e sintomáticos que possam estar presentes a nível comunitário.

Foi observado ainda que a positividade varia entre os postos administrativos, tanto para o anticorpo IgM quanto para o IgG anti-CHIKV, o que nos sugere que embora haja maior transmissão do CHIKV e outros arbovírus na zona centro e norte, é preciso ter em conta que há desigualdade nas infecção por esses vírus entre diferentes pontos da mesma região, cidade ou província. Isso pode estar associado a diferenças na exposição a factores de riscos relacionados a ocorrência massiva de transmissão do vírus Chikungunya nos diversos pontos da cidade de quelimane que estejam envolvidos com o estabelecimento de condições para a reprodução do mosquito transmissor, tais como a presença de tanques de armazenamento de água, baldes, latas e pneus com água armazenada como foi verificado pelo Abílio *et al.*, (2019). Assim, é importante desenvolver estudos não somente da vertente clínico hospitalar, mas também comunitário que envolvam outras variáveis como as condições do saneamento do meio onde essas populações residem para melhor explorar essas diferenças na positividade.

Os anticorpos IgM e IgG foram detectados desde a visita 1 até a visita 4 (60 dias), e a seropositividade oscilou por visita para IgM e IgG anti-Chikungunya. De acordo Tanabe *et al.*, (2018) e Srivastava *et al.*, (2020), a presença de IgM anti-Chikungunya nos primeiros dias após o início de sintomas (visita 1) representa a fase aguda da infecção e pode persistir por até 2 – 3 meses no organismo.

Por outro lado, Chelluboina *et al.*, (2019) observou um cenário diferente em um estudo com participantes febris na Índia, onde os anticorpos IgM anti-Chikungunya persistiram até 10 meses e ainda possuíam a capacidade de neutralização do vírus. Neste estudo os participantes foram seguidos por 2 meses e não foi considerada a observação a capacidade neutralizante dos anticorpos, entretanto, é preciso interpretar com cuidado em caso de um resultado reactivo para o anticorpo IgM sobre a possibilidade de falsos resultados ao tratar como casos de infecção aguda pelo vírus, sobretudo em períodos de surtos de Chikungunya que pode indicar uma infecção contínua pelo CHIKV.

A presença de IgG anti-Chikungunya representa a fase convalescente da infecção por CHIKV e é produzido geralmente uma semana após o início da infecção do vírus e pode persistir por meses a anos Tanabe *et al.*, (2018) e Srivastava *et al.*, (2020). No presente trabalho, a resposta IgG anti-CHIKV foi observada em 63.9% (133/208) em participantes recrutados com menos de 7 dias de sintomas, o que implica que provavelmente não esteja se tratar de uma infecção recente do vírus Chikungunya.

Segundo Staples *et al.*, (2023), alguns participantes infectados pelo CHIKV podem permanecer assintomáticos durante a fase aguda da infecção, porém nada menciona sobre a possibilidade de aparecimento de sintomas na fase de convalescência como foi observado no presente estudo. Neste contexto, ressalta mais uma vez a necessidade de realizar vigilâncias comunitárias em participantes assintomáticos como forma de melhor descrever esse cenário.

Sobre as densidades ópticas dos participantes reactivos para IgM anti-CHIKV, foi verificado que as $DO_{450\text{ nm}}$ geralmente eram mais baixas [1.1 – 2.5] em todas as visitas quando comparadas as $DO_{450\text{ nm}}$ de IgG anti-Chikungunya em participantes positivos em que foi [2.1 – 4.7] visita 1, [2.0 – 2.8] visita 2, [2.3 – 2.9] visita 3 e [2.1 – 2.6]. Por outro lado, para IgM anti-Chikungunya as $DO_{450\text{ nm}}$ aumentaram de visita 1 para visita 3 e reduziram para a visita 4 e para IgG observou-se um cenário diferente ao longo das visitas.

De acordo com a lei de Lambert-Beer, as medidas de densidades ópticas são directamente proporcionais a concentração da substância em análise em uma solução e assim, as densidades ópticas analisadas no presente estudo podem estar a indicar que cada anticorpo ou imunoglobulina é produzido em nível diferenciado pelo organismo e o tempo tem sua influência na alteração dessas substâncias (Skoog *et al.*, 2009).

E, tomando em consideração que os anticorpos IgM e IgG foram observados até cerca de 60 dias, em conjunto pode indicar uma possível resposta imune persistente (Chelluboina *et al.*, 2019) ou uma infecção contínua pelo vírus Chikungunya facto ainda evidenciado pela flutuação das densidades ópticas do IgG anti-CHIKV ao longo das visitas. Por outro lado, as altas concentrações de IgG em qualquer uma das visitas quando comparado com IgM, pode ainda estar a fortalecer a ideia de que pode tratar-se de casos não recentes de Chikungunya e assim considerando que provavelmente os participantes na fase aguda infectados por Chikungunya podem se apresentar de maneira assintomática, tornando-se sintomáticas enquanto o vírus já não existia no interior organismo.

Por outro lado, sendo Moçambique um país com o registo da presença do vector transmissor com capacidade de transmitir CHIKV e outros arbovírus (Abílio *et al.*, 2019), a co-ocorrência e ou coinfeção de arbovírus (Ali *et al.*, 2022; Mugabe *et al.*, 2023), pode também estar relacionado com a flutuação das $DO_{450\text{ nm}}$ ao longo das visitas, destacando a necessidade de investigação de influência da coinfeção de arbovírus na alteração das medidas de densidades ópticas do para IgM e IgG anti-Chikungunya.

Para além disso, foram observadas $DO_{450\text{ nm}}$ fora do padrão, $DO_{450\text{ nm}}$ excepcionalmente altas (*outliers*) tanto para IgM assim com para IgG anti-CHIKV, indicando a possibilidade de eventos ou condições específicas que podem exercer uma influência desproporcional na produção quantitativa dos anticorpos IgM e IgG pelo organismo, exigindo também uma análise mais aprofundada para compreender seu impacto no resultado geral do estudo. Neste contexto, estudos indicam que factores como a diferença de genótipos podem conferir ao vírus habilidades exclusivas, que podem influenciar respostas imunes diferentes em humanos infectados e a patologia associada (Teo *et al.*, 2015; Langsjoen *et al.*, 2018; Jain *et al.*, 2020).

A maioria dos participantes recrutados (visita 1) apresentavam cefaleia, artralgia, fraqueza, calafrio, mialgia e anorexia tanto para positivos IgM assim como IgG, mas nenhum deles encontra-se associado a alteração de densidades ópticas ($p>0.05$). Esses sintomas são comuns em vários estudos realizados em Moçambique sobre infecções por Chikungunya, diferindo apenas nas frequências dos mesmos em cada estudo (António *et al.*, 2018; Mugabe *et al.*, 2018; Muianga *et al.*, 2018; Mugabe *et al.*, 2023).

Segundo Appassakij *et al.*, (2013) e Sagar *et al.*, (2024), a maioria dos sinais e sintomas numa infecção por CHIKV estão associados a títulos de virémia na fase aguda e

desaparecem na medida em que o vírus é eliminado pelo organismo geralmente após 1 semana de sintomas. Porém, no presente estudo, a maioria dos sintomas desapareceram ao longo das visitas tanto para seropositivos IgM assim como IgG, entretanto, sintomas como a cefaleia, fraqueza e alergia foram persistentes até na 4ª visita em ambas imunoglobulinas.

Em relação aos sintomas persistentes, podem estar relacionados a cronicidade da infecção e que alguns destes sintomas foram observados pelo Genderen *et al.*, (2016) no seu estudo de seguimento de participantes febris e infectados pelo CHIKV. Segundo Genderen *et al.*, (2016), em casos crónicos da infecção por CHIKV, a mialgia, cefaleia, dor nas costas, fadiga e fraqueza podem persistir até cerca de 90 dias e, a artralgia pode persistir por muito mais tempo.

Portanto, os sintomas reduzem na medida que o tempo passa, embora as densidades ópticas variem estes não estão directamente associados ao aparecimento ou redução de sinais e sintomas em participantes agudos e convalescentes. Portanto, embora o nível de densidades ópticas não demonstre efeito nos sinais e sintomas ao longo do tempo, acredita-se que a presença de IgM e ou IgG em conjunto com actividade das diversas vias do sistema imunológico, desencadeiam uma resposta imunológica mais robusta que garantem a eliminação do vírus do hospedeiro e a regulação da resposta inflamatória e, consequentemente recuperação do participante da infecção pelo vírus Chikungunya.

Essas respostas incluem a actividade das células da imunidade inata no reconhecimento e libertação de moléculas pro-inflamatórias (citocinas e quimiocinas) para recrutamento inicial de células fagocíticas para a região de infecção (Silva e Dermody, 2017; Tanabe *et al.*, 2018; Poh *et al.*, 2020) e a actividade das células da imunidade adaptativa na intensificação da resposta inflamatória e indução da produção massiva de anticorpos – moléculas que neutralizam o vírus limitando a sua replicação, garantindo uma resposta mais específica e flexível contra o vírus (Silva e Dermody, 2017; Srivastava *et al.*, 2020).

Este estudo é mais um subsídio nas evidências sobre o impacto das mudanças climáticas, especificamente a acção dos eventos extremos climáticos como ciclones na emergência e reemergência de doenças, informação imprescindível para preparação e resposta em prontidão a esses desafios que Moçambique e outros países enfrentam. Para além disso, poderá servir de chamada de atenção aos tomadores de decisão no sector da saúde sobre a necessidade de vigilância contínua de doenças causadas pelo vírus Chikungunya e

outros arbovírus que partilham o mesmo vector transmissor sobretudo para um país que é frequentemente assolado por eventos climáticos extremos como cheias e ciclones.

Embora os sinais e sintomas não demonstrem uma relação com o nível de anticorpos produzidos pelo organismo, este resultado pode ser útil na medida que exclui a possibilidade de uso dos sinais e sintomas no diagnóstico clínico de participantes infectados pelo vírus Chikungunya e na identificação da fase da doença em que o participante se encontra (agudo, convalescente e crónico). Assim, exalta-se o uso do kit ELISA Euroimmun (em uso no presente estudo) e outros métodos para confirmação da infecção por CHIKV em qualquer participante com sintomas sugestivo da infecção por CHIKV.

Portanto, os níveis de densidades ópticas do kit ELISA Euroimmun podem ser aplicadas no âmbito de desenvolvimento das vacinas para o monitoramento do nível de anticorpos, a duração da resposta imunológica mediada por anticorpos, informação útil também na definição do momento certo de administração de vacinas (quando existirem). Para além disso, essas informações sobre o nível e duração de anticorpos são essenciais na tomada de decisão pelo clínico no manejo do caso de uma infecção por CHIKV.

9. LIMITAÇÕES

- ✓ Completude do preenchimento da ficha do participante: alguns dados sociodemográficos e informação de sinais e sintomas dos participantes não haviam sido preenchidos na completude, o que pode induzir a viés de interpretação dos dados.
- ✓ Qualidade de preenchimento da informação da ficha do participante: algumas informações sociodemográficas como bairros não estão padronizadas tendo-se preenchido de maneiras que criam interferências entre diferentes bairros sobretudo aqueles com nomes próximos, o que limita análise usando bairros. Para contornar, optou-se por usar Postos administrativos, embora seja difícil fazer uma análise situacional do problema de saúde pública;
- ✓ Défice de retorno dos participantes ao longo das visitas: o que pode induzir a vícios na interpretação dos dados sobre as densidades ópticas.
- ✓ Confirmação do material genético viral: o que dificultou a interpretação e discussão de diversos fenómenos observados.

10. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, conclui-se que:

- Participantes febris, residentes dos Postos Administrativos Urbanos 2 e 3 que frequentam o ensino secundário e técnico, na faixa mediana dos 27 anos de idade de ambos sexos foram os que apresentaram maiores taxas de positividade para IgM e IgG.
- As densidades ópticas para o teste de imunoenzimático revelaram que no IgM anti-Chikungunya foram mais baixas em relação a IgG e ambas permanecem estáveis até aos 60 dias de estudo.
- Nos participantes positivos, os sintomas mais frequentes reportados foram a cefaleia, artralgia, fraqueza, calafrio, mialgia e anorexia e reduzem com o curso da infecção.
- Não existe associação entre a alteração das medidas de densidades ópticas IgM e IgG e sinais sintomas reportados.

11. RECOMENDAÇÕES

De acordo com os resultados e as conclusões recomenda-se:

11.1. Para a Vigilância

- Recomenda-se o uso de melhores estratégias de engajamento e participação comunitária na vigilância de doenças febris de modo a melhorar a participação, retenção e retorno dos participantes em seguimento ou nas visitas subsequentes.
- Continuidade de uso de plataforma digitais para colheita de informação para resolver o cenário da completude no preenchimento de dados e a qualidade do preenchimento da ficha do participante. O estudo foi realizado em uma altura de migração de fichas físicas para plataformas digitais.

11.2. Comunidade científica

- Realizar estudos de seroprevalência comunitária de arboviroses em participantes assintomáticos como forma de melhor perceber a positividade em massa do IgG anti-Chikungunya pelo teste ELISA Euroimmun.
- Recomenda-se a inclusão de um teste de detecção do antígeno viral como forma de melhor explicar a persistência e ou oscilação do nível dos anticorpos IgM e IgG ao longo do tempo.
- Recomenda-se a investigação de outros factores que podem estar relacionados a alteração de medidas de resposta imunológica dos anticorpos IgM e IgG anti-Chikungunya, desde o impacto da infecção secundária pelo vírus Chikungunya, coinfeção por outro arbovírus e análises segregando os casos em três categorias: IgM+ e IgG-, IgM+ e IgG+ e IgM- e IgG+.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abílio, A. P., G. Abudasse, A. Kampango, B. Candrinho, S. Sitei, J. Luciano, D. Tembisse, S. Sibindy, A. P. de Almeida, G. A. Garcia, M. R. David, R. M. Freitas e E. S. Gudo (2018). Distribution and breeding sites of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in 32 urban/peri-urban districts of Mozambique: implication for assessing the risk of arbovirus outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9): 1 – 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006692>
2. Adam A. e C. Jassoy (2021). Epidemiology and Laboratory Diagnostics of Dengue, Yellow Fever, Zika, and Chikungunya Virus Infections in Africa. *Pathogens*, 10 (10):1324. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101324>
3. Agboli, E., A. Tomazatos, O. Maiga-Ascofaré, J. May, R. Lühken, J. Schmidt-Chanasit e H. Jöst (2022). Arbovirus Epidemiology: The Mystery of Unnoticed Epidemics in Ghana, West Africa. *Microorganisms*, 10(10), 1914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101914>
4. Andrew, A., T. N. Navien, T. S. Yeoh, M. Citartan, E. Mangantig, M. S. Sum, E. S. Ch'ng e T. H. Tang (2022). Diagnostic accuracy of serological tests for the diagnosis of Chikungunya virus infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 16 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010152>
5. Ali, S., O. Inlamea, A. Muianga, P. Maholela, J. Oludele, B. Melchior, V. Antonio, V. Monteiro, T. Isaias, A. Sumail, I. Chongo, P. Alho, P. Mambo, N. Heinrich, E. Gudo (2022). Investigation of antibodies against Chikungunya, Dengue and Zika virus in serum samples from febrile patients and its co-occurrence with malaria in six districts highly endemic for malaria in Mozambique between 2017 - 2018. *Preprint*. <https://doi.org/10.1101/2022.06.10.22276235>
6. Alonso-Palomares, L. A., M. Moreno-García, H. Lanz-Mendoza e M. I. Salazar (2018). Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Intervirology*, 61(6), 255–264. <https://doi.org/10.1159/000499128>
7. António, V. S., A. F. Muianga, J. Wieseler, S. A. Pereira, V. O. Monteiro, F. Mula, I. Chelene, I. S. Chongo, J. Oludele, B. M. Kummerer e E. S. Gudo (2018). Seroepidemiology of Chikungunya Virus Among Febrile Patients in Eight Health Facilities in Central and Northern Mozambique, 2015–2016. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 18 (6):311 – 316. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2227>

8. António, V. S., N. A. Amade, A. F. Muianga, S. Ali, V. Monteiro, F. Mula, I. Chelene, J. Oludele, I. Chongo, A. Jose, O. Augusto e E. S. Gudo (2019). Retrospective investigation of antibodies against chikungunya virus (CHIKV) in serum from febrile patients in Mozambique, 2009–2015: Implications for its prevention and control. *PLOS ONE*, 14(3): 1 – 11. <https://doi:10.1371/journal.pone.0213941>
9. Appassakij, H., P. Khuntikij, M. Kemapunmanus, R. Wutthanarungsan, e K. Silpapojakul, (2013). Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion*, 53: 2567 – 2574. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03960.x>
10. Bettis, A. A., M. L'Azou Jackson, I. K. Yoon, J. G. Breugelmans, A. Goios, D. J. Gubler e A. M. Powers (2022). The global epidemiology of chikungunya from 1999 to 2020: A systematic literature review to inform the development and introduction of vaccines. *PLoS neglected tropical diseases*, 16 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010069>
11. Calvo, E. P., E. D. Archila, L. López e J. E. Castellanos, (2021). Rediscovering the chikungunya virus. Reconociendo el virus del chikunguña. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 41(2), 353–373. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5797>
12. Carrillo-Hernández, M. Y., J. Ruiz-Saenz, L. J. Villamizar, S. Y. Gómez-Rangel e M. Martínez-Gutierrez (2018). Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infectious Disease*, 18 (61): <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>
13. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) (2022). *Chikungunya virus*. [<https://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/index.html>]. Consultado a 05 de Fevereiro de 2024.
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2024). *Clinical Testing and Diagnosis for Chikungunya Virus Disease*. [<https://www.cdc.gov/chikungunya/hcp/diagnosis-testing/index.html>]. Consultado a 24 de Maio de 2024.
15. Chakrabartty, I., M. Khan, S. Mahanta, H. Chopra, M. Dhawan, O. P. Choudhary, S. Bibi, Y. K. Mohanta, T. B. Emran (2022). Comparative overview of emerging

- RNA viruses: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and current treatment. *Annals of medicine and surgery*, 79: 103985. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103985>
16. Chatterjee, S. S., A. Sharma, S. Choudhury, S. K. Chumber, M. Kaur, R. Bage, N. Parkhe, e U. Khanduri (2016). Significance of IgG optical density ratios (index value) in single reactive anti-Dengue virus IgG capture ELISA. *Iranian journal of microbiology*, 8(6), 395–400.
17. Chelene, I. R., S. Ali, F. I. Mula, A. F. Muianga, V. O. Monteiro, J. Oludele, I. S. Chongo, A. José, N. A. Amade, V. S. Antonio e E. S. Gudo (2019). Retrospective investigation of IgM antibodies against Zika virus in serum from febrile patients in Mozambique, 2009 –2015. *BMC Research Notes*, 12 (469). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4511-x>.
18. Chelluboina, S., S. Robin, S. Aswathyraj e G. Arunkumar (2019). Persistence of antibody response in chikungunya. *Virus disease*, 30 (3): 469 – 473. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00534-5>
19. da Silva, V. L. O. (2019). *Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e zika*. Dissertação de Mestrado. 103 pp. Ribeirão Preto. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade São Paulo.
20. De Weggheleire, A., A. Nkuba-Ndaye, P. Mbala-Kingebeni, J. Mariën, E. Kindombe-Luzolo, G. Ilombe, D. Mangala-Sonzi, G. Binene-Mbuka, B. De Smet, F. Vogt, P. Selhorst, M. Matungala-Pafubel, F. Nkawa, F. Vulu, M. Mossoko, E. Pukuta-Simbu, E. Kinganda-Lusamaki, W. Van Bortel, S. Ahuka-Mundeki (2021). A Multidisciplinary Investigation of the First Chikungunya Virus Outbreak in Matadi in the Democratic Republic of Congo. *Viruses*, 13(10), 1988. <https://doi.org/10.3390/v13101988>.
21. Gainor, E. M., E. Harris e A. D. LaBeaud (2022). Uncovering the Burden of Dengue in Africa: Considerations on Magnitude, Misdiagnosis, and Ancestry. *Viruses*, 14, 233. <https://doi.org/10.3390/v14020233>
22. Genderen, F. T., I. Krishnadath, R. Sno, M. G. Grunberg, W. Zijlmans e M. R. Adhin (2016). First chikungunya outbreak in Suriname: clinical and epidemiological features. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10 (4): 1 – 18. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004625>

23. Giesen, C., Z. Herrador e D. Gomez-Barroso (2022) Climate change, environmental factors and dengue in Africa. *International Journal of Infectious Diseases*, 116: S1–S130. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.053>
24. Gudo, E. S., G. Pinto, S. Vene, A. Mandlaze, A. F. Muianga, J. Cliff, e K. Falk (2015). Serological Evidence of Chikungunya Virus among Acute Febrile Patients in Southern Mozambique. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004146>
25. Gudo ES, Black JFP, Cliff JL (2016) Chikungunya in Mozambique: A Forgotten History. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(11): e0005001. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005001>
26. Gudo, E. S., K. Falk e J. Clif (2018). Historical Perspective of Arboviruses in Mozambique and Its Implication for Current and Future Epidemics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1062: 11 – 18. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_2
27. Guiérrez-Bugallo, G., A. Boullis, Y. Martinez, L. Hery, M. Rodriguez, J. A. Bisset e A. Vega-Rúa (2020). Vector competence of *Aedes aegypti* from Havana, Cuba, for dengue virus type 1, chikungunya, and Zika viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(12): 1 – 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008941>
28. Hakim, M., L. Annisa, F. Gazali e A. Aman (2022). The origin and continuing adaptive evolution of chikungunya virus. *Archives of Virology*, 167: 2443–2455. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-022-05570-z>
29. Harapan, H., A. Michie, R. T. Sasmono, & A. Imrie (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, 12(8), 829. <https://doi.org/10.3390/v12080829>.
30. Her, Z., T. S. Teng, J. J. Tan, T. H. Teo, Y. W. Kam, F. M. Lum, W. W. Lee, C. Gabriel, R. Melchiotti, A. K. Andiappan, V. Lulla, A. Lulla, M. K. Win, A. Chow, S. K. Biswas, Y. S. Leo, M. Lecuit, A. Merits, L. Rénia, e L. F. Ng (2015). Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO Molecular Medicine*, 7(1), 24–41. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404459>
31. INE (2019). *Anuário Estatístico da Província da Zambézia*. Moçambique. [<https://www.ine.gov.mz/web/guest/d/anuario-zambezia-pdf-adobe-acrobat-professional>]. Consultado a 16 de Novembro de 2023.

32. Instituto Nacional de Estatística (INE) e International Classification of Functioning, Disability and Health (IFC) (2024). *Inquérito Demográfico e de Saúde em Moçambique 2022 – 23*. Maputo, Moçambique e Rockville, Maryland, EUA: INE e ICF.
33. Jain, J., N. Kaur, S. L. Haller, A. Kumar, S. L. Rossi, V. Narayanan, D. Kumar, R. Gaiind, S. C. Weaver, A. J. Auguste e S. Sunil (2020). Chikungunya Outbreaks in India: A Prospective Study Comparing Neutralization and Sequelae during Two Outbreaks in 2010 and 2016. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(4), 857–868. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0481>
34. Jing, L. H., B. Ake, S. M. Adhiambo, S. Jan e R. Joacim (2019). Estimating Past, Present, and Future Trends in the Global Distribution and Abundance of the Arbovirus Vector *Aedes aegypti* Under Climate Change Scenarios. *Frontiers in Public Health*, 7: 1- 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00148>
35. Kabir, M. A., H. Zilouchian, M. A. Younas e W. Asghar (2021). Dengue Detection: Advances in Diagnostic Tools from Conventional Technology to Point of Care. *Biosensors*, 11 (7): 206. <https://doi.org/10.3390/bios11070206>
36. Kam, Y., W. W. Lee, S. Simarmata, S. Harjanto, T. Teng, H. Tolou, A. Chow, R.T. Lin, Y. Leo, L. Renia, L. F, Ng (2012). Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. *Journal of Virology*, 86(23): 13005-13015. <https://doi.org/10.1128/jvi.01780-12>
37. Khongwicht, S., J. Chansaenroj, C. Chirathaworn e Y. Poovorawan (2021). Chikungunya virus infection: molecular biology, clinical characteristics, and epidemiology in Asian countries. *Journal of Biomedical Science*, 28: 84 – 101. <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00778-8>
38. Kikuti, M. B., L. Tauro, P. Moreira, L. Nascimento, M. Portilho, G. Soares, S. Tecelão, M. Reisa, U. Kitrona, G. Ribeiro (2020). Avaliação de dois imunoenaios enzimáticos (ELISA) IgM para vírus chikungunya disponíveis comercialmente em um cenário de transmissão concomitante dos vírus chikungunya, dengue e Zika. *Internacional Journal for Infectious Diseases*, 91: 38 – 43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.11.001>

39. Kuno, G (2015). A Re-Examination of the History of Etiologic Confusion between Dengue and Chikungunya. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (11): 1 – 11. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004101>
40. Langsjoen, R. M., S. L. Haller, C. J. Roy, H. Vinet-Oliphant, N. A. Bergren, J. H. Erasmus, J. A. Livengood, T. D. Powell, S. C. Weaver e S. L. Rossi (2018). Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. *mBio Journal*, 9 (2), 1 – 13. <https://doi.org/10.1128/mBio.02449-17>
41. Lee, H., J. H. Ryu, H. S. Park, K. H. Park, H. Bae, S. Yun, A. R. Choi, S. Y. Cho, C. Park, D. G. Lee, J. Lim, J. Lee, S. Lee, S. Shin, H. Park, e E. J. Oh (2019). Comparison of Six Commercial Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus Non-Structural-1 Antigen and IgM/IgG Antibodies. *Annals of laboratory medicine*, 39(6), 566 – 571. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.6.566>
42. Leta, Samson, T. J. Beyene, E. M. Clercq, K. Amenua, M. U. Kraemer e C. W. Revie (2018). Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *International Journal of Infectious Diseases* 67: 25 – 35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>
43. Lima, M. Q., R. C. de Lima, E. L. de Azeredo e F. B. dos Santos (2021). Analysis of a Routinely Used Commercial Anti-Chikungunya IgM ELISA Reveals Cross-Reactivities with Dengue in Brazil: A New Challenge for Differential Diagnosis? *Diagnostic (Brasileia)*, 11(5): 819. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050819>
44. Lum, F. e L. Ng (2015). Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Research*, 120: 165 – 174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>.
45. Lumsden, W. H. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory,- in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 33–57. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90081-X)
46. Majumdar, A., P. K. Jana (2022). *Chapter 2 - Emerging viral diseases*. In: Dhara, A. K., A. K. Nayak (Editors). *Viral Infections and Antiviral Therapies*. Pp 25 – 37. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91814-5.00024-6>
47. Merle, H., A. Donnio, A. Jean-Charles, J. Guyomarch, R. Hage, F. Najioullah, R. Césaire e A. Cabié (2018). Ocular manifestations of emerging arboviruses:

- Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 41 (6): 235 – 243. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.05.002>
48. Ministério da Administração Estatal e Função Pública (MAEFP) (2020). *Relatório da Avaliação Anual de Desempenho do Município da Cidade de Quelimane*. AAD #1 – Ano de 2020. 38 Pp. Maputo. EUROSIS.
49. Ministerio da Saude (MISAU) , Instituto Nacional de Saúde (INS) e Organizacao Mundial da Saúde (OMS) (2019). Ciclones Tropicais Idai e Kenneth Moçambique: Relatório da Situação Nacional 8. MISAU. [<https://www.afro.who.int/pt/publications/ciclones-tropicais-idai-e-kenneth-mocambique-relatorio-da-situacao-nacional-8>]. Consultado a 12 de Março de 2024.
50. Mugabe, V., S. Ali, I. Chelene, V. Monteiro, O. Guiliche, A. Muianga, F. Mula, V. Antonio, I. Chongo, J. Oludele, K. Falk, I. Paploski, M. Reis, U. Kitron, B. Kümmerer, G. Ribeiro, E. S. Gudo (2018). Evidence for chikungunya and dengue transmission in Quelimane, Mozambique: Results from an investigation of a potential outbreak of chikungunya virus. *Plos One*. 13 (2): 1 – 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192110>
51. Mugabe, V. A., E. S. Gudo, O. F. Inlamea, U. Kitron e G. S. Ribeiro (2021). Natural disasters, population displacement and health emergencies: multiple public health threats in Mozambique *BMJ Global Health*, 6(9): 1 – 11. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2021-006778>
52. Mugabe, V. A., O. F. Inlamea, S. Ali, P. Maholela, B. Melchior, A. Muianga, J. Oludele, A. Sumail, V. Antonio, O. Monteiro, I. Chongo, U. Kitron, S. Ribeiro e E. S. Gudo (2023). Surveillance for arboviruses and leptospirosis among non-malarial acute febrile illness outpatients in areas affected by Cyclones Idai and Kenneth in Mozambique. *Frontiers in Tropical Diseases*, 4; 1 – 7. <https://doi.org/10.3389/fitd.2023.1091545>
53. Muleia, R., G. Maúre, A. José, P. Maholela, I. A. Adjei, M. R. Karim, S. Trigo, W. Kutane, O. Inlamea, L. N. Kazembe e T. Marrufo (2024). Assessing the Vulnerability and Adaptation Needs of Mozambique's Health Sector to Climate: A Comprehensive Study. *International journal of environmental research and public health*, 21(5), 532 – 553. <https://doi.org/10.3390/ijerph21050532>

54. Muianga, A., G. Pinto, M. Massangaie, S. Ali, J. Oludele, A. Tivane, K. Falk, N. Lagerqvist e E. Gudo (2018). Antibodies Against Chikungunya in Northern Mozambique During Dengue Outbreak, 2014. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 18(8):445 – 449. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2261>
55. Neto, H. P., C. V. Roca, T. M. Correia, N. M. Silva, B. A. Chaves, N. F. Secundino, P. F. Pimenta e F. F. Melo (2022). Natural vertical cotransmission of Dengue virus and Chikungunya virus from *Aedes aegypti* in Brumado, Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 55. 1 – 5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0427-2021>
56. Ngouanet, S., S. Wanji, A. Yadouleton, M. Demanou, R. Djouaka e F. Nanfack-Minkeu (2022). Factors enhancing the transmission of mosquito-borne arboviruses in Africa. *Virusdisease*, 33(4), 477 – 488. <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00795-7>
57. Office for the Coordination of Humanitarian Affairs (OCHA) (2023). Mozambique: Tropical Cyclone Freddy, Floods and Cholera – Situation Report No.2. OCHA Mozambique. Disponível em [\[https://mozambique.un.org/pt/232086-ciclone-tropical-freddy-enchentes-e-c%C3%B3lera-relat%C3%B3rio-de-situa%C3%A7%C3%A3o-n%C2%BA-2\]](https://mozambique.un.org/pt/232086-ciclone-tropical-freddy-enchentes-e-c%C3%B3lera-relat%C3%B3rio-de-situa%C3%A7%C3%A3o-n%C2%BA-2), consultado 03 de Março de 2024.
58. Oludele, J., B. Lesko, I. M. Gundane, F. Nogueira, A. Muianga, S. Ali, F. Mula, I. Chelene, K. I. Falk, F. B. dos Santos e E. S. Gudo (2017). Dengue Virus Serotype 2 Established in Northern Mozambique (2015–2016). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5): 1418 – 1422. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0317>
59. Owolabi, J. B., C. M. Mamah, C. C. Okoro, e C. A. Iheanacho, (2016). Febres hemorrágicas virais humanas reemergentes: uma revisão. *American Journal of Infectious Diseases and Microbiology*, 4 (4), 79-90. <http://doi:10.12691/ajidm-4-4-3>
60. Paixão, E. S., M. G. Teixeira e L. C. Rodrigues (2017). Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. *BMJ Glob Health*, 3: 1 – 6. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000530>
61. Pan American Health Organization (PAHO) (2017). *Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases*. Washington. 102Pp. PAHO.

62. Pan American Health Organization (PAHO) (2023). *Recommendations for laboratory detection and diagnosis of arbovirus infections in the Region of the Americas*. 64Pp. Washington. PAHO e WHO.
63. Poh, C., Y. Chan, e L. Ng, (2020). Role of T Cells in Chikungunya Virus Infection and Utilizing Their Potential in Anti-Viral Immunity. *Frontiers in immunology*, 11, 287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00287>.
64. Robert, M. A., A. M. Stewart-Ibarra e E. L. Estallo (2022). Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. *Current Opinion in Virology*, 40: 41 – 47. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.05.001>
65. Sagar, R., S. Raghavendhar, V. Jain, N. Khan, A. Chandele, A. Patel, M. Kaja, P. Ray, N. Kapoor (2024). Viremia and clinical manifestations in acute febrile patients of Chikungunya infection during the 2016 CHIKV outbreak in Delhi, India. *Infectious Medicine*, 3 (1): 1 - 6. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2024.100088>
66. Sánchez-Arcila, J. C., J. Badolato-Correa, T. M. de Souza, I. A. Paiva, L. S. Barbosa, P. C. Nunes, M. Q. Lima, F. B. dos Santos, P. V. Damasco, R. V. da Cunha, E. L. de Azeredo, L. M. Oliveira-Pinto (2020). Clinical, Virological, and Immunological Profiles of DENV, ZIKV, and/or CHIKV-Infected Brazilian Patients. *Intervirology*, 63(1-6): 33 – 45. <https://doi.org/10.1159/000510223>
67. Schwartz, O. e M. Albert (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Natural Reviews Microbiology*, 8: 491 – 500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>
68. Silva, L. A. e T. S. Dermody (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of clinical investigation*, 127(3), 737–749. <https://doi.org/10.1172/JCI84417>
69. Simon, F., E. Javelle, A. Cabie, E. Bouquillard, O. Troisgros, G. Gentile, I. Leparç-Goffart, B. Hoen, F. Gandjbakhch, P. Rene-Corail, J. Franco, E. Caumes, B. Combe, S. Poiraudau, F. Gane-Troplent, F. Djossou, T. Schaerverbeke, A. Criquet-Hayot, P. Carrere, D. Malvy, P. Gaillard, D. Wendling e Société de pathologie infectieuse de langue française (2015). French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). *Medecine et maladies infectieuses*, 45(7), 243 – 263. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>

70. Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (2009). *Fundamentos de química analítica: Capítulo 24 – Introdução aos Métodos Espectroquímicos*. 670 – 703 Pp. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning.
71. Srivastava, P., A. Kumar, A. Hassan, D. Mehta, R. Kumar, C. Sharma, S. Sunil (2020). Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? *Frontiers in Immunology*, 11 (695): 1 – 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00695>
72. Staples, J. E., S. Hills, A. Powers (2023). *Chikungunya: CDC Yellow Book 2024 Travel-Associated Infections & Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention. [<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/chikungunya>]. Consultado a 02 de Março de 2024.
73. Tanabe, I., E. Tanabe, E. Santos, W. Martins, I. Araújo, M. Cavalcante, A. Lima, N. Câmara, L. Anderson, D. Yunusov e Ê. Bassi, (2018). Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 345. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00345>
74. Taylor, M. e J.O. Rayner (2023). Immune Response to Chikungunya Virus: Sex as a Biological Variable and Implications for Natural Delivery via the Mosquito. *Viruses*, 15 (9): 1869. <https://doi.org/10.3390/v15091869>
75. Teo, T., F. Lum, C. Claser, V. Lulla, A. Lulla, A. Merits, L. Rénia, L. Ng (2013). A Pathogenic Role for CD4+ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. *Journal of Immunology*; 190 (1): 259–269. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202177>
76. Teo, T., Z. Her, J. L. Tan, F. Lum, W. Lee, Y. Chan, R. Ong, Y. Kam, I. Goffart, P. Gallian, L. Rénia, X. Lamballerie e L. Ng (2015). Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *Journal of Virology*, 89 (15): 7955 – 7969. <https://doi.org/10.1128/jvi.00909-15>
77. Vairo, F., N. Haider, R. Kock, F. Ntoumi, G. Ippolito, e A. Zumla (2019). Chikungunya. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(4): 1003–1025. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.006>
78. Weaver, S. e W. Reisen (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>

79. WHO (2022). *Chikungunya*. [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>]. Consultado a 05 de Fevereiro 2024.
80. Zeller, H., W. V. Bortel, B. Sudre (2016). Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014, *The Journal of Infectious Diseases*, 214, (5): 436 – 440. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw391>

13. ANEXOS

Tabela 5: Relação entre sinais e sintomas com as medidas das densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA IgM anti-Chikungunya vírus

Sintoma	Resposta	Visita 1			Visita 2			Visita 3			Visita 4		
		N	DO450nm IgM	P-valor	N	DO450nm IgM	P-valor	N	DO450nm IgM	P-valor	N	DO450nm IgM	P-valor
Temperatura axial (Media $\pm$ DP)*	NA	37.75 $\pm$ 0.09 ^a	1.48 (1.91 – 1.27)	0.091	36.47 $\pm$ 0.11 ^b	2.11 (2.8-1.49)	0.116	36.65 $\pm$ 0.74 ^b	2.19 (2.70 – 1.38)	0.663	36.71 $\pm$ 0.11 ^b	1.77 (2.71 -1.35)	0.993
DF(Mediana, IQR)*	NA	2(3.0-1.7)	1.48 (1.91 – 1.27)	0.560	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefaleia	Sim	51	1.52 (1.91 - 1.29)	0.044	11	1.95 (2.46 -1.19)	0.254	9	2.42 (2.49 - 2.19)	0.184	4	2.21 (4.13 -1.40)	0.851
	Não	2	1.16 (1.20 - 1.13)		21	2.18 (2.83 -1.76)		35	2.10 (2.77 - 1.33)		20	1.77 (2.19 -1.37)	
Anorexia	Sim	18	1.31 (1.87 - 1.20)	0.067	0	-	NA	1	1.23 (1.23 - 1.23)	0.273	0	-	NA
	Não	35	1.59 (1.91 - 1.37)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.41)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Fraqueza	Sim	32	1.51 (1.91 - 1.27)	0.870	5	1.61 (3.18 -1.27)	0.545	5	1.78 (2.45 - 1.44)	0.494	2	3.49 (5.41 -1.58)	0.522
	Não	21	1.45 (1.87 - 1.27)		27	2.18 (2.71 -1.64)		39	2.19 (2.84 - 1.35)		22	1.77 (2.27 -1.34)	
Calafrio	Sim	30	1.42 (1.79 - 1.25)	0.092	1	1.32 (1.32 -1.32)	0.438	1	3.62 (3.62 - 3.62)	0.227	0	-	NA
	Não	23	1.61 (2.39 - 1.37)		31	2.18 (2.83 -1.61)		43	2.19 (2.63 - 1.35)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Mialgia	Sim	24	1.46 (1.74 - 1.26)	0.321	0	-	NA	1	3.62 (3.62 - 3.62)	0.227	0	-	NA
	Não	29	1.59 (2.19 - 1.31)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.63 - 1.35)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Altragia	Sim	35	1.52 (2.19 - 1.29)	0.511	2	1.31 (1.45 -1.17)	0.081	9	2.04 (3.06 - 1.78)	0.710	2	3.49 (5.41 -1.58)	0.522
	Não	18	1.47 (1.79 - 1.27)		30	2.20 (2.83 -1.64)		35	2.19 (2.63 - 1.34)		22	1.77 (2.27 -1.34)	
Erupção cutânea	Sim	1	3.70 (3.70 - 3.70)	0.226	0	-	NA	0	-	NA	1	1.79 (1.79 -1.79)	0.952
	Não	52	1.48 (1.89 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.35)		20	1.71 (2.56 -1.37)	
Prurido	Sim	2	1.40 (1.42 - 1.39)	0.581	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	51	1.52 (1.91 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.35)		21	1.76 (2.27 -1.39)	
Conjuntivite	Sim	0	-	NA	1	2.50 (2.50 -2.50)	0.710	0	-	NA	1	5.41 (5.41 -5.41)	0.087
	Não	52	1.51 (1.91 - 1.28)		30	2.11 (2.83 -1.45)		40	2.19 (2.80 - 1.38)		22	1.77 (2.27 -1.34)	

Dor Retro-orbital	Sim	3	1.13 (1.20 - 1.12)	0.002	0	-	NA	0	-	NA	1	1.86 (1.86 -1.86)	0.957
	Não	49	1.53 (1.91 - 1.35)		31	2.18 (2.83 -1.45)		40	2.19 (2.80 - 1.38)		22	1.77 (2.85 -1.34)	
Dor de garganta	Sim	4	1.54 (5.14 - 1.33)	0.709	0	-	NA	1	1.44 (1.44 - 1.44)	0.636	0	-	NA
	Não	49	1.50 (1.91 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.35)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Otorreia	Sim	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	53	1.50 (1.91 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Tosse	Sim	4	1.36 (1.60 - 1.12)	0.180	0	-	NA	2	1.92 (2.49 - 1.35)	0.888	1	5.41 (5.41 -5.41)	0.87
	Não	49	1.50 (1.91 - 1.29)		31	2.18 (2.83 -1.61)		42	2.19 (2.77 - 1.41)		22	1.72 (2.27 -1.34)	
Corrimento nasal	Sim	3	1.66 (1.68 - 1.16)	0.825	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	49	1.50 (1.91 - 1.29)		31	2.18 (2.83 -1.61)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		23	1.79 (2.85 -1.34)	
Congestão Nasal	Sim	2	2.48 (3.70 - 1.25)	0.798	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	50	1.51 (1.91 - 1.29)		31	2.18 (2.83 -1.61)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		23	1.79 (2.85 -1.34)	
Dispneia	Sim	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	52	1.51 (1.91 - 1.28)		31	2.18 (2.83 -1.61)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		23	1.79 (2.85 -1.34)	
Dores Peito	Sim	4	1.41 (1.45 - 1.29)	0.308	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	48	1.56 (1.92 - 1.28)		31	2.18 (2.83 -1.61)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		23	1.79 (2.85 -1.34)	
Vomito	Sim	3	3.74 (4.60 - 1.13)	0.383	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	50	1.48 (1.87 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.35)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Diarreia	Sim	2	1.19 (1.25 - 1.13)	0.081	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	51	1.52 (1.91 - 1.29)		32	2.11 (2.77 -1.53)		43	2.19 (2.77 - 1.35)		24	1.77 (2.56 -1.37)	
Dor Abdominal	Sim	2	1.16 (1.18 - 1.13)	0.044	1	1.45 (1.45 -1.45)	0.500	2	1.28 (1.33 - 1.23)	0.109	1	5.41 (5.41 -5.41)	0.083
	Não	51	1.52 (1.91 - 1.29)		31	2.18 (2.83 -1.61)		41	2.22 (2.77 - 1.42)		23	1.76 (2.27 -1.34)	
Melena	Sim	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA	0	-	NA
	Não	53	1.50 (1.91 - 1.27)		32	2.11 (2.77 -1.53)		44	2.19 (2.70 - 1.38)		24	1.77 (2.56 -1.37)	

Legenda: NA – Não aplicável; **a e b** – Diferenças significativas pelo teste Tukey; “–” Sem informações; DF – Duração da febre; **p-value** - teste de Teste U de Mann-Whitney ou correlação de Spearman (*)

Tabela 6: Relação entre sinais e sintomas com as medidas das densidades ópticas do teste imunoenzimático ELISA IgG anti-Chikungunya vírus

Sintoma	Resposta	Visita 1			Visita 2			Visita 3			Visita 4		
		N	DO450nm IgG	P-valor	N	DO450nm IgG	P-valor	N	DO450nm IgG	P-valor	N	DO450nm IgG	P-valor
Temperatura axial (Media $\pm$ DP)	NA	37.36 $\pm$ 0.66 ^a	3.22 (3.97 – 2.50)	0.75	36.84 $\pm$ 0.69 ^b	2.45 (3.40 – 1.99)	0.462	36.70 $\pm$ 0.78 ^b	2.74 (3.42 – 2.33)	0.250	36.63 $\pm$ 0.92 ^b	2.54 (2.94 – 2.34)	0.634
DF (Mediana, IQR)	NA	3 (4 – 2)	3.22 (3.97 – 2.50)	0.163	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cefaleia	Não	3	3.25 (3.82 - 2.32)	0.843	60	2.50 (3.49 - 1.95)	0.681	61	2.75 (3.43 - 2.33)	0.445	36	2.50 (2.89 - 2.32)	0.135
	Sim	131	3.19 (4.03 - 2.51)		15	2.42 (2.80 - 2.08)		6	2.56 (2.76 - 2.37)		4	2.91 (3.39 - 2.66)	
Anorexia	Não	71	3.16 (4.13 - 2.42)	0.873	74	2.45 (3.30 - 1.99)	0.347	66	2.74 (3.42 - 2.33)	0.866	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	63	3.24 (3.74 - 2.83)		1	3.58 (3.58 - 3.58)		1	2.66 (2.66 - 2.66)		0	. (. - .)	
Fraqueza	Não	51	3.04 (3.95 - 2.32)	0.243	64	2.42 (3.46 - 1.98)	0.799	64	2.75 (3.42 - 2.33)	0.356	39	2.57 (2.95 - 2.33)	0.850
	Sim	83	3.37 (4.04 - 2.55)		11	2.62 (2.96 - 2.32)		3	2.45 (2.68 - 2.35)		1	2.45 (2.45 - 2.45)	
Calafrio	Não	50	2.95 (3.82 - 2.35)	0.136	70	2.42 (3.43 - 1.99)	0.355	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	84	3.31 (4.06 - 2.71)		5	2.53 (3.30 - 2.51)		0	-		0	. (. - .)	
Mialgia	Não	89	3.16 (4.04 - 2.45)	0.386	70	2.45 (3.43 - 1.99)	0.959	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.53 (2.95 - 2.33)	0.600
	Sim	45	3.37 (3.70 - 2.98)		5	2.62 (2.96 - 2.08)		0	-		1	2.87 (2.87 - 2.87)	
Altragia	Não	31	2.90 (3.95 - 2.32)	0.321	63	2.47 (3.45 - 1.97)	0.828	58	2.78 (3.43 - 2.33)	0.358	38	2.55 (2.95 - 2.33)	0.785
	Sim	103	3.25 (4.04 - 2.63)		12	2.47 (3.13 - 2.24)		9	2.62 (2.76 - 2.37)		2	2.66 (2.87 - 2.45)	
Erupção cutânea	Não	127	3.19 (3.95 - 2.51)	0.448	70	2.45 (3.43 - 2.03)	NA	62	2.78 (3.43 - 2.37)	NA	36	2.55 (3.08 - 2.33)	0.541
	Sim	3	4.49 (4.71 - 1.47)		0	-		0	-		1	2.33 (2.33 - 2.33)	
Prurido	Não	125	3.18 (3.95 - 2.48)	0.081	70	2.45 (3.43 - 2.03)	NA	62	2.78 (3.43 - 2.37)	NA	37	2.53 (2.95 - 2.33)	NA
	Sim	5	4.04 (4.47 - 3.24)		0	-		0	-		0	-	
Conjuntivite	Não	132	3.22 (3.99 - 2.50)	NA	72	2.49 (3.38 - 2.06)	NA	62	2.75 (3.42 - 2.35)	NA	37	2.57 (2.95 - 2.33)	0.842
	Sim	0	-		0	-		0	-		1	2.45 (2.45 - 2.45)	
	Não	122	3.25 (4.03 - 2.45)	0.973	71	2.47 (3.45 - 2.03)	0.639	62	2.75 (3.42 - 2.35)	NA	37	2.53 (2.95 - 2.33)	0.789

Dor Retro-orbital	Sim	10	3.11 (3.54 - 2.86)		1	2.99 (2.99 - 2.99)		0	-		1	2.68 (2.68 - 2.68)	
Dor de garganta	Não	119	3.24 (3.95 - 2.45)	0.769	74	2.49 (3.43 - 1.99)	0.800	66	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.53 (2.91 - 2.33)	0.100
	Sim	13	3.16 (4.04 - 2.86)		1	2.32 (2.32 - 2.32)		0	-		1	3.83 (3.83 - 3.83)	
Otorreia	Não	130	3.22 (4.03 - 2.51)	0.305	74	2.49 (3.43 - 1.99)	NA	66	2.74 (3.42 - 2.33)	0.597	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	1	2.29 (2.29 - 2.29)		0	-		1	2.42 (2.42 - 2.42)		0	-	
Tosse	Não	127	3.24 (4.04 - 2.48)	0.324	67	2.51 (3.47 - 1.99)	0.477	65	2.73 (3.42 - 2.33)	0.565	38	2.57 (2.95 - 2.33)	0.850
	Sim	6	2.65 (3.43 - 2.55)		4	2.37 (2.52 - 1.94)		2	3.00 (3.19 - 2.80)		1	2.45 (2.45 - 2.45)	
Corrimento nasal	Não	126	3.22 (3.95 - 2.48)	0.432	70	2.49 (3.45 - 1.99)	0.789	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.57 (2.95 - 2.33)	NA
	Sim	7	3.42 (4.62 - 3.04)		1	2.32 (2.32 - 2.32)		0	-		0	-	
Congestão Nasal	Não	132	3.24 (3.99 - 2.52)	0.060	71	2.47 (3.45 - 1.99)	NA	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.57 (2.95 - 2.33)	NA
	Sim	1	1.47 (1.47 - 1.47)		0	-		0	-		0	-	
Dispneia	Não	132	3.24 (3.99 - 2.52)	0.451	71	2.47 (3.45 - 1.99)	NA	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.57 (2.95 - 2.33)	NA
	Sim	1	2.44 (2.44 - 2.44)		0	-		0	-		0	-	
Dores Peito	Não	124	3.18 (3.89 - 2.46)	0.100	70	2.49 (3.45 - 1.99)	0.789	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	39	2.57 (2.95 - 2.33)	NA
	Sim	9	4.20 (4.49 - 3.07)		1	2.32 (2.32 - 2.32)		0	-		0	-	
Vomito	Não	130	3.24 (3.95 - 2.51)	0.520	72	2.49 (3.37 - 2.04)	NA	65	2.75 (3.42 - 2.35)	NA	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	3	2.53 (4.13 - 2.15)		0	-		0	-		0	-	
Diarreia	Não	130	3.22 (3.95 - 2.48)	0.300	72	2.49 (3.37 - 2.04)	NA	65	2.75 (3.42 - 2.35)	NA	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	3	3.49 (4.63 - 3.16)		0	-		0	-		0	-	
Dor Abdominal	Não	121	3.24 (3.95 - 2.48)	0.660	68	2.49 (3.32 - 2.04)	0.934	64	2.75 (3.42 - 2.34)	0.862	39	2.57 (2.95 - 2.33)	0.850
	Sim	12	3.20 (3.91 - 2.89)		4	2.80 (3.41 - 1.91)		1	2.66 (2.66 - 2.66)		1	2.45 (2.45 - 2.45)	
Melena	Não	131	3.19 (3.95 - 2.48)	0.070	75	2.47 (3.43 - 1.99)	NA	67	2.74 (3.42 - 2.33)	NA	40	2.55 (2.93 - 2.34)	NA
	Sim	2	4.39 (4.65 - 4.13)		0	-		0	-		0	-	

Legenda: NA – Não aplicável; **a e b** – Diferenças significativas pelo teste Tukey; “–” Sem informações; DF – Duração da febre; **p-value** - teste de Teste U de Mann-Whitney ou correlação de Spearman (*)

Tabela 7: Matriz de recolha de dados para o presente estudo

ID do Participante	Idade	Sexo	Nível de Escolaridade	Dias início de sintomas	Resultado IgM(1,2,3,4)	DO -IgM (1,2,3,4)	Resultado IgG (1,2,3,4)	DO-IgG (1,2,3,4)	Temperatura axial (1,2,3,4)	Duração da febre	Sintomas (diversos) – 1,2,3,4
PMB0001											
PMB0002											
.....											

Ledenda:

- **ID do participante:** Códigos PMB de cada participante;
- **1, 2, 3 e 4:** visita 1, visita 2, visita 3 e visita 4;
- **Idade:** maior ou igual a 12 anos de idade;
- **Sexo:** Masculino e Feminino;
- **Nível de escolaridade:** Nenhum, primário, secundário, técnico profissional e universitário;
- **Resultado IgM/IgG:** Positivo, Indeterminado e Negativo;
- **DO-IgM/IgG:** cálculo dos cut-offs a partir das absorvâncias
- **Dias de início de sintomas:** menor ou igual a 7 dias
- **Temperatura axial:** temperatura medida em °C;
- **Duração da febre:** apenas na visita 1
- **Sintomas:** cefaleia, anorexia, fraqueza, calafrio, mialgia, artralgia, prurido, conjuntivite, dor retro-orbital, dor de garganta, otorreia, tosse, corrimento nasal, congestão nasal, dispnea, dores no peito, vômitos, diarreia, dor abdominal e melena

Anexo 2: Autorização ética para colheita de amostras e recolha de dados para o estudo



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE
MINISTÉRIO DA SAÚDE
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE
IRB00002657

Exma. Senhora
Dra. Sádía Ali Pereira
INS

Ref:220/CNBS/21

Data 26 de Abril de 2021

Assunto: Renovação da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "*Epidemiological, Immunological and Entomological Investigation of Arbovirus in 11 districts in Mozambique (ARBOMAP)*"

O Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) analisou o pedido de renovação anual da aprovação do protocolo de estudo intitulado: "*Epidemiological, Immunological and Entomological Investigation of Arbovirus in 11 districts in Mozambique (ARBOMAP)*", e sobre o mesmo o CNBS chegou a seguinte conclusão:

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a continuação do estudo, o CNBS dá a autorização.

Todavia, recomenda aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.

A presente renovação tem a validade de um ano, terminando esta a 26 de Abril de 2022. Os investigadores deverão submeter o pedido de continuação do estudo um mês antes de terminar o prazo.

Sem mais de momento, queiram aceitar as nossas cordiais saudações.

O Presidente

Dr. João Fernando Lima Schwalbach

C/c: CIBS-INS

Endereço:

Ministério da Saúde - 2º andar dto
Av. Eduardo Mondlane / Salvador Allende
Maputo - Moçambique

C.Postal: 264
Telefone: +258 82 406 6350
E-mail: cnbsmocambique@gmail.com

Anexo 3: Autorização para o uso da base de dados do Estudo ImmunoCHIKV



INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

Prezado Coordenador do Estudo ImmunoCHIKV
Doutor Osvaldo Inlamea

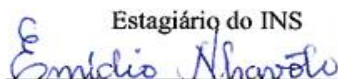
Marracuene, 09 de Setembro de 2024

Assunto: Solicitação da autorização para o uso da base de dados do Estudo Epidemiológico-Imunológico do vírus Chikungunya (ImmunoCHIKV)

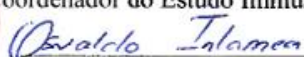
Emídio Fernando Nhavoto, estudante finalista do curso de Licenciatura em Biologia Aplicada no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane e estagiário de culminação do curso como técnico do laboratório de isolamento viral na Repartição de Virologia do Instituto Nacional de Saúde, no âmbito da Vigilância de Doenças Emergentes e Re-emergentes, venho por este meio solicitar a V. Excia, se digne autorizar o uso dos dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais do estudo ImmunoCHIKV para análises e interpretação dos dados no âmbito da elaboração do trabalho de culminação do curso com tema *“Avaliação quantitativa do teste imunoenzimático ELISA no quadro clínico da infecção e diagnóstico do vírus Chikungunya”*. Com o seu tema de culminação do curso, o estagiário visa explorar com mais detalhes outras formas possíveis de interpretação dos resultados dos testes de diagnóstico pelo método imunoenzimático ELISA em uso na Vigilância de Doenças Emergentes e Re-emergentes.

Em anexo as variáveis de interesse.

Atenciosamente,

Estagiário do INS

Emídio Fernando Nhavoto



Coordenador do Estudo ImmunoCHIKV

Osvaldo Frederico Inlamea, DVM, PhD

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE

Anexo: Variáveis de interesse

Das diversas variáveis incluídas no âmbito da colheita de dados das pesquisas principais usadas para as análises no presente estudo, foram consideradas apenas as seguintes variáveis:

- Dados demográficos: sexo, idade, bairro e posto administrativo;
- Resultado do diagnóstico laboratorial ELISA para captura IgG e IgM anti-CHIKV nas visitas 1, 2, 3 e 4;
- O valor numérico da medida das densidades ópticas (DO_{450nm}) correspondentes a todos os resultados do laboratório das amostras testadas;
- Data da colheita da amostra;
- Informação clínica do paciente: todos os sinais e sintomas das visitas 1, 2, 3 e 4.