



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: EPIDEMIOLOGIA**

VÂNIO ANDRÉ MUGABE

**ESTUDO ECO-EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE ARBOVIROSES
NA CIDADE DE QUELIMANE – MOÇAMBIQUE**

Salvador – Bahia

2017

VÂNIO ANDRÉ MUGABE

**ESTUDO ECO-EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE ARBOVIROSES
NA CIDADE DE QUELIMANE – MOÇAMBIQUE**

Dissertação sob a forma de Artigo apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva do Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva.

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro

Salvador – Bahia

2017

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M951e Mugabe, Vánio André
Estudo eco-epidemiológico sobre a ocorrência de arboviroses na cidade de Quelimane -
Moçambique. / Vánio André Mugabe .- 2017.
67 f.; 30 cm

Orientador: Guilherme de Sousa Ribeiro

Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de
Saúde Coletiva, 2017.

1. Arboviroses 2. Dengue 3. Chikungunya 4. Doenças febris agudas 5. Entomologia
I. Título

CDU 616:91



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Saúde Coletiva
Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva

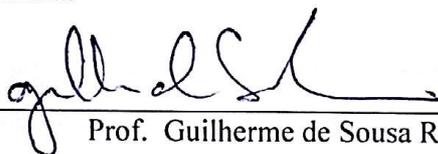
VÂNIO ANDRÉ MUGABE

Estudo eco-epidemiológico sobre a ocorrência de arboviroses na cidade de Quelimane - Moçambique.

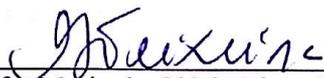
A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação, apresentada em sessão pública ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia.

Data de defesa: 31 de janeiro de 2017

Banca Examinadora:



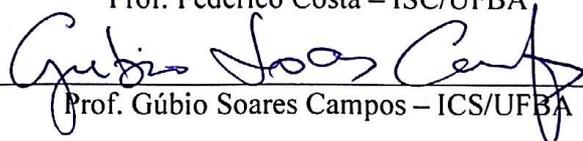
Prof. Guilherme de Sousa Ribeiro – ISC/UFBA



Prof. Maria da Glória Lima Cruz Teixeira – ISC/UFBA



Prof. Federico Costa – ISC/UFBA



Prof. Gúbio Soares Campos – ICS/UFBA

Salvador
2017

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela coragem, tranquilidade e esperanças que me dá para prosseguir caminhando,

Ao meu orientador, Professor Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro, por ter me dado a oportunidade de continuar com os estudos aqui no Brasil, por confiar nas minhas capacidades, pelo convívio, e paciência que sempre teve em me orientar durante a formação e na condução desta pesquisa;

Ao Dr. Eduardo Samo Gudo, por ter me dado a oportunidade de realizar a pesquisa em Moçambique e destinar parte dos recursos de projetos que desenvolve para a presente pesquisa. Os agradecimentos são extensivos para toda a equipe do Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, em especial para Dra. Gabriela Pinto, Dra. Sadia Ali, Dra. Ana Paula Abílio, Dra. Vanessa Onofre Monteiro, Argentina Felisbela Muianga, Imelda Chelene e Onélia Guiliche, que incansavelmente apoiaram a vigilância para doenças febris agudas, realizada na cidade de Quelimane.

Aos professores e funcionários do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia (ISC-UFBA);

À equipe, de alunos, orientada pelo Professor Guilherme: Aline da S. Tavares; Leila Camila Jacob; Igor A. D. Paploski; Laura Tauro; Mariana KiKuti; Monaise Madalena; Moreno Rodrigues; Patricia Moreira; Perla Santana; Raquel L. de Souza, com os quais aprendi muito sobre o trabalho em equipe.

Aos Professores Mitermayer G. Reis, Uriel Kitron, pelas ideias que deram durante a preparação do projeto.

Aos funcionários do departamento de saúde pública da direção provincial de saúde da Zambézia, médicos e clínicos dos centros de saúde onde se realizou a vigilância;

Aos pacientes que deram a sua contribuição participando na vigilância;

Agradeço a todos os colegas da turma, com os quais pude aprender e partilhar momentos ímpares durante a formação.

Aos meus amigos, Aquino A. Nhantumbo e José João Sumbana;

À minha família pelo apoio, incentivo e orações;

À minha esposa Brígida Francisco Xavier Lobo, pelo seu apoio incondicional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Ministério de Ciência e Tecnologia, Ensino Superior e Técnico Profissional de Moçambique, por terem me dado a oportunidade de continuar com os estudos;

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA), Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia (ISC - UFBA) e à Universidade Pedagógica de Quelimane (UPQ).

Para terminar, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Mugabe, VA. Estudo eco-epidemiológico sobre a ocorrência de arboviroses na cidade de Quelimane – Moçambique.

Resumo

Em Moçambique, existem poucas informações sobre a ocorrência de infecções por arbovírus. Este estudo teve como objetivos investigar a frequência e fatores associados ao diagnóstico de dengue, chikungunya e zika em pacientes atendidos por doenças febris agudas, nos centros de saúde, na cidade de Quelimane – Moçambique. Adicionalmente, inquéritos ambientais e entomológicos foram realizados nos domicílios e peri-domicílios dos participantes do estudo para estimar a densidade vetorial e identificar os principais locais de reprodução de mosquitos do gênero *Aedes*. O estudo teve um desenho transversal, baseado em dados da vigilância sentinela para doenças febris agudas, realizada prospectivamente na cidade de Quelimane pelo Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, entre fevereiro e junho de 2016. Foram incluídos no estudo 163 pacientes, cujas amostras de soro foram testadas para dengue, chikungunya e zika. Foram usados testes de imunoensaio enzimático (ELISA) IgM e IgG para detecção de infecções pelos vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV); testes imunocromatográficos rápidos (RDT, *rapid diagnostic test*) para DENV (NS1, IgM e IgG) e CHIKV (IgM) e reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa, em tempo real (qRT-PCR) Trioplex para DENV, CHIKV e ZIKV. O teste de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀) foi empregado em um subgrupo de amostras que foram positivas para CHIKV por ELISA IgG. Os participantes também foram testados para malária por um teste imunocromatográfico que detecta IgM. Os participantes incluídos no estudo foram caracterizados por meio de medidas de frequência relativa, de tendência central e de dispersão. Análises bivariada e multivariada de regressão log binomial foram usadas para verificar a existência de associação entre fatores sociodemográficos e a prevalência de anticorpos IgG anti-chikungunya. Razões de prevalência (RP) e intervalo de confiança de 95% foram estimados. Durante os inquéritos ambientais e entomológicas foram realizados busca por criadouros de *Aedes spp.*, coleta de larvas, instalação da ovitampas e obtenção das coordenadas geográficas dos domicílios visitados. Calculou-se o índice de positividade da ovitampa (IPO) e o índice de densidade de ovos (IDO) e utilizou-se o Qgis 2.14 para demarcação dos locais de residência dos pacientes em um mapa da Cidade. Dos 163 pacientes estudados, 35 (21,5%) tiveram o diagnóstico de malária. Não houve identificação de participantes com infecções por DENV, CHIKV e ZIKV através do qRT-PCR ou por soroconversão. Entretanto, dos 127 pacientes testados pelo RDT NS1 para dengue, 4 (3,2%) foram positivos e dos 104 pacientes testados pelo ELISA IgM para dengue, 1 (0,9%) foi positivo. Em relação à chikungunya, dos 163 pacientes testados, 17 (10,4%) foram positivos no ELISA IgM e 103 (63,2%) foram positivos no ELISA IgG. Maior idade e menor escolaridade associaram-se independentemente com a presença de IgG anti-CHIKV. A prevalência de anticorpos IgG anti-CHIKV foi 1,7 (IC95%: 1,3-2,1) vezes maior entre os pacientes com baixa escolaridade quando comparada àquela dos pacientes que no mínimo ingressaram no ensino secundário, mesmo após ajuste para faixa etária. As inspeções ambientais e entomológicas foram realizadas nos domicílios/peri-domicílios de 79 pacientes e em 16 (20,3%) das casas foram identificados imaturos de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*. Os criadouros onde havia imaturos foram: poços, pneus, cascas de coco, baldes, latas, tubo de esgoto e área com acúmulo de lixo. Em relação aos índices entomológicos, o Índice de Positividade da Ovitampa (IPO) foi de 25,0% (16/64) e o Índice de Densidade do Ovo (IDO) foi de 90,8 (1453/16) ovos por palheta. A disposição espacial dos endereços de residência dos pacientes com evidência laboratorial de infecção pregressa por CHIKV sugeriu que as infecções devem ocorrer em todas as áreas da Cidade. Concluiu-se que a dengue ocorre com baixa frequência na cidade de Quelimane enquanto que chikungunya deve apresentar transmissão endêmica. A identificação de grande densidade do mosquito vetor reforça que a cidade de Quelimane apresenta condições de manter uma transmissão autóctone de arbovírus.

Palavras-chave: arboviroses, dengue, chikungunya, zika, doenças febris agudas, entomologia, Quelimane.

Mugabe, VA. **Eco-epidemiological study of arboviruses occurrence in Quelimane city – Mozambique**

Abstract

In Mozambique, there is little information on the occurrence of arbovirus infections. The objective of this study was to investigate the frequency and characteristics associated with dengue, chikungunya or zika infections in patients that sought medical care for acute febrile illnesses in health centers of Quelimane city - Mozambique. Environmental and entomological surveys were carried out in the households and peridomestic environment of the study participants to estimate the vector density and to identify the main breeding sites of mosquitoes of the *Aedes* genus. The study had a cross-sectional design, based on data from sentinel surveillance for acute febrile illnesses, conducted prospectively in Quelimane city by the National Institute of Health of Mozambique between February and June 2016. The number of recruited patients in the study was 163, whose serum samples were tested for dengue, chikungunya and zika. IgM and IgG enzyme immunoassay (ELISA) tests were used to detect dengue virus (DENV) and chikungunya virus (CHIKV) infections; Rapid immunochromatographic tests (RDT, *rapid diagnostic test*) for DENV (NS1, IgM and IgG) and CHIKV (IgM) and Triplex real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the DENV, CHIKV and ZIKV virus. The plaque reduction neutralization test (PRNT₅₀) was used in a subgroup of samples that were CHIKV positive by ELISA IgG. Participants were also tested for malaria by an immunochromatographic test that detects IgM. Participants included in the study were demographically and clinically described using frequency, central tendency and dispersion measures. Bivariate and multivariate analyzes of binomial log regression were used to verify the existence of association between sociodemographic factors and the prevalence of anti-chikungunya IgG antibodies. Prevalence ratios (PR) and 95% confidence intervals were estimated. During the environmental and entomological surveys, breeding sites of *Aedes spp.* were sought, larvae were collected, ovitraps were installed and geographic coordinates obtained in the households that were visited. The egg positivity index (EPI) and egg density index (EDI) were calculated and Qgis 2.14 was used to geocode all patients point of residence. Of the 163 patients studied, 35 (21.5%) had malaria. There was no patient with acute infections of DENV, CHIKV and ZIKV, measured either qRT-PCR or by seroconversion. However, of the 127 patients tested by RDT NS1 for dengue, 4 (3.2%) were positive and 1 (0.9%) of the 104 patients tested by IgM for dengue was positive. Regarding chikungunya, of the 163 patients tested, 17 (10.4%) were positive in the IgM ELISA and 103 (63.2%) were positive in the IgG ELISA. Greater age and lower educational level were independently associated with the presence of anti-CHIKV IgG. The prevalence of anti-CHIKV IgG antibodies was 1.7 (95% CI: 1.3-2.1) times higher among patients with low educational level when compared to patients who at least attended secondary education, even after adjusting for age. Environmental and entomological inspections were carried out in the households/ peridomestic of 79 patients and in 16 (20.3%) of the houses, immature forms of *Aedes aegypti* mosquitoes were identified. Immature forms of *Aedes aegypti* mosquito were found in wells, tires, coconut shells, buckets, cans, sewage pipe and garbage accumulation areas. Regarding entomological indices, the EPI was 25.0% (16/64) and the EDI was 90.8 (1453/16) eggs per trap. The spatial distribution of households of patients with laboratory evidence of CHIKV infection suggests that infections occur in all areas of the city. Dengue occurs with low frequency in the city of Quelimane while chikungunya must present endemic transmission. The high mosquito density identified reinforces that Quelimane city presents conditions to maintain an autochthonous transmission of arboviruses.

Keywords: arbovirus, dengue, chikungunya, zika, acute febrile disease, diagnosis, entomology, Quelimane.

SIGLAS E ABREVIATURAS

% – percentagem

°C – graus Celsius

CDC – Center for Disease Control and Prevention

CHIKV – vírus Chikungunya

DENV – vírus Dengue

ELISA – imunoenensaio enzimático

EPI – egg positivity index

EDI – egg density index

Fig. – Figura

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

GPS – Sistema de Posicionamento Global

h – horas

IC – Intervalo de Confiança

IgG – Imunoglobulinas G

IgM – Imunoglobulinas M

INS – Instituto Nacional de Saúde

IPO – índice de positividade da ovitrampa

IDO – índice de densidade de ovo

IQR – Intervalo interquartil

ISC-UFBA – Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia

Km – quilômetro

Km² – quilômetro quadrado

mL – microlitros

mm – milímetros

mRDT – teste de diagnóstico rápido de malária (malaria rapid diagnostic test)

NS1 – proteína não estrutural 1 do vírus dengue

P.f. – *P. falciparum*

PRNT – Ensaio de neutralização por redução de placa;

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real;

RDT – teste de diagnóstico rápido

RP – Razão de prevalência

rpm – rotação por minuto

SCD – Síndrome de Choque da Dengue

ZIKV – vírus Zika

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação representa o produto final do curso de Mestrado em Saúde Comunitária, com concentração em Epidemiologia, iniciado em março de 2015, no Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia. O trabalho foi elaborado na forma de um artigo original, cujo objetivo foi investigar a ocorrência de arboviroses (dengue, chikungunya e zika) na cidade de Quelimane – Moçambique.

As arboviroses, sobretudo a dengue, chikungunya e zika são importantes para a saúde pública em virtude das suas consequências adversas para a saúde das populações. Em Moçambique tem poucas informações sobre a ocorrência de infecções por arbovírus. Portanto, a investigação foi conduzida para produzir informações que ajudassem a orientar as ações da saúde pública local no controle das causas de doenças febris agudas.

Em anexo, está a versão final do projeto desta dissertação, incorporando as sugestões apresentadas pela banca examinadora durante a qualificação.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Distribuição espacial dos endereços dos pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane.....34

Fig. 2. Diferentes recipientes contendo água e imaturos no entorno das residências dos pacientes35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas dos pacientes recrutados em cinco centros de saúde da cidade de Quelimane.....	29
Tabela 2. Manifestações clínicas dos pacientes incluídos no estudo	30
Tabela 3. Resultados laboratoriais de pacientes com doença febril aguda, recrutados em cinco centros de saúde da cidade de Quelimane	31
Tabela 4. Análise de concordância entre os resultados de IgM anti-CHIKV por ELISA e RDT. 32	
Tabela 5. Análise de concordância entre os resultados de IgG anti-CHIKV por ELISA e PRNT.....	32
Tabela 6. Prevalência de IgG anti-chikungunya de acordo com os fatores sociodemográficos.....	33

SUMÁRIO

1- Introdução.....	12
2 – Metodologia.....	13
2.1. Local de estudo.....	13
2.2. Desenho de estudo.....	13
2.3. Recrutamento de pacientes e coleta de dados.....	14
2.4. Procedimentos laboratoriais.....	14
2.5. Inspeção entomológica.....	16
2.6. Análise estatística.....	16
3. Aspectos Éticos.....	17
4. Resultados.....	17
4.1. População de estudo.....	17
4.2. Resultados laboratoriais.....	18
4.2.1. Malária.....	18
4.2.2. Dengue.....	18
4.2.3. Zika.....	18
4.2.4. Chikungunya.....	19
4.3. Análise de concordância.....	19
4.4. Georreferenciamento dos endereços residenciais.....	20
4.5. Soroprevalência de chikungunya (presença de anticorpos IgG) e as características sociodemográficos.....	20
4.6. Inspeção ambiental e entomológica para vigilância de <i>Aedes spp.</i>	20
5. Discussão.....	21
6. Conclusão e sugestões.....	25
7. Referências Bibliográficas.....	25
Anexo: projeto de pesquisa.....	36

1- Introdução

Nos últimos anos, houve uma propagação sem precedentes dos vírus chikungunya e zika nas Américas, causando graves consequências para a saúde das populações [1–3]. A morbidade associada a esses dois arbovírus somou-se à carga da dengue, outra arbovirose que acomete milhões de pessoas todo ano no mundo há décadas [4–6], e ampliou ainda mais a importância das arboviroses como um problema de saúde pública global.

Na África, há evidências de que as arboviroses ocorrem de forma endêmica. Entretanto, elas são pouco investigadas no continente, sobretudo na África Sub-Sahariana [7]. Em 2013 e 2014, o Ministério de Saúde de Moçambique (MISAU) reportou surtos de dengue na região norte do país (figura 1). Na sequência dos eventos, foi estabelecido um sistema de vigilância de doenças febris, através do qual se confirmou a ocorrência de infecções por dengue em 100 (51,8%) pacientes, de um total de 193 recrutados em 2013 e em 171 (28,3%) pacientes, de um total de 605 recrutados em 2014 nas províncias de Cabo Delgado e Nampula, no norte do país [8]. Este surto de dengue ocorreu três décadas depois do primeiro e único registro da dengue existente até então, em finais de 1984 e início de 1985, na província de Cabo Delgado [9].

Recentemente, em 2015, foi publicado um estudo mostrando evidências sorológicas sobre a ocorrência de chikungunya na região sul de Moçambique. 9 (4,3%) pacientes, de um total de 209 com doença febril aguda apresentaram soroconversão ($n = 6$) e aumento de quatro vezes os títulos ($n = 3$) de IgG anti-chikungunya [10]. Em relação aos vetores de arbovírus no país, as informações entomológicas existentes registram a presença dos mosquitos do gênero *Aedes* incluindo as espécies *Ae. aegypti*, *Ae. africanus* e *Ae. simpsoni*, desde a década de 1940 [11] e em 2016 foi relatado o primeiro registro de *Aedes albopictus* em Moçambique [12].

Apesar das evidências sugerirem uma possível transmissão autóctone de arbovírus no país, as principais informações disponíveis sobre ocorrência de arboviroses em Moçambique restringem-se a relatos de surtos e a real magnitude epidemiológica da transmissão desses vírus permanece pouco conhecida. Assim, levanta-se a hipótese de que a dengue e chikungunya ou outras arboviroses ocorrem, no país, mas são negligenciadas no contexto de saúde pública de Moçambique. Como as arboviroses apresentam um quadro sintomatológico semelhante à de outras doenças febris agudas como malária [13], por exemplo, supomos que a história epidemiológica das doenças infecciosas em Moçambique e a insuficiência de recursos para o diagnóstico laboratorial dessas doenças influencia, sobremaneira, a decisão dos clínicos

na triagem para orientação clínica dos pacientes com doença febril aguda e as arboviroses permanecem encobertas pelas doenças como a malária, que é endêmica no país [14].

Atualmente, o Instituto Nacional de Saúde (INS) de Moçambique instalou postos sentinelas em alguns hospitais do país, nos quais ocorre a vigilância ativa de doenças febris agudas para diagnóstico etiológico. Portanto, através da análise dos resultados da vigilância realizada na cidade de Quelimane, pretende-se investigar a circulação de dengue, chikungunya e zika, até então desconhecidas no cenário epidemiológico da Cidade e, por conseguinte, fortalecer o apelo para a realização do diagnóstico diferencial nos centros de saúde.

2 – Metodologia

2.1. Local de estudo

A cidade de Quelimane é a capital da província de Zambézia, no centro de Moçambique (figura 1). Localiza-se no extremo sudeste da província, a 20 km do Oceano Índico e ocupa uma área de 117 km² [15]. O clima é tropical úmido com duas estações distintas: seca ou de inverno e úmida ou de verão; a precipitação média anual é de 1395 mm, com fortes chuvas registradas entre os meses de dezembro e abril, equivalente a 87% da precipitação anual. A Cidade tem uma temperatura média anual de 25,7 °C [16]. A população residente estimada para 2016 foi de 245.886 habitantes; no último censo geral da população e habitação, realizado em 2007, a população contabilizada nesse processo foi de 195.758 habitantes [17].

2.2. Desenho de estudo

Trata-se de um estudo transversal, cuja base de dados provém da vigilância sentinela para doenças febris agudas, realizada prospectivamente na cidade de Quelimane, pelo INS, de 24 de fevereiro a 20 de junho de 2016. O posto sentinela foi estabelecido no centro de saúde de Coalane, no qual foram realizados os primeiros registros de dados da vigilância de doenças febris agudas na província para o diagnóstico de arboviroses. Com base em dados preliminares de pacientes assistidos no centro de saúde de Coalane, indicando a detecção sorológica de anticorpos anti-chikungunya em pacientes febris, foram criados postos sentinelas temporários em quatro unidades de saúde adicionais, para ampliar a cobertura para o recrutamento de pacientes suspeitos de infecção por arbovírus na Cidade e verificar se estava ocorrendo um surto de chikungunya. Esses postos sentinelas funcionaram por 12 dias,

de 21 de maio a 2 de junho, nos centros de saúde: **1)** 17 de setembro; **2)** 4 de dezembro; **3)** 24 de julho e no **4)** pronto socorro do hospital provincial de Quelimane.

2.3. Recrutamento de pacientes e coleta de dados

Os centros de saúde onde a vigilância para doenças febris agudas foi realizada têm unidades de pronto socorro que funcionam por 24 horas, todos os dias da semana. Os pacientes foram recrutados consecutivamente de segunda-feira a sexta-feira, entre as 7h: 30 minutos e 13:00h. Os clínicos foram treinados para utilizar um algoritmo clínico para identificar pacientes clinicamente suspeitos de infecção por dengue, chikungunya e zika durante a triagem. Foram considerados elegíveis, de acordo com os critérios do INS, pacientes com idade igual ou superior a cinco anos, com febre referida ou medida (temperatura axilar $\geq 37,5$ °C) de até sete dias de evolução, com um ou mais dos seguintes sintomas: cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária e exantema. Não foram recrutados os pacientes com pneumonia confirmada por radiografia do tórax, com suspeita de tuberculose, bronquite e amigdalite.

Inicialmente, a vigilância foi projetada para recrutar pacientes não maláricos. Entretanto, alguns pacientes com malária confirmada laboratorialmente foram integrados na vigilância pelo fato de apresentarem sintomas semelhantes aos de infecção por arbovírus, tais como artralgia, dor retro-orbitária e mialgia.

Os pacientes foram incluídos no estudo mediante o fornecimento do consentimento verbal, precedido pela explicação da finalidade da vigilância. Após a obtenção do consentimento, os pacientes responderam um questionário padronizado contemplando questões epidemiológicas (infecções prévias por arbovírus, história de vacinação contra a febre amarela e viagens para outras regiões ou para países onde ocorre a transmissão de arbovírus), sociodemográficos (sexo, idade, escolaridade, ocupação profissional) e clínicos (presença de cefaleia, artralgia, mialgia, dor retro-orbitária e outras).

2.4. Procedimentos laboratoriais

Inicialmente, coletou-se uma amostra de sangue por punção de polpa digital para o diagnóstico laboratorial de infecções por *Plasmodium falciparum*. Foi utilizado um teste rápido da SD BIOLINE (Malária Antigen P.f), de acordo com as orientações do fabricante. O teste detecta, apenas, o antígeno HRP-II do *P. falciparum*.

Em seguida, coletou-se 10 mL de sangue total (fase aguda), num tudo seco por punção venosa. Os pacientes atendidos no centro de saúde de Coalane foram convidados para retornarem no centro de saúde duas semanas depois, para a segunda coleta de 10 mL de sangue (fase convalescente).

As amostras de sangue foram mantidas refrigeradas e centrifugadas no fim do dia do recrutamento, no laboratório do hospital provincial de Quelimane. Neste hospital, parte do soro foi utilizado para a detecção de anticorpos anti-dengue e anti-chikungunya usando-se testes imunocromatográficos (testes de diagnóstico rápidos - RDT). Para a dengue foram utilizados os kits da SD BIOLINE Dengue Duo, que tem a capacidade de detecção simultânea do antígeno NS1 do vírus da dengue e dos anticorpos anti-dengue das classes IgG e IgM, no soro. Para a chikungunya, foram utilizados os kits da SD BIOLINE, que detectam apenas anticorpos anti-chikungunya da classe IgM. Todos os testes foram realizados de acordo com as orientações do fabricante.

As alíquotas contendo o soro remanescente foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por indisponibilidade de um congelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mensalmente, as amostras foram enviadas para o laboratório de referência nacional do INS, onde foram realizados testes para diagnóstico de infecções por dengue, chikungunya e zika pela reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa, em tempo real (qRT-PCR), Trioplex e imunoensaio enzimático (ELISA).

O trioplex qRT-PCR foi feito seguindo as instruções do CDC (Center for Disease Control and Prevention) [18]. Esse teste tem um papel importante porque permite detectar e diferenciar o RNA dos vírus da dengue, da chikungunya e da zika. Para o diagnóstico sorológico da dengue e chikungunya por ELISA, foram utilizados kits comerciais de Panbio Dengue Early ELISA e EUROIMMUN, respectivamente, baseando-se nos protocolos dos fabricantes.

Por sua vez, o INS enviou algumas amostras para a Alemanha, para a realização de testes para detecção de anticorpos anti-chikungunya através dos testes de neutralização por redução de placa (PRNT₅₀). Para a realização do teste, foram utilizados os procedimentos descritos por Gläscher e seus colaboradores [19]. O PRNT ajuda a descartar a possibilidade de reações cruzadas com outros Alphavirus, por ser um teste mais sensível em comparação com o ELISA.

2.5. Inspeção entomológica

Durante o recrutamento dos pacientes no centro de saúde de Coalane, foram obtidos os números de telefone celular e os endereços dos domicílios desses pacientes para que uma equipe pudesse efetuar visitas para inspeção entomológica aos sábados que seguiram à semana de inclusão de cada paciente na vigilância. Na residência de cada paciente, a equipe obteve as coordenadas geográficas usando um GPS (Sistema de Posicionamento Global) portátil da marca Garmin Trex, procurou por criadouros, coletou larvas em recipientes contendo água e montou uma armadilha do tipo ovitrampa.

Tanto as larvas coletadas em criadouros quanto aquelas provenientes das armadilhas foram colocadas em recipientes plásticos transparentes e em seguida, foram transportadas para o laboratório provincial de entomologia. No laboratório, as larvas foram criadas em bacias de reprodução, durante 10 dias, a uma temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até a eclosão de mosquitos adultos. Diariamente, as larvas eram alimentadas com ração de peixe. Os mosquitos que eclodiam eram retirados dos recipientes e colocados em uma câmara fria (para matar os mosquitos). Em seguida, foram identificados com uma lupa microscópica e classificados nos níveis de espécie e gênero, segundo a chave de classificação sistemática descrita por Press, 2004 [20]. Na sequência foram contabilizados e depois descartados.

2.6. Análise estatística

Os dados foram inseridos no Excel 2013 [21] e no REDCap [22] e foram analisados no STATA versão 12 [23]. Utilizou-se a estatística descritiva para caracterizar a população do estudo e os dados entomológicos. Calculou-se a proporção global de pacientes com anticorpos anti-dengue e com anticorpos anti-chikungunya, pela razão entre o número de pacientes com amostras positivas e o número de pacientes com amostras testadas, multiplicados por uma base decimal (100). A prevalência de IgG foi estratificada por idade. Utilizou-se o coeficiente kappa de Cohen (k) para avaliar a concordância na detecção de IgM anti-CHIKV entre o RDT e o ELISA e para avaliar a concordância na detecção de IgG anti-CHIKV entre o ELISA e o PRNT.

Foram feitas análises bivariadas tendo como desfecho a prevalência de anticorpos IgG anti-CHIKV e como variáveis preditoras, as características sociodemográficas dos pacientes. Em seguida, as variáveis que se associaram com o desfecho na análise bivariada, foram incluídas em um modelo de regressão log binomial [24] para verificar a associação dos fatores

sociodemográficos na prevalência de anticorpos IgG anti-chikungunya, controlando por variáveis de confusão. Em ambas análises foi utilizado um intervalo de confiança de 95% para determinar associações estatisticamente significantes.

Para os dados entomológicos, foram calculados os índices de positividade da ovitrampa (IPO) e o índice de densidade de ovos (IDO) definidos como: $IPO = \frac{NAP}{NAE} \times 100$ e $IDO = \frac{NO}{NAP}$, onde NAP – número de armadilhas positivas, NAE= número de armadilhas examinadas e NO - número de ovos. As coordenadas geográficas foram exportadas para o programa Qgis 2.14 para localizar, espacialmente, os locais de residência dos pacientes. Assim, foi gerado um mapa que ilustra a distribuição espacial dos endereços dos pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane, classificando-os em positivos e negativos em relação à infecção por CHIKV.

3. Aspectos Éticos

A base de dados foi cedida pelo INS. Os dados foram analisados preservando as informações que permitiam a identificação dos pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia (ISC-UFBA) e pelo Comitê Institucional de Bioética para a Saúde de INS (CIBS).

4. Resultados

4.1. População de estudo

Durante os quase quatro meses de vigilância de doenças febris agudas na cidade de Quelimane, foram recrutados nas cinco unidades de saúde 163 pacientes (tabela 1). A maior parte dos pacientes, 97 (59,5%) foi recrutada no centro de saúde de Coalane. Todos os pacientes eram negros e mais que a metade, 99 (60,7%) era do sexo feminino. As crianças e os adolescentes (<18 anos) foram apenas 17 (10,4%) do total de pacientes recrutados. A mediana de idade foi de 28 anos (IQR: 20-40). Aproximadamente metade dos pacientes, 80 (49,4%) tinha baixo nível de escolaridade. Para os pacientes com idade não inferior a 18 anos, 94 (64,4%) estavam desempregados.

Com base em informações auto referidas, nenhum paciente tinha história de vacinação contra a febre amarela, nenhum de infecções prévias por arbovírus ou viagens para países nos quais os arbovírus são endêmicos. Todos os pacientes tinham domicílio na cidade de Quelimane, embora alguns trabalhassem em outros distritos da província da Zambézia.

A maior parte dos pacientes (124/163; 76,1%) foi atendida nos centros de saúde com até três dias de febre (tabela 2). Os sintomas mais comuns apresentados pelos pacientes foram cefaleia (154; 94,5%), artralgia (144; 88,3%), calafrios (132; 81,0%) e mialgia (118; 72,5%).

4.2. Resultados laboratoriais

Embora os 97 pacientes atendidos no centro de saúde de Coalane tenham sido convidados para retornar 14 dias depois para a coleta de amostras de sangue da fase convalescente, apenas 20 (20,6%) deles retornaram.

4.2.1. Malária

Todos os pacientes foram testados para infecção por *Plasmodium falciparum* por RDT e 35 (21,5%) deles foram positivos (tabela 3). Não houve casos graves que necessitassem de cuidados especiais ou de internamento.

4.2.2. Dengue

De 127 pacientes submetidos à investigação de dengue pelo RDT, 4 (3,2%) foram positivos para NS1, 2 (1,6%) para IgM e 1 (0,8%) para IgG (tabela 3). De 104 pacientes que tiveram as amostras agudas testadas para dengue por ELISA, 1 (0,9%) foi positivo no ELISA IgM e nenhum foi positivo nos ELISAs NS1 e IgG. Todos os 163 pacientes foram testados por qRT-PCR para dengue e nenhum foi positivo. Nenhuma das amostras convalescentes foi testada para dengue.

4.2.3. Zika

Todos os 163 pacientes foram testados por qRT-PCR e nenhum foi positivo.

4.2.4. Chikungunya

De 124 pacientes testados pelo RDT-IgM para CHIKV, 45 (36,3%) foram positivos (tabela 3). Todos os 163 pacientes foram testados para CHIKV IgM por ELISA e 17 (10,4%) foram positivos, dos quais 14 foram recrutados no centro de saúde de Coalane e 3 nos outros centros de saúde. Em relação à detecção do IgG por ELISA, 103 (63,2%) dos 163 pacientes foram positivos, dos quais 66 foram recrutados no centro de saúde de Coalane e 37 nos outros centros de saúde. Entre os 17 pacientes positivos para IgM por ELISA, 12 (70,5%) também foram positivos no ELISA IgG. Dos 5 pacientes que eram positivos para CHIKV somente pelo ELISA IgM, 2 (40,0%) também tiveram o diagnóstico de malária.

Em relação ao PRNT para CHIKV, foram testadas amostras de 12 pacientes, das quais 11 (91,7%) apresentaram resultados positivos no PRNT; os títulos variaram de 100 a 3200. Das 20 amostras de sangue coletadas na fase convalescente da doença, apenas 11 foram testadas para CHIKV por ELISA (tabela 3). Nenhum dos 11 pacientes teve sua amostra de sangue de fase convalescente positiva no ELISA IgM para CHIKV, mas 8 (72,7%) deles tiveram as amostras de fase convalescente positivas no ELISA IgG. Todos os 8 pacientes com amostra de fase convalescente positiva no ELISA IgG também eram positivos no ELISA IgG realizado na amostra de fase aguda e, portanto, não houve soroconversão. Todos os pacientes foram testados por qRT-PCR e nenhum foi positivo.

Baseando-se nos achados laboratoriais obtidos pelos testes de ELISA, os pacientes foram classificados em quatro grupos: **i**) – negativos (55/163; 33,7% pacientes sem evidências de anticorpos anti-CHIKV no soro); **ii**) – infecção aguda (5/163; 3,1% pacientes que apresentavam anticorpos do tipo IgM contra CHIKV no soro, mas não apresentavam anticorpos do tipo IgG); **iii**) – infecção recente (12/163; 7,4% pacientes com anticorpos IgM e IgG contra CHIKV no soro) e **iv**) – infecção pregressa (91/163; 55,8% pacientes que apresentavam anticorpos do tipo IgG contra CHIKV no soro, mas não apresentavam anticorpos do tipo IgM). Os resultados de RDT não foram utilizados na classificação laboratorial dos pacientes por serem discordantes com os resultados do ELISA.

4.3. Análise de concordância

Foi realizado o teste kappa de Cohen (k) para verificar: **i**) a concordância entre os resultados do IgM anti-CHIKV entre o RDT e o ELISA, e **ii**) a concordância entre os resultados de IgG anti-CHIKV entre o ELISA e o PRNT (tabelas 4 e 5). Os resultados indicaram que não houve concordância entre o RDT e o ELISA (kappa= -0,01; p=0,8; z= -

0.9), mas que, em contrapartida, houve perfeita concordância entre os resultados do ELISA e do PRNT ($kappa = 1$; $p = 0,0003$; $z = 3,46$).

4.4. Georreferenciamento dos endereços residenciais

De 97 pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane, foram obtidas as coordenadas geográficas dos domicílios de 79 (81,4%) pacientes. A distribuição espacial dos endereços (figura 1) não apresentou um padrão de aglomeração dos pontos.

4.5. Soroprevalência de chikungunya (presença de anticorpos IgG) e as características sociodemográficas

A proporção de pacientes com IgG positivo anti-CHIKV (tabela 6) foi maior entre os indivíduos do sexo feminino 65 (65,7%) de um total de 99 recrutados, enquanto entre os indivíduos do sexo masculino, 38 (59,4%) tinham IgG positivo, de um total de 64 recrutados. De 52 pacientes que trabalhavam, 34 (65,4%) tinham IgG anti-CHIKV positivo enquanto de 94 pacientes que não trabalhavam, 64 (68,1%) tinham IgG positivo. Em relação à idade, a proporção dos indivíduos com IgG positivo mostrou uma tendência crescente por faixa etária.

Na análise bivariada, as variáveis idade e escolaridade associaram-se com a prevalência do IgG anti-Chikungunya. Na análise multivariada, os resultados continuaram estatisticamente significantes, tendo se observado para a idade, o aumento da força de associação com o aumento da faixa etária. Os indivíduos com mais de 55 anos tiveram 3,0 (IC95%: 1,1-8,0) vezes mais a prevalência de anticorpos IgG anti-CHIKV quando comparados com os indivíduos com a faixa etária entre os 05 e 15 anos, após o ajuste pela escolaridade. Por outro lado, os indivíduos com escolaridade baixa, tiveram 1,7 (IC95%: 1,3-2,1) vezes mais a prevalência de anticorpos IgG quando comparados com aqueles que no mínimo ingressaram no ensino secundário, ajustado pela faixa etária.

4.6. Inspeção ambiental e entomológica para vigilância de *Aedes spp.*

De 97 pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane, foram realizadas inspeções ambientais e entomológicas nos domicílios/peri-domicílios de 79 (81,4%) pacientes e em 16 (20,3%) foram identificados imaturos de mosquitos. Os criadouros onde havia imaturos foram: poços (n=2), baldes (n=2), cascas de coco (n=2), pneus (n=2), tanques para lavar roupa (2), tubos de esgoto (n=1), tambores (n=1), latas de leite (n=4), panela (n=1) e área com acúmulo de lixo (n=1) (figura 2). Das larvas coletadas, eclodiram no laboratório, 435

435 mosquitos *Aedes spp*, dos quais foi possível identificar o tipo de espécie para 204 mosquitos. Destes, 78 (38,2%) eram machos e 126 (61,8%) eram fêmeas de *Aedes aegypti*. A mediana dos ovos na palheta foi de 50 (IQR: 16-92,5). Em relação aos índices entomológicos, o IPO foi de 25,0% (16/64) e o IDO foi de 90,8 (1453/16) ovos por palheta.

5. Discussão

Em Moçambique, à semelhança de muitos países africanos, existem poucas pesquisas sobre a ocorrência de arboviroses. Este trabalho é importante por fornecer pela primeira vez evidências de circulação silenciosa de arbovírus em uma região de Moçambique onde nunca tinham sido registrados anteriormente.

Em particular, a identificação de que mais de 60% dos pacientes apresentavam IgG para CHIKV e de que a proporção de positivos no ELISA IgG para CHIKV era maior entre aqueles com maior idade apontam para uma possível transmissão endêmica do vírus na região.

Os resultados do ELISA IgM para dengue sugerem que a doença ocorre na cidade de Quelimane, mas com baixa frequência (0,9% dos pacientes testados foram positivos) comparado com outras regiões onde há o registro da doença, dentro do país [8] ou nos países vizinhos [25,26]. Embora o primeiro registro da dengue em Moçambique tenha sido feito em finais de 1984 e princípios de 1985 [9], nossos achados sugerem que o DENV deve ter sido introduzido recentemente na cidade de Quelimane ou que infecções por este vírus sejam eventos esporádicos. Importa mencionar que encontramos casos de dengue NS1 (3,2%) positivos por RDT. Apesar de esses pacientes terem sido negativos por ELISA, o achado serve de alerta para o risco de surtos, em particular devido à alta susceptibilidade da população para todos os sorotipos do vírus da dengue, já que poucos tem anticorpos IgG anti-dengue.

Nosso achado em relação à evidência de chikungunya, mostra que a prevalência de IgM anti-CHIKV foi de 10,4% e de IgG anti-CHIKV foi de 63,2%. A concordância de 100% do PRNT para CHIKV com o ELISA IgG para CHIKV confirma os achados do ELISA IgG. Entretanto, não há evidências que afastem a transmissão de outros Alphavirus no país e, por isso, não podemos descartar a possibilidade de reações cruzadas com outros Alphavirus, como por exemplo O' nyong-nyong que circula na África Oriental [27].

Estratificando em grupos, de acordo com o tipo de anticorpos anti-CHIKV presentes no soro dos pacientes, observamos um gradiente de casos com anticorpos IgM (3,1%), IgM/IgG (7,4%) e IgG (55,8%), e assumimos tratar-se de casos de infecção aguda, infecção recente e infecção pregressa, respectivamente. Mesmo sem detecção do CHIKV por qRT-PCR ou soroconversão, é provável que o vírus chikungunya esteja circulando na cidade de Quelimane. Esta ocorrência não é inesperada e já havia sido postulada por Worth em 1960 [11], em decorrência de surtos nos países vizinhos [28,29] e reiterada por Gudo, em 2015 [10]. Entretanto, nos surpreendeu nesta pesquisa a elevada proporção (63,2%) de indivíduos apresentando IgG anti-CHIKV. Esta frequência está entre aquela (72%) registrada no Kenya, depois da reemergência da doença em 2004 [27], e aquela (45%) registrada em algumas cidades de Madagascar, em 2009 [30]. Portanto, há fortes razões para se acreditar que uma intensa transmissão de chikungunya ocorreu na Cidade no passado, pois, desde a recente reemergência do CHIKV, muitos países da região incluindo as ilhas do Oceano Índico reportaram epidemias de chikungunya [31,32]. Assim, estes achados sugerem que chikungunya tenha se tornado endêmico na cidade de Quelimane e a elevada proporção de indivíduos com anticorpos IgG anti-CHIKV pode ser consequência de exposição acumulada da população ao vírus ao longo do tempo.

Nossos resultados também confirmam especulações levantadas em estudos anteriores [10], de que o vírus chikungunya circulasse em áreas do país onde casos da doença não haviam sido detectados. Assim, nossos achados somam-se a de estudos anteriores [33] e ajudam a reduzir as incertezas sobre a ocorrência de chikungunya em Moçambique, reforçando a inclusão de Moçambique como um dos países da África oriental onde há transmissão do CHIKV.

A distribuição espacial dos endereços dos pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane ofereceu uma ideia sobre a ocorrência de chikungunya na cidade de Quelimane. Infelizmente, não conseguimos obter as coordenadas dos domicílios dos pacientes recrutados nos outros centros de saúde. Contudo, baseando-se na observação da disposição espacial dos endereços dos pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane não constatamos qualquer padrão de aglomeração nos bairros e a aleatoriedade dos pontos (figura 1) sugere a probabilidade de que o padrão de difusão de chikungunya pode ter ocorrido de modo semelhante nos outros bairros da cidade, uma vez que encontramos casos de exposição ao CHIKV entre os pacientes atendidos nos outros centros de saúde.

A prevalência de anticorpos IgG entre os pacientes investigados, esteve associada com a idade e escolaridade. Em relação à idade, constatou-se que a força de associação aumenta com o aumento da faixa etária. Este achado reforça a hipótese de que chikungunya circula na cidade há décadas e, os casos não foram detectados durante a sua ocorrência. Na análise multivariada sobre a influência de escolaridade na prevalência de IgG anti-CHIKV, controlando pela idade, constatou-se que a baixa escolaridade associou-se independentemente com a presença de IgG anti-CHIKV. Dado que a escolaridade pode ser utilizado como proxy do nível de pobreza, com o achado sugere-se que as condições socioeconômicas baixas contribuem para a exposição desigual da população ao vírus CHIKV.

Os sintomas mais frequentemente apresentados pelos pacientes estudados, como: febre, cefaleia, artralgia e mialgia, são comuns para muitas doenças febris agudas, sendo, por conseguinte, difícil de determinar clinicamente a provável etiologia pelas suas manifestações. Ao longo do tempo, em muitos países da África Sub-Sahariana endêmicos para malária, a maior parte de doenças febris eram tratadas como malária. Dado que dengue e chikungunya não foram causas frequentes para a procura por atendimento médico nos centros de saúde e que o diagnóstico de malária só explicou cerca de um quinto dos casos, outros agentes infecciosos que não eram alvo dessa pesquisa devem ter um papel relevante na etiologia das doenças febris na cidade de Quelimane. Investigações futuras com objetivo de escalerecer melhor quais as principais causas das doenças febris em Moçambique são necessárias, principalmente porque estudos têm mostrado uma grande variabilidade nos principais agentes infecciosos que atuam na etiologia de doenças febris agudas a depender do local [26,34,35].

Dengue, chikungunya e zika são transmitidos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* [36,37]. Os nossos achados de que o *Ae. aegypti* é abundante na cidade de Quelimane suporta a hipótese de que há transmissão de arbovírus na cidade e apontam para o risco de epidemias. Nós constatamos que uma de cada cinco das casas de pacientes onde realizamos o inquério ambiental e entomológico havia a presença de formas imaturas de *Ae. aegypti*. Adicionalmente, descrevemos pela primeira vez em Moçambique criadouros nos quais ocorre a reprodução dos mosquitos. Trata-se de poços sem tampa, pneus, cascas de cocos e outros materiais descartados no entorno das residências e que acumulam água. A insalubridade das condições ambientais da Cidade, o crescimento da população e a ineficiência do sistema de coleta e tratamento de resíduos sólidos, oferecem risco eminente para a explosão da população de *Aedes spp.* Este fato representa um sério problema de saúde pública, dado que a maior parte da população não está imune contra dengue.

Além do fato de termos identificado grande infestação do *Ae. aegypti* na cidade de Quelimane, a observação de que nenhum dos pacientes que apresentava anticorpos contra DENV e CHIKV tinha viajado para locais com ocorrência endêmica desses vírus também sugere que haja transmissão autóctone da dengue e chikungunya na cidade de Quelimane. Atualmente, não existem programas específicos em Moçambique para o combate dos mosquitos do gênero *Aedes*. Embora se saiba que as atuais estratégias adotadas para esse fim não sejam capazes de impactar positivamente no controle de arboviroses [38,39], a educação da população sobre os riscos que a circundam e do seu papel para minimizar os efeitos desses riscos é fundamental.

Todos os pacientes estudados também foram testados para infecções por *P. falciparum*, por ser este o maior responsável por casos de malária na África Sub-Sahariana e uma das principais causas de doenças febris agudas [40,41]. A prevalência da malária que identificamos foi de 21,5%. Contudo, a proporção de casos positivos pode ser maior dado que apenas usamos o mRDT, cuja sensibilidade é relativamente baixa [42,43]. Também não podemos descartar a possibilidade da ocorrência de malária por outros tipos do plasmódio, que poderiam não ser detectáveis pelo RDT. Digno de nota foi a identificação de dois casos que apresentavam IgM para CHIKV no ELISA e RDT positivo para malária. Esse achado aponta para a necessidade de futuras investigações clínico-epidemiológicas sobre a frequência com que a malária se apresenta associada à uma co-infecção, bem como sobre os efeitos de infecções concomitantes no curso das duas doenças.

As limitações do estudo incluem: **i)** o não recrutamento de pacientes durante todo o horário de funcionamento dos centros de saúde; **ii)** o fato de parte das atividades ter sido programada para dar uma resposta urgente ao Ministério de Saúde sobre a ocorrência de chikungunya na cidade de Quelimane e por essa razão não ter sido possível obter um número grande de amostras da fase convalescente; **iii)** a impossibilidade de testar todas as amostras de soro da fase convalescente; a sua realização ajudaria para a avaliação da soroconversão; **iv)** o recrutamento baseado no relato da febre, que pode ter condicionado a ilegitimidade de pacientes com outros sinais e sintomas compatíveis com chikungunya, como artralgia crônica, e, conseqüentemente pode ter levado a uma subestimação da carga da doença; **v)** a discrepância observada entre os resultados de ELISA e RDT, o que pode ser, devido à circulação de outros arbovírus relacionados que induzem reações cruzadas; **vi)** não ter sido possível testar as amostras para outros vírus relacionados e que podem induzir reações cruzadas; **vii)** por fim, as amostras de soro de fase aguda foram armazenadas a -20 °C, o que

pode ter reduzido a sensibilidade do qRT-PCR em identificar pacientes com infecções por arbovírus. Portanto, a interpretação dos nossos resultados deve ser feita com parcimônia, considerando todas as limitações acima.

6. Conclusão e sugestões

Apesar das limitações, os resultados indicam que a população local da cidade de Quelimane é aparentemente acometida por doenças que não são consideradas no contexto da saúde pública local e, por conseguinte, não fazem parte do grupo de doenças de notificação na Cidade. Estes achados são significativos para a saúde pública por sugerirem que os arbovírus também influenciam para a ocorrência de doenças febris agudas na cidade de Quelimane. A dengue ocorre com baixa frequência enquanto que chikungunya parece ter transmissão endêmica na cidade de Quelimane. As baixas condições econômicas são fundamentais para a exposição aos vírus. Acreditamos que razões que concorrem para subnotificação de casos de chikungunya na cidade de Quelimane estejam relacionadas à similaridade de sinais e sintomas da doença com aqueles da malária e à falta de uma vigilância sistemática.

Embora o estudo tenha sido realizado com uma amostra intencional, em centros de saúde, acreditamos que os resultados se aplicam para outras regiões do país, sobretudo para as cidades costeiras, cujas condições ambientais e sociodemográficas são similares. Para melhorar a compreensão dos aspectos relacionados com a carga de arboviroses, a dinâmica de transmissão, as cepas circulantes e os vetores envolvidos, em Moçambique, ainda há a necessidade de realização de pesquisas adicionais. Por outro lado, é pertinente que as autoridades locais de saúde pública envidem esforços na formação de recursos humanos qualificados e para o estabelecimento de infraestrutura para o diagnóstico laboratorial dos arbovírus, permitindo a detecção precoce de surtos e o reconhecimento do padrão de ocorrência e transmissão dos arbovírus nas diversas regiões do país.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Boeuf P, Drummer HE, Richards JS, Scoullar MJL, Beeson JG. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Med* 2016;14:112. doi:10.1186/s12916-016-0660-0.
- [2] Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T V, et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré

- Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med* 2017;14:e1002203. doi:10.1371/journal.pmed.1002203.
- [3] Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, Germonneau P QI. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect* 2009;137:534–41. doi:10.1017/S0950268808001167.
- [4] Kosasih H, Alisjahbana B, Mast Q De. The Epidemiology , Virology and Clinical Findings of Dengue Virus Infections in a Cohort of Indonesian Adults in Western Java 2016:1–18. doi:10.1371/journal.pntd.0004390.
- [5] Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 2014;22:138–46. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011.
- [6] Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* 2013;5:299–309. doi:10.2147/CLEP.S34440.
- [7] Kuniholm MH, Wolfe ND, Huang CYH, Mpoudi-Ngole E, Tamoufe U, Burke DS, et al. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:1078–83. doi:74/6/1078 [pii].
- [8] Muianga A, Pinto G, Ali S, Oludele J, Monteiro V, Tivane A, et al. Occurrence of dengue in 2013 and 2014 in northern Mozambique: Is dengue an endemic disease in Mozambique? *Int J Infect Dis* 2016;45:174. doi:10.1016/j.ijid.2016.02.411.
- [9] Gubler DJ, Sather GE, Kuno G, Cabral JR. Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1280–4. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01429.x.
- [10] Gudo ES, Pinto G, Vene S, Mandlaze A, Muianga AF, Cliff J, et al. Serological Evidence of Chikungunya Virus among Acute Febrile Patients in Southern Mozambique. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:1–11. doi:10.1371/journal.pntd.0004146.
- [11] Worth CB, de MEILLON. Culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) recorded from the province of Mozambique (Portuguese East Africa) and their relationship to arthropod-borne viruses. *An Inst Med Trop (Lisb)* 1960;17:231–56.
- [12] Kampango A, Abílio AP. The Asian tiger hunts in Maputo city—the first confirmed report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) in Mozambique. *Parasit Vectors* 2016;9:76. doi:10.1186/s13071-016-1361-4.
- [13] Sang RC, Dunster LM. The growing threat of arbovirus transmission and outbreaks in Kenya: A review. *East Afr Med J* 2001;78:655–61. doi:10.4314/eamj.v78i12.8936.

- [14] PNCM. Plano Estratégico da Malária 2012- 2012.
- [15] Lala A. ESTUDO DE BASE CONSELHO MUNICIPAL DA CIDADE DE QUELIMANE 2013.
- [16] Silva C. ARQUITETURA MODERNA NA ÁFRICA LUSÓFONA Quelimane e a obra de João Garizo do Carmo Arquitetura 2013.
- [17] INE. Projecções Anuais da População Total, Urbana e Rural, dos distritos da Cidade de Maputo, 2007 - 2040 2010;1:78.
- [18] CDC. Trioplex Real-time RT-PCR Assay For use under an Emergency Use Authorization only Instructions for Use 2016.
- [19] Gläsker S, Lulla A, Lulla V, Couderc T, Drexler JF, Liljeström P, et al. Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using Gaussia luciferase as readout. *Virology* 2013;10:235. doi:10.1186/1743-422X-10-235.
- [20] Press M, Zealand N. *Zootaxa* 700. n.d.
- [21] Frey DC. Microsoft Excel 2013 Step by step. vol. 25. 2014. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [22] Harris P a., Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research Electronic Data Capture (REDCap) - A metadata driven methodology and workflow process for providing translational research informatic support. *J Biomed Inform* 2009;42:377–81. doi:10.1016/j.jbi.2008.08.010.Research.
- [23] StataCorp. Stata User ' S Guide. n.d.
- [24] Cummings P. Methods for estimating adjusted risk ratios. *Stata J* 2009;9:175–96. doi:The Stata Journal.
- [25] Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, et al. Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1135–7. doi:10.3201/eid1407.071521.
- [26] Kajeguka D, Kaaya R, Mwakalinga S, Al A. Prevalence of Dengue and Chikungunya virus infections 1 in north-eastern Tanzania: 2 a cross sectional study among participants presenting with malaria-like symptoms. *BMC Infect Dis* 2016;1:1–19. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [27] Sergon K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:333–7. doi:78/2/333 [pii].
- [28] Mason PJ, Haddow AJ. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957;51:238–40.

- doi:10.1016/0035-9203(57)90022-6.
- [29] Diop D, Meseznikov G, Sanicas M. Chikungunya Outbreaks from 2000 to 2015: A Review. *MOJ Public Heal* 2015;2:43. doi:10.15406/mojph.2015.02.00043.
- [30] Schwarz NG, Girmann M, Randriamampionona N, Bialonski A, Maus D, Krefis AC, et al. Seroprevalence of antibodies against chikungunya, dengue, and Rift Valley fever viruses after febrile illness outbreak, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1780–6. doi:10.3201/eid1811.111036.
- [31] Chretien JP, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Sergon K, et al. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:405–7. doi:76/3/405 [pii].
- [32] Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:319–27. doi:10.1016/S1473-3099(07)70107-X.
- [33] Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 2007;88:2363–77. doi:10.1099/vir.0.82858-0.
- [34] Crump JA, Morrissey AB, Nicholson WL, Massung RF, Stoddard RA, Galloway RL, et al. Etiology of Severe Non-malaria Febrile Illness in Northern Tanzania: A Prospective Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002324.
- [35] Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, et al. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. *BMJ* 2004;329:1212. doi:10.1136/bmj.38251.658229.55.
- [36] Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 2015;4:1–18. doi:10.7554/eLife.08347.
- [37] Anielly Ferreira-de-Brito et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America Anielly. *Science* (80-) 2016;111:655–8. doi:10.1126/science.aaf5743.
- [38] Halstead SB. Successes and Failures in Dengue Control - Global Experience. *Dengue Bull* 2000;24:20–4.
- [39] Gubler DJ. Prevention and control of *Aedes aegypti*-borne diseases: Lesson learned from past successes and failures. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol* 2013;19:111–4.
- [40] The World Bank. Disease and mortality in sub-Saharan Africa. 2006. doi:10.1596/978-0-8213-6397-3.
- [41] Alexandre J, Arroz H. Increase in cases of malaria in Mozambique , 2014 : epidemic or

new endemic pattern? Rev Saude Publica 2016;1–7. doi:10.1590/S1518-8787.2016050006105.

- [42] Mouatcho JC, Dean Goldring JP. Malaria rapid diagnostic tests: Challenges and prospects. J Med Microbiol 2013;62:1491–505. doi:10.1099/jmm.0.052506-0.
- [43] Djallé D, Gody JC, Moyon JM, Tekpa G, Ipero J, Madji N, et al. Performance of Paracheck™-Pf, SD Bioline malaria Ag-Pf and SD Bioline malaria Ag-Pf/pan for diagnosis of falciparum malaria in the Central African Republic. BMC Infect Dis 2014;14:109. doi:10.1186/1471-2334-14-109.

Tabela 1. Características sociodemográficas dos pacientes recrutados em cinco centros de saúde da cidade de Quelimane, 2016 (N=163)

Variáveis	n	%
Sexo		
Feminino	99	60,7
Masculino	64	39,3
Idade (anos)		
Mediana (IQR*)	28	20 - 40
05 - 15	12	7,4
16 - 25	53	32,5
26 - 35	51	31,3
36 - 45	23	14,0
46 - 55	13	8,0
> 55	11	6,8
Escolaridade**		
Nenhum até ensino primário completo	80	49,4
Secundário incompleto até universitário	82	50,6
Trabalho***		
Não	94	64,4
Sim	52	35,6

* IQR - Intervalo interquartil

** Apenas para os pacientes com idade ≥ 7 anos (N=162)

*** Apenas para os pacientes com idade ≥ 18 anos (N=146)

Tabela 2. Manifestações clínicas dos pacientes incluídos no estudo (N=163)

Características clínicas	n	%
≤ 3 dias de febre	124	76,1
Febre	163	100,0
Medida ($t \geq 37.5$ °C)	47	28,8
Reportada	116	71,2
Cefaleia	154	94,5
Artralgia	144	88,3
Calafrios	132	81,0
Mialgia	118	72,4
Prostração	106	65,0
Anorexia	79	48,5
Tosse	58	35,6
Dor abdominal	56	34,4
Dor retro - orbitária	49	30,1
Dor de garganta	22	13,6
Vômito	18	11,0
Diarreia	14	8,6

IQR = Intervalo interquartil

Tabela 3. Resultados laboratoriais de pacientes com doença febril aguda, recrutados em cinco centros de saúde da cidade de Quelimane.

Teste	Total de pacientes testados	Número de pacientes positivos	%
<i>Amostras de fase aguda</i>			
Malária			
antígeno HRP-II RDT	163	35	21,5
Dengue			
NS1, RDT	127	4	3,2
IgM, RDT	127	2	1,6
IgG, RDT	127	1	0,8
NS1, ELISA	163	0	0,0
IgM, ELISA	104	1	0,9
IgG, ELISA	163	0	0,0
qRT-PCR	163	0	0,0
Chikungunya			
IgM, RDT	124	45	36,3
IgM, ELISA	163	17	10,4
IgG, ELISA	163	103	63,2
PRNT	12	11	91,7
qRT-PCR	163	0	0,0
ZIKA			
qRT-PCR	163	0	0,0
<i>Amostras de fase convalescente</i>			
Chikungunya			
IgM, ELISA	11	0	0,0
IgG, ELISA	11	8	72,7

Tabela 4. Análise de concordância entre os resultados de IgM anti-CHIKV por ELISA e RDT.

	ELISA			Total
	Positivos	Negativos	Indeterminado	
RDT	n(%)	n(%)	n(%)	
Positivos	5 (4,0)	40 (32,3)	0 (0,0)	45 (36,3)
Negativos	6 (4,8)	72 (58,1)	1 (0,8)	79 (63,7)
Total	11 (8,9)	112 (90,3)	1 (0,8)	77/124 (63,6)

Kappa = -0,01; p=0,8; Z=-0,9; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay;

RDT=rapid diagnostic rest

Tabela 5. Análise de concordância entre os resultados de IgG anti-CHIKV por ELISA e PRNT.

	PRNT		Total
	Positivos	Negativos	
ELISA	n(%)	n(%)	n(%)
Positivo	11 (91,7)	0 (0,0)	11 (91,7)
Negativo	0 (0,0)	1 (8,3)	1 (9,3)
Total	11 (91,7)	1 (8,3)	12/12 (100,0)

Kappa = 1; p=0,0003; Z=3,46; PRNT - Plaque reduction neutralization test;

ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay

Tabela. 6. Prevalência de IgG anti-chikungunya de acordo com os fatores sociodemográficos (N=163)

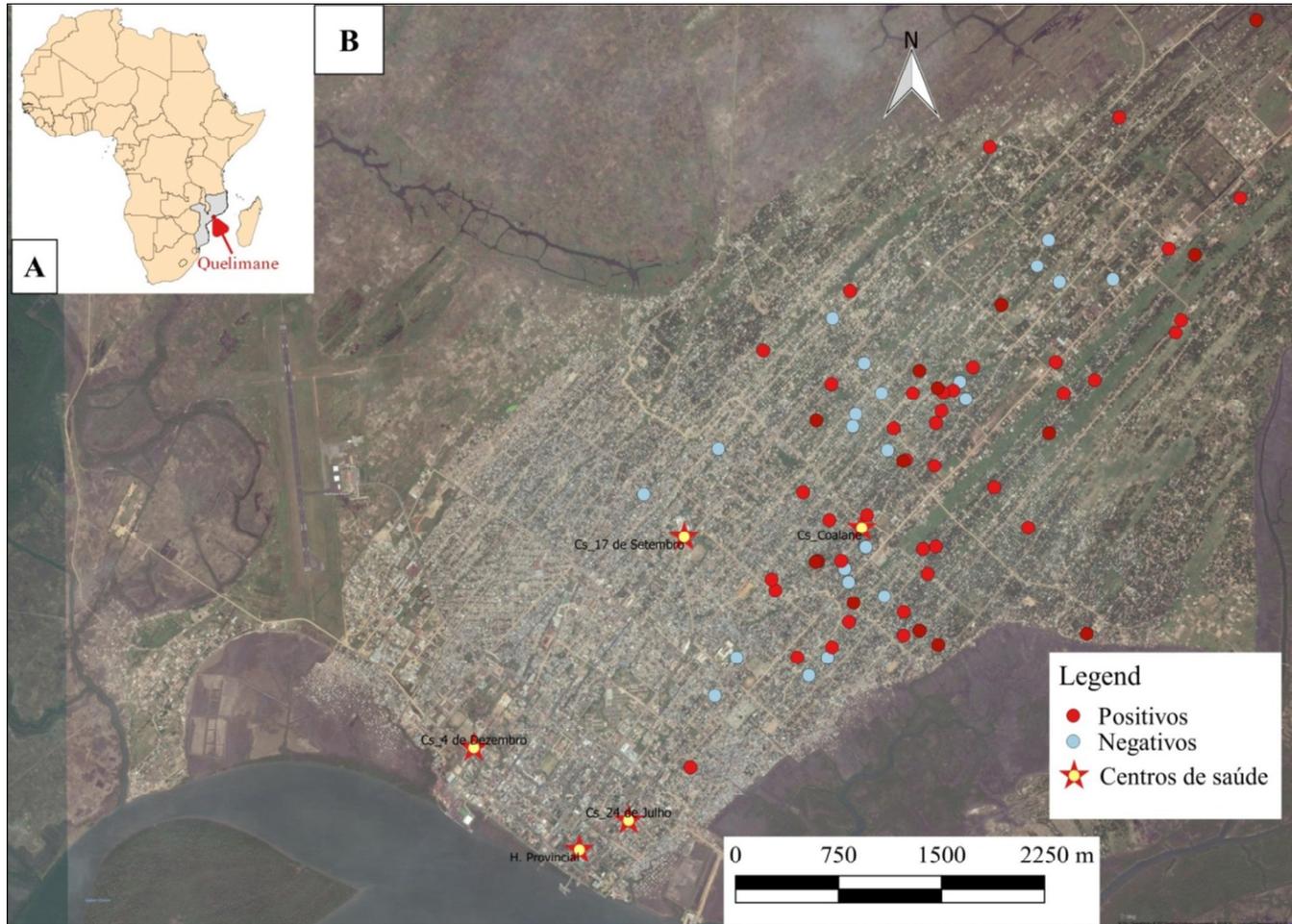
Variáveis	N	n(%)	Bruta		Ajustada***	
			PR	IC 95%	RP	IC 95%
Sexo						
Feminino	99	65 (65,7)	1,0			
Masculino	64	38 (59,4)	0,9	0,7-1,2		
Idade (anos)						
05 – 15	12	3 (25,0)	1,0		1,0	
16 – 25	52	26 (49,1)	2,3	0,7-5,4	2,2	0,8-6,1
26 – 35	51	36 (70,6)	2,8	1,0-7,6	2,9	1,1-7,7
36 – 45	23	17 (73,9)	3,0	1,1-8,1	3,1	1,2-8,0
46 – 55	13	11 (84,6)	3,4	1,2-9,3	3,5	1,3-9,0
> 55	11	10 (90,9)	3,6	1,3-9,9	3,0	1,1-8,0
Escolaridade*						
Nenhum até ensino primário completo	80	64 (80,0)	1,7	1,3-2,2	1,7	1,3-2,1
Secundário incompleto até ao ensino universitário	82	39 (47,6)	1,0		1,0	
Trabalho*						
Não	94	64 (68,1)	1,0			
Sim	52	34 (65,4)	1,0	0,8-1,2		

* Apenas para pacientes com idade ≥ 7 anos (N=162)

** Apenas para os pacientes com idade ≥ 18 anos (146)

*** modelo log-binomial

Fig. 1. Distribuição espacial dos endereços dos pacientes recrutados no centro de saúde de Coalane



A - Localização de Moçambique e da cidade de Quelimane; **B** - Distribuição espacial dos endereços dos indivíduos recrutados no centro de saúde de Coalane.

Fig.2. Diferentes recipientes contendo água e imaturos no entorno das residências dos pacientes.



Legenda

- a – casca de coco;
- b – bacia e baldes;
- c – pneu;
- d – canal de esgoto;
- e – poço sem tampa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: EPIDEMIOLOGIA**

QUALIFICAÇÃO DO MESTRADO

**ESTUDO ECO-EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE ARBOVIROSES
NA CIDADE DE QUELIMANE – MOÇAMBIQUE**

VÂNIO ANDRÉ MUGABE

Salvador – Brasil

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA
INSTITUTO DE SAÚDE COLETIVA – ISC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA – PPGSC
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: EPIDEMIOLOGIA

**ESTUDO ECO-EPIDEMIOLÓGICO SOBRE A OCORRÊNCIA DE ARBOVIROSES
NA CIDADE DE QUELIMANE – MOÇAMBIQUE**

Projeto de pesquisa para qualificação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, do Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro

Salvador – Brasil

2015

Sumário

1. Introdução.....	4
2. Revisão da literatura.....	6
2.1. Arboviroses.....	6
2.2. Epidemiologia e manifestações clínicas da dengue.....	7
2.2.1. Epidemiologia da dengue.....	7
2.2.2. Manifestações clínicas da dengue.....	8
2.3. Epidemiologia e manifestações clínicas da chikungunya.....	9
2.3.1. Epidemiologia da chikungunya.....	9
2.3.2. Manifestações clínicas da chikungunya.....	10
2.4. Epidemiologia e manifestações clínicas da zika.....	11
2.4.1. Epidemiologia da zika.....	11
2.4.2. Manifestações clínicas da zika.....	11
2.5. Diagnóstico laboratorial de arbovírus.....	12
2.6. Vigilância para doenças febris agudas.....	13
2.7. Diagnóstico diferencial.....	13
2.8. Mosquitos vetores de arbovírus.....	14
3. Pergunta de investigação.....	15
4. Objetivos.....	15
5. Referencial teórico.....	15
6. Justificativa.....	18
7. Metodologia.....	18
7.1. Desenho de estudo.....	18
7.2. Caracterização do local de estudo.....	18
7.3. Vigilância para doença febril aguda.....	19
7.4. Procedimentos laboratoriais.....	20
7.5. Vigilância entomológica.....	21
7.6. Confirmação laboratorial dos casos.....	21
7.7. Definição das variáveis.....	21
7.8. Plano de análise estatística.....	22
8. Considerações éticas.....	22
9. Cronograma de atividades.....	23
10. Referências Bibliográficas.....	24

1. Introdução

Arboviroses são doenças infecciosas emergentes e reemergentes que ocorrem em vários países do mundo, sobretudo nas regiões tropicais, com um impacto significativo para a saúde pública devido ao incremento das taxas de morbidade e mortalidade. O ciclo de transmissão dessas doenças envolve mosquitos hematófagos como vetores e vertebrados suscetíveis [1].

A dengue é uma das arboviroses de maior relevância para a saúde pública. As estimativas atuais indicam que cerca de 3.9 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos ou sob-risco de transmissão da doença [2], que causa anualmente 390 milhões de infecções, entre sintomáticas e assintomáticas [3]. Adicionalmente, os recentes surtos de chikungunya e zika [4–7] nas Américas, associados às implicações sérias para a saúde pública, a exemplo da síndrome de Guillain Barré e microcefalia [7–9] realçam a importância dessas doenças como ameaça à saúde global. O impacto das arboviroses é ainda maior por não existirem terapias específicas ou medidas imunoproláticas para a prevenção dessas doenças [8,10–12].

No continente Africano, a ocorrência da dengue foi reportada em pelo menos 34 países, entre 1960 e 2010, dos quais 12 registraram casos apenas em viajantes [13]. Bhatt e colaboradores [3] demonstraram que, em 2010, a dengue, na África, respondeu por 16% das infecções globais. Embora não seja consensual, dada a insuficiência de dados [2], esta estimativa sustenta a importância significativa da dengue para a saúde pública no continente. A reemergência dos vírus chikungunya e zika, isolados pela primeira vez na República da Tanzânia, em 1952 [14] e na floresta de Zika na República do Uganda, em 1947 [15], respectivamente, também tem criado uma onda de surtos no continente [16–18].

Apesar do crescente interesse no estudo das arboviroses, na África, a real magnitude epidemiológica da dengue, chikungunya, zika e outras arboviroses é pouco conhecida, sobretudo na África Sub-Sahariana. Dentre várias razões destacam-se: ausência de vigilância sistemática [13], similaridade dos sinais e sintomas com outras doenças febris, sobretudo, a malária que é endêmica na região, bem como os desafios para o diagnóstico devido ao desconhecimento dessas doenças e insuficiência de capacidade laboratorial [13,19,20].

Em Moçambique, registrou-se a ocorrência da dengue pela primeira vez em finais de 1984 e princípios de 1985, em um surto que ocorreu na cidade de Pemba, no qual foi identificado por reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR) o sorotipo DENV-3, sendo o primeiro registro da sua ocorrência em África [20]. Desde então, nenhum caso foi notificado até que um novo fosse registrado durante o surto que ocorreu em

2013/2014, nas cidades de Pemba e Nampula no norte do país. Durante a ocorrência, Massanguaia e colaboradores [21] identificaram por RT-PCR o DENV-2, em 3 amostras de um total de 193 pacientes suspeitos. Ainda no registro de ocorrência de arbovírus no país, uma pesquisa sorológica evidenciou, em 2015, a ocorrência da chikungunya em Maputo, região sul de Moçambique [22].

Até o presente, os principais registros sobre a ocorrência de arboviroses em Moçambique limita-se a descrição dos surtos. Entretanto, a identificação do *Aedes aegypti* em algumas cidades do país [23] e do *Aedes albopictus* em Maputo [24], sugere que o país é vulnerável para a ocorrência dessas doenças, uma vez que eles são importantes vetores na cadeia epidemiológica das arboviroses.

Deste modo, hipotetiza-se que a dengue, chikungunya e outras arboviroses ocorrem no país, mas são negligenciadas no contexto da saúde pública local, pois, à semelhança de outros países africanos, a endemicidade da malária e de outras doenças infecciosas febris induz a uma subnotificação dos arbovírus como etiologia das doenças febris agudas, devido a similaridade entre os sinais e sintomas.

Com o objetivo de investigar a presença dos arbovírus como causa de doenças febris agudas em Moçambique, o Instituto Nacional de Saúde (INS), por um lado, instalou postos sentinelas em Maputo, Pemba, Nampula, Caia e Quelimane, nos quais se realiza a vigilância para doenças febris agudas. Por outro lado, o INS realiza atividades de inspeção ambiental e entomológica para a identificação dos mosquitos *Aedes spp* circulantes, sua distribuição, densidade vetorial, sua biologia e comportamento de modo a permitir predições de risco de ocorrência de doenças por eles transmitidas.

O presente trabalho irá basear-se nos dados produzidos na cidade de Quelimane, onde até o início da vigilância não havia relatos de infecções por arbovírus, bem como a ocorrência do mosquito vetor. Assim, espera-se que o trabalho contribua com informações sistematicamente produzidas, sobre o papel dos arbovírus na etiologia das doenças febris agudas.

2. Revisão da literatura

2.1. Arboviroses

As arboviroses são doenças causadas por vírus que infectam o homem e outros animais vertebrados. O termo “arbovírus” provém do inglês “Arthropod-borne viruses”, para designar o conjunto de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, nos quais ocorre parte do seu ciclo biológico [1]. Existem mais de 100 arbovírus capazes de provocar viremia no homem, cuja maioria é transmitida por mosquitos, incluindo o vírus da dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) e zika (ZIKV) [25]. Esses vírus encontram-se distribuídos em todo o mundo, mas com maior prevalência nas regiões tropicais, devido a existência de condições ecológicas favoráveis para a proliferação dos seus vetores [26].

Os arbovírus ocorrem naturalmente em ciclos silvestres, envolvendo vários hospedeiros vertebrados como primatas não humanos, sobre os quais os vírus garantem a sua manutenção e persistência na natureza [1,27]. Entretanto, alguns arbovírus como DENV, CHIK e ZIKV conseguiram adaptar-se ao longo do tempo a outros ciclos de transmissão e atualmente infectam o homem no seu local de residência. A conjuntura atual, caracterizada pelas mudanças climáticas, urbanização sem provisão de medidas do saneamento do meio, comércio e trânsito livre, migrações, destruição de florestas, constitui a força motriz para a manutenção e dispersão desses vírus para novos ambientes [28].

Surtos e epidemias ocorrem mediante relações complexas entre três elementos, nomeadamente o vírus (patogenicidade da cepa viral), o artrópode (densidade do vetor, sua capacidade e competência vetorial) e o vertebrado (existência do reservatório do vírus, suscetibilidade do hospedeiro para permitir uma viremia em títulos suficientes para a infecção do vetor) [29]. As formas clínicas produzidas no homem variam conforme o tipo de arbovírus responsável pela infecção e a gravidade depende, sobretudo da virulência da cepa e das condições biológicas do hospedeiro.

Em países em desenvolvimento, como muitos do continente africano, as arboviroses ocorrem de forma endêmica, mas são frequentemente subnotificadas, embora possam contribuir substancialmente para ocorrência de doenças febris de etiologia indeterminada, por um lado. Por outro, em regiões não endêmicas, a ocorrência de surtos causados por arbovírus é, muitas vezes, imputada a outras etiologias endêmicas nessas regiões. Em ambas situações, a maior dificuldade provém da ausência da especificidade de sinais e sintomas que ocorrem durante o período virêmico, desafiando os clínicos no seu diagnóstico preciso. Outras questões são relativas à insuficiência tanto de recursos humanos devidamente treinados para o

reconhecimento clínico, quanto de infraestruturas laboratoriais preparadas para oferecer a cobertura básica necessária para o diagnóstico dos arbovírus e outros agentes etiológicos de doenças febris agudas.

2.2. Epidemiologia e manifestações clínicas da dengue

2.2.1. Epidemiologia da dengue

A dengue é uma arbovirose causada por um vírus RNA, com 4 sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), pertencente ao género *Flavivirus*, família Flaviviridae. O homem é infectado ao ser picado pela fêmea de mosquitos do género *Aedes* infetada pelo vírus. Esta doença é endêmica nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, com registro de epidemias nas Américas, África, no Leste do Mediterrâneo, no Sudeste Asiático e no Oeste do Pacífico. Dados publicados por Bhatt e colaboradores [30] indicam que a dengue ocorre em mais de 100 países do mundo, com maior risco de transmissão entre os países tropicais das Américas e da Ásia.

A ocorrência da dengue na África é secular. Contudo, o continente possui poucos estudos sobre a dengue [31,32] dificultando a definição de estimativas da real carga da doença. Entretanto, supõe-se que a verdadeira magnitude da dengue no continente esteja próxima àquela estimada para as Américas, ou seja, em torno de 16% dos casos globais da dengue ocorrem na África [30].

Entre finais do Século XIX, e princípios do século XX, foram reportadas epidemias de dengue no Egipto (1887, 1927), Burkina Faso (1925), África do Sul (1926-1927), Zanzibar (1927-1928) e Senegal (1927-1928) [13]. No entanto, foi a partir da década de 60 que a ocorrência de dengue cresceu no continente, com registro de epidemias nos países da África Ocidental: Nigéria (1964-1968); Senegal (1974-1985); Burkina Faso (1983-1986); Senegal (1980, 1990, 1999-200) e da África Oriental: Ilhas reunião (1977-1978); Seychelles (1977-1979); Kenya (1982); Moçambique (1985-1986); Sudão (1985-1986); Somália (1992-1993); Comores (1992-1993) e Djibouti (1992-1993) [13,20]. Na última década, foram registrados alguns surtos em Madagascar (2012) Tanzânia (2014) e Moçambique (2013/2014) [13,33–35].

O vírus da dengue foi isolado pela primeira vez no continente africano, na Nigéria, na década de 1960, tendo sido identificado os sorotipos DENV-1 e DENV-2 [36]. Atualmente, os

quatro sorotipos circulam de forma endêmica no continente [37]. Em Moçambique, já foram identificados os sorotipo 3 [20] e o sorotipo 2 [21].

2.2.2. Manifestações clínicas da dengue

A maior parte das infecções por dengue é assintomática [30,38]. As manifestações clínicas quando presentes assemelham-se a aquelas apresentadas por outras arboviroses ou outras doenças febris agudas. A morbidade é alta e a mortalidade é relativamente baixa [39].

Depois do período de incubação de três a sete dias [32], aparecem os sinais e sintomas que podem durar entre dois a sete dias. Didaticamente, o período virêmico é dividido em três fases: fase aguda, fase crítica e fase de recuperação [38]. A fase aguda, que dura de dois a sete dias, caracteriza-se por febre de início súbito, acompanhada, geralmente, de cefaleia, dor retro-orbitária, mialgia, artralgia, anorexia, dor de garganta, exantema e vômitos [32,38]. A fase crítica ou defervescência, com duração de um a três dias, é caracterizada pela disfunção endotelial com aumento da permeabilidade capilar e o extravasamento do plasma para o espaço extravascular. Esta fase ocorre entre 10 a 15% dos pacientes que apresentam manifestações clínicas da dengue. Por último, a fase de recuperação, que pode durar de um a três dias, é caracterizada por registro de melhorias da disfunção endotelial e reabsorção do fluido extravascular [32,38].

Atualmente, as formas clínicas da dengue são classificadas em dengue (com ou sem sinais de alerta) e dengue grave [40–42]. A dengue sem sinais de alerta corresponde à fase aguda da doença. A dengue com sinais de alerta caracteriza-se pela diminuição abrupta da temperatura, dor abdominal intensa e contínua, náusea e vômitos persistentes, hepatomegalia e sangramentos espontâneos. O aumento do hematócrito acompanhado de diminuição das plaquetas determina o início da fase crítica. A dengue grave é definida como a forma de evolução que apresenta a fase crítica na sua maior intensidade, com importante extravasamento de plasma levando ao choque e/ou insuficiência respiratória e evolução para disfunção orgânica.

A infecção pelo vírus da dengue confere imunidade permanente contra o sorotipo causador da infecção, mas induz uma proteção parcial e transitória contra os demais três sorotipos, ou seja, não oferece proteção cruzada entre si [38,43]. Todos os sorotipos podem induzir quadros graves da doença [38].

Há evidência na literatura de que a ocorrência das formas mais graves da dengue, ou seja, a ocorrência da febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome de choque da dengue (SCD) estaria frequentemente associada à virulência da cepa infectante (teoria de Rosen) [44] ou às infecções sequenciais por diferentes sorotipos do vírus dengue (teoria de Halstead) [45–47]; não obstante o registro de ocorrência de formas mais graves em primo-infecções [48,49]. Recentemente, tem sido proposta a teoria de multicausalidade, segundo a qual, se aliam vários fatores de risco às teorias de infecções sequenciais e de virulência da cepa [50,51].

2.3. Epidemiologia e manifestações clínicas da chikungunya

2.3.1. Epidemiologia da chikungunya

A chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus chikungunya (CHIKV) pertencente ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*. Na África Sub-Sahariana ocorrem ciclos silvestres envolvendo primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* [52].

O vírus CHIKV foi isolado pela primeira vez em soro humano no distrito de Newale, na Tanzânia, em 1953 [14,53]. A designação “chikungunya” deriva da língua Maconde falada no norte de Moçambique e na região sudeste da República da Tanzânia. Esse termo foi usado para caracterizar a forma encurvada devido à ocorrência de fortes dores articulares entre os pacientes infectados [14].

Desde então, surtos de CHIKV foram reportados em muitos países da região Central e Austral da África: Tanzânia (1952); Uganda (1958; 1971 e 1985); República Democrática do Congo (1960; 1999-200); Zimbábue (1961; 1963); África do Sul (1970); Quênia (1970, 2004, 2005); Seychelles (2005); Ilhas Reunião (2005-2006) e Madagascar (2006). Na Ásia, também foram registrados surtos na Tailândia (1960, 1962-1964, 1988, 1991-1993, 1995), Vietnam (1965, 1967), Indonésia (1973, 1980, 1983-1984, 1998-1999, 2000-2005) e Índia (1963-1965, 1973, 2006) [54].

Apesar do registro de infecções por CHIKV em muitos países Africanos e Asiáticos, a chikungunya caracterizou-se como uma arbovirose emergente e relevante para a saúde pública em 2005 e 2006, em decorrência de surtos nas ilhas do Oceano Índico (Comores, Maurítânia, Madagáscar, Reunião e Seychelles) e no Sudeste Asiático (Índia) [55].

Desde então, o vírus propagou-se rapidamente para outros países de África, Ásia e Europa por meio de turistas infectados pelo vírus, ainda no período de incubação, que saíram

de locais endêmicos do Sudeste Asiático e das Ilhas do Oceano Índico [54,56]. Entre 2006 e 2007 alguns países Europeus como Itália, Espanha, Alemanha, registraram a ocorrência de surtos da chikungunya [57]. Nas Américas, o CHIKV foi identificado pela primeira vez no Caribe, em 2013 [4,58].

2.3.2. Manifestações clínicas da chikungunya

A principal forma de transmissão do CHIKV ocorre pela picada de mosquitos vetores do gênero *Aedes*, durante o repasto sanguíneo. Todos os indivíduos não previamente expostos ao CHIKV (suscetíveis) têm risco de adquirir infecção e manifestar a doença, desenvolvendo imunidade duradoura e protetora contra novas infecções.

O período de incubação extrínseco (no mosquito) pode durar 10 dias. No homem, o período de incubação é tipicamente de 3 a 7 dias (podendo variar de 1 a 12 dias) [8,52]. Depois do período de incubação intrínseco (no homem), aparece a viremia que pode persistir por até 10 dias. A maior parte dos casos de infecção por CHIKV são sintomáticos. Embora a letalidade seja baixa, a doença tem uma alta morbidade, associada à artralgia persistente, e por vezes, incapacitante. Os casos mais graves ocorrem, geralmente, em extremos de idade e em pacientes com co-morbidade [58].

As manifestações clínicas são semelhantes às de outras doenças febris agudas, como dengue e zika. Contudo, a chikungunya pode evoluir em três fases: a fase febril ou aguda, a fase subaguda e a fase crônica [59]. A fase aguda é caracterizada pela febre de início súbito, acompanhada de artralgia intensa, cefaleia, mialgia, dores nas costas, fadiga e exantema maculopapular. A febre pode ser contínua ou intermitente, com duração média de 7 dias. A característica mais evidente nas infecções por CHIKV é a artralgia. Geralmente, a dor articular é poliarticular e simétrica, não obstante a existência de casos de dor assimétrica e monoarticular em todas as fases da doença. Outros sinais e sintomas da fase aguda incluem calafrios, conjuntivite, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia e edema articular.

Na fase subaguda a febre desaparece, podendo haver persistência ou agravamento de artralgia. Este período pode prolongar-se por até 3 meses depois do início das manifestações clínicas. Nesta fase, alguns pacientes apresentam poliartrite distal, exacerbação da dor em articulações e ossos previamente lesionados e tenosinovite hipertrófica subaguda nos pulsos e tornozelos [8]. Há casos em que a artralgia persiste por mais de 3 meses após o início dos sintomas, caracterizando a fase crônica da doença. Esta fase inicia após a etapa subaguda (> 3 meses). O sintoma mais comum é o acometimento articular persistente nas mesmas

articulações atingidas durante a fase aguda e subaguda, caracterizado por: dor com ou sem edema, limitação de movimento e, por vezes, com deformidade. Pesquisas recentes indicam uma provável ocorrência de complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain Barré e a paralisia flácida, associadas às infecções por CHIKV [60,61].

2.4. Epidemiologia e manifestações clínicas da zika

2.4.1. Epidemiologia da zika

A zika é uma arbovirose causada pelo vírus zika (ZIKV), membro do género *Flavivirus*, família *Flaviviridae*. O vírus zika foi isolado pela primeira vez em 1947 em um macaco Rhesus, na floresta Zika, na Uganda, do qual deriva o seu nome [15]. À semelhança do DENV e CHIKV, o ciclo natural de transmissão do ZIKV envolve primatas não humanos e mosquitos silvestres do género *Aedes*.

Em 1948, o ZIKV foi isolado em mosquitos e, em 1954, foi isolado pela primeira vez em humanos, na Nigéria [62,63]. Em 1957, foram encontrados anticorpos contra zika em soro humano em Moçambique [64]. A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre pela picada de mosquitos vetores do género *Aedes* infectadas pelo vírus [65,66]. As outras formas prováveis de transmissão do ZIKV incluem a via sexual [67,68] e a transfusão sanguínea [69].

Investigações sorológicas realizadas entre as décadas 50 e 80 evidenciaram que o ZIKV ocorreu de forma endêmica em alguns países africanos e no Sudeste Asiático [70,71]. Até então, não tinha muita importância para a saúde pública e tornou-se notável a partir de 2007 durante a epidemia que assolou mais que a metade da população na Ilha de Yap em Micronésia [72]. Desde então, o vírus ZIKV se propagou rapidamente pelo mundo. Surtos e epidemias foram reportados em vários países, sobretudo das Américas e do Caribe, com particular relevância para os surtos que ocorreram na Polinésia Francesa, em 2013 [73] e no Brasil, em 2015 [5,6,74]. No continente africano, foram reportados surtos da zika no Gabão em 2007 [18] e, em Cabo Verde, em 2015 [16].

2.4.2. Manifestações clínicas da zika

As infecções pelo zika abrangem desde a ausência dos sintomas (cerca de 80% dos casos) até a uma síndrome febril semelhante a gripe, acompanhada de outros sintomas não específicos, nomeadamente: cefaleia; erupções cutâneas (exantema); prurido; anorexia; fraqueza; edema; artralgia; mialgia; dor retro-orbital. Outros sintomas, embora raros, incluem:

dor abdominal; diarreia; constipação; fotofobia; conjuntivite e pequenas úlceras na mucosa oral [71].

2.5. Diagnóstico laboratorial de arbovírus

Os exames laboratoriais são fundamentais para a confirmação do diagnóstico etiológico das doenças cujas manifestações clínicas não são específicas. Eles podem ser úteis na vigilância de agravos, na identificação e no monitoramento das cepas.

Em geral, o diagnóstico laboratorial das infecções por arbovírus pode ser feito através de: **1**-isolamento viral; **2**-detecção de partículas virais (RNA) pela reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa (RT-PCR), ou por RT-PCR em tempo real (qRT-PCR); **3**-detecção de anticorpos por método indireto de imunofluorescência, imunocromatografia, ou outros testes sorológicos incluindo o imunoenensaio enzimático (ELISA), inibição de hemaglutinação (HI), [75], testes de neutralização por redução de placa (PRNT), teste de fixação do complemento (FC), e **4**-por detecção de antígenos virais.

A escolha do método a utilizar depende do período da coleta da amostra durante a evolução da doença. O isolamento viral e o RT-PCR são métodos específicos para confirmação do diagnóstico. São usados, geralmente, nos primeiros cinco dias depois do aparecimento dos sintomas e, principalmente, nos três primeiros dias, isto é, quando a viremia está no ápice. No caso particular da dengue, pode-se empregar também o NS1 ELISA, uma técnica que detecta uma proteína não estrutural (NS1) do vírus, presente na corrente sanguínea dos pacientes nos primeiros dias de infecção.

Os anticorpos costumam ser detectados por métodos sorológicos, geralmente, a partir do quinto dia da manifestação de sinais e sintomas, nas infecções primárias devido à produção tardia de anticorpos. Assim, o ideal para o diagnóstico sorológico de uma infecção recente é fazer o teste em amostras pareadas de soro coletadas na fase aguda e convalescente. O soro da fase aguda deve ser coletado até o sétimo dia depois do início dos sintomas e o soro da fase convalescente deve ser coletado entre a segunda e a quarta semanas depois do início da doença. Um resultado positivo nos testes sorológicos oferece apenas um diagnóstico presuntivo, em particular em contextos epidemiológicos de transmissão de muitos arbovírus da mesma família, em função da possibilidade de reações cruzadas.

Amostras coletadas antes do sétimo dia depois do início da doença podem não ter anticorpos em níveis detectáveis, daí a necessidade da amostra da fase convalescente para se

avaliar a soroconversão. A detecção de anticorpos IgM para um certo arbovírus pode indicar uma infecção em curso, e sugere a realização de testes de confirmação, por um lado. Por outro, a detecção dos anticorpos IgG na amostra da fase aguda com IgM negativo indica uma infecção pregressa, ocorrida em qualquer momento no passado. Outra questão para se levar em consideração na interpretação dos resultados sorológicos, é a possibilidade do registro de resultados falso-positivos ou ocorrência de reações cruzadas.

2.6. Vigilância para doenças febris agudas

Uma das atuais preocupações no mundo é a propagação sem precedentes de arbovírus, causando inestimáveis encargos econômicos para o atendimento dos casos em vários países. A apresentação clínica comum a muitas doenças febris agudas é um grande desafio em áreas endêmicas para outras doenças infecciosas, como a malária e a leptospirose, por exemplo.

Em Moçambique, o Instituto Nacional de Saúde (INS) fortaleceu a vigilância da síndrome febril aguda para o diagnóstico de doenças emergentes e reemergentes, com a ocorrência de surtos da dengue nas províncias de Nampula e Cabo Delgado, em 2013/2014. Atualmente, conta-se com mais de cinco postos de vigilância para doenças febris agudas, localizados nas regiões norte, centro e sul do país. A medida visa aumentar a sensibilidade e ampliar a capacidade de monitoramento de casos suspeitos de infecções por arbovírus, para além da identificação precoce de surtos dessas doenças.

A vigilância para doenças febris agudas oferece melhorias no processo diagnóstico de casos através da observação exaustiva das características clínico-epidemiológicas e da realização de exames laboratoriais específicos, fortalecendo, de igual modo, a conduta clínica, diagnóstica e terapêutica, diante de enfermidades de difícil distinção.

2.7. Diagnóstico diferencial

Nos países tropicais é comum a ocorrência simultânea de mais de um patógeno produzindo manifestações clínicas similares. Dengue, chikungunya e zika podem manifestar-se de forma parecida com muitas outras doenças febris, não sendo possível o diagnóstico etiológico apenas com base nas manifestações clínicas. A natureza não específica dos sinais e sintomas dessas doenças, que podem ser confundidas com outras, como a malária e a gripe, ou entre elas, a depender do que é endêmico na região, pode induzir a tomada de decisões clínicas incorretas. Um exemplo dessa dificuldade foi o surto de dengue que ocorreu em Pemba, em 1984/85 inicialmente confundido com malária [20].

Em Moçambique, a insuficiência de dados detalhados e precisos sobre a distribuição e ocorrência de infecções por arbovírus, sobre sua incidência populacional e sua prevalência entre pacientes com doenças febris agudas, dificultam a adoção de um fluxograma no país para o diagnóstico diferencial. Pesquisas realizadas em alguns países africanos evidenciam que muitos casos de doenças febris diagnosticados como sendo malária, na sua maioria são causados por outros agentes infecciosos [76,77]. Assim, na impossibilidade de um diagnóstico específico, o tratamento costuma ser orientado pelos sinais e sintomas, ou mesmo opta-se pela administração de antimaláricos, mesmo sem a confirmação etiológica.

Uma avaliação clínica minuciosa, aliada a elementos epidemiológicos detalhados, ajudam a estabelecer um diagnóstico diferencial. Porém, a certeza do diagnóstico é conseguida mediante evidências laboratoriais. Outras doenças febris que podem ser consideradas no diagnóstico diferencial das arboviroses incluem: sarampo, infecção aguda por HIV, febre tifóide, hepatites virais, malária, leptospirose, influenza, rubéola, mononucleosis infecciosa e rickettsiosis.

2.8. Mosquitos vetores de arbovírus

Os principais mosquitos vetores de arbovírus que infectam humanos no mundo são: *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) e o *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) [25,78], pertencentes à ordem Díptera, subordem Nematóceras, família Culicidae, e subfamília Culicinae [79]. Relatos de casos autóctones de infecção por arbovírus foram associados à ocorrência desses mosquitos em Camarões e no Gabão, na África [80–82]; Itália e França, na Europa [56,83] e em vários países das Américas [84].

Influenciados pelas mudanças climáticas, há registro crescente da presença dos mosquitos vetores em áreas tradicionalmente conhecidas como impróprias para a sua sobrevivência [85]. A rápida disseminação dos mosquitos vetores de arbovírus é suportada pelas migrações e o comércio livre de mercadorias que facilitam o transporte de ovos e larvas entre vários quadrantes do planeta. O aumento da população, o crescimento urbano desordenado e não planejado (aglomerados populacionais), habitações precárias, falta ou insuficiência do saneamento básico (coleta de lixo, abastecimento de água e drenagem pluvial), criam condições ecológicas favoráveis para o estabelecimento e proliferação desses mosquitos.

No continente africano, existem muitas espécies de mosquitos do género *Aedes (Stegomyia)* implicadas nos ciclos silvestre e urbano de transmissão de arbovírus. Desses mosquitos, o *Ae. Aegypti* é o principal protagonista, transmitindo dentre vários arbovírus, os

vírus da dengue, chikungunya, zika e da febre amarela. Outros mosquitos com competência vetorial para arbovírus são: *Ae. africanus*; *Ae. furcifer* e *Ae. Vitattus* [71,86]. O registro de *Ae. albopictus* é recente no continente. O primeiro relato ocorreu em 1989 [87] na África do Sul e, em 1991, foi registrado na Nigéria [88]. A partir do ano 2000, propagou-se para outros países africanos [87].

Em Moçambique, os mosquitos do género *Aedes*, incluindo as espécies *Ae. Aegypti*, *Ae. Africanus* e *Ae. simpsoni*, foram encontrados na década 1940 [64]. Recentemente, cinco décadas depois, confirmou-se através de uma investigação entomológica a ocorrência do *Ae. aegypti* em algumas cidades do país [23]. Em finais de 2015, foi encontrado, casualmente, pela primeira vez o *Ae. albopictus* na cidade de Maputo, na região sul do país [24].

3. Pergunta de investigação

Há ocorrência de arboviroses (dengue, chikungunya e zika) na cidade de Quelimane?

4. Objetivos

4.1. Geral: Investigar a ocorrência de arboviroses (dengue, chikungunya e zika) na cidade de Quelimane – Moçambique.

4.2. Específicos

- Investigar a frequência de ocorrência de dengue, chikungunya e zika em pacientes com doenças febris agudas, atendidos nos centros de saúde na cidade de Quelimane;
- Investigar se os fatores sociodemográficos estão associados à detecção de anticorpos contra dengue e chikungunya;
- Estimar, por meio de um inquérito entomológico e ambiental, a densidade vetorial dos mosquitos do género *Aedes* na área de estudo;
- Identificar os criadouros onde ocorre a reprodução do *Aedes spp.*

5. Referencial teórico

A transmissão de arbovírus é secular e relevante para a saúde pública. A experiência sobre campanhas recentes para erradicação dos principais vetores não revelou resultados encorajadores [89,90]. Atualmente, estima-se que aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas vivam em situações de risco para se infectar por dengue no mundo [2] e as estimativas

aproximadas possivelmente passarão a valer para chikungunya e zika em médio prazo, devido a sua capacidade de dispersão rápida desde a sua reemergência, entre 2004 e 2007. Não existem até ao momento (com exceção da febre amarela) terapias ou vacinas disponíveis ao público para o tratamento ou prevenção de enfermidades como dengue, chikungunya e zika. Assim, o tratamento biomédico convencional não pode por si só garantir o controle dessas doenças.

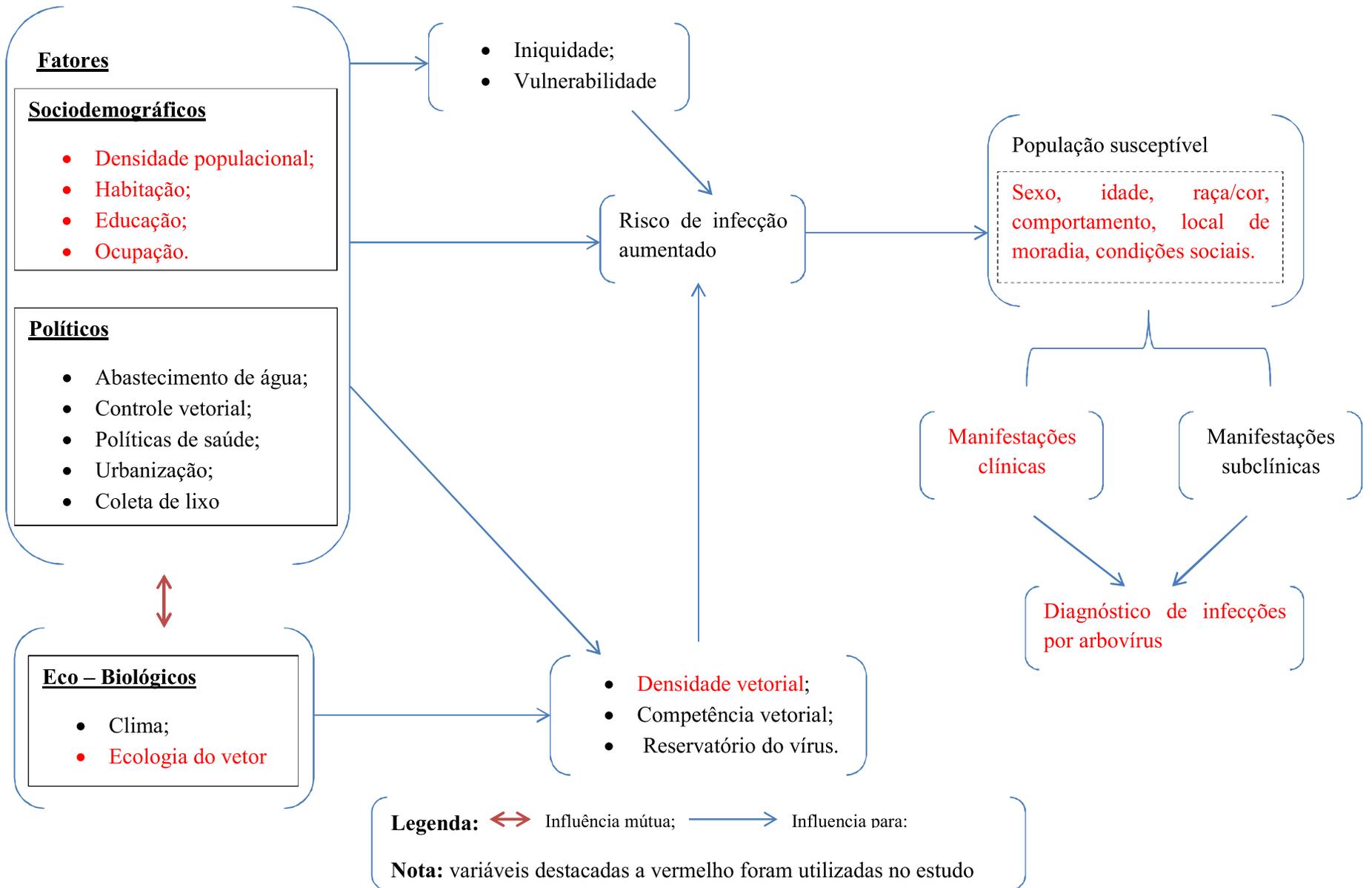
O sucesso para a manutenção desses vírus na natureza e a consequente transmissão decorre da complexidade da ecologia do vetor, associada a outros fatores interconectados, tais como: fatores sociais, políticos e econômicos, moldados pela distribuição diferencial dos recursos na população. Assim, para a compreensão do processo saúde-doença envolvendo a transmissão de arbovírus, recorreremos ao modelo da ecossáude [91]. Este modelo, trás uma reflexão sobre a importância dos ecossistemas e a participação social para o entendimento das questões relacionadas com a saúde.

Assim, o enfoque da ecossáude inspira uma nova forma de análise do processo saúde-doença, dando ênfase a uma abordagem multidisciplinar para o estudo dos determinantes sociais da saúde [92,93] que envolve um conjunto de condições sociais e ambientais que podem caracterizar a dinâmica da transmissão dos arbovírus e a dispersão do mosquito vetor. Essas condições incluem as inter-relações entre os fatores, sociodemográficos, ecológicos, clínico-epidemiológicos, políticos, econômicos e culturais.

Portanto, o esforço para o entendimento das relações entre esses fatores e o risco de infecção pelo vírus, particularmente de dengue, chikungunya e zika, pode proporcionar evidências para guiar medidas de controle de transmissão dessas doenças. Assim, com base nas reflexões apresentadas, foi construído um modelo das inter-relações entre as diferentes dimensões que influenciam para a ocorrência das arboviroses.

Fig.1. Modelo conceitual

Fig.1. Modelo conceitual



6. Justificativa

A reemergência da dengue na região norte de Moçambique e a detecção de casos de chikungunya no sul do país, bem como a presença dos mosquitos *Aedes spp.* em diferentes áreas demandam estudos visando o conhecimento da real situação epidemiológica das arboviroses em Moçambique e o seu impacto para a saúde pública.

A relevância do tema sustenta-se também por se acreditar na possibilidade da ocorrência de uma transmissão “silenciosa” dos arbovírus no país. Ou seja, dentre as doenças febris agudas registradas nos centros de saúde do país podem ocorrer casos de arboviroses que não são identificados devido à similaridade de sintomas com outras doenças como malária, e pelo contexto de desconhecimento da importância epidemiológica dessas doenças no país.

Em Quelimane, região centro de Moçambique, não existem dados relativos à ocorrência de arbovírus e tão pouco se conhece sobre a presença dos mosquitos vetores. Assim, esta pesquisa é fundamental para a saúde pública local e do país na medida em que produzirá evidências sobre a possível ocorrência de infecções por arbovírus e seus vetores. Além disso, poderá auxiliar na planificação dos serviços de saúde, tendo em vista a orientação do diagnóstico e conduta frente a doenças cujos sinais e sintomas parecem indistinguíveis e a provisão de medidas de combate do mosquito vetor.

7. Metodologia

7.1. Desenho de estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, que utiliza a base de dados providos de um sistema de vigilância para doenças febris agudas, realizado em cinco centros de saúde da cidade de Quelimane entre fevereiro e junho de 2016, com o objetivo de identificar casos de arboviroses entre os pacientes com doenças febris agudas. Também foram realizadas inspeções ambientais nas residências dos pacientes para a coleta de larvas de mosquitos para a identificação das espécies *Aedes spp.* que proferam na cidade e identificação dos potenciais criadouros.

7.2. Caracterização do local de estudo

A cidade de Quelimane é a capital da Zambézia, província da região central de Moçambique. A cidade localiza-se no extremo sudeste da província, no estuário do rio dos Bons Sinais, a 20 km do Oceano Índico e ocupa uma área de 117 km² [94].

Administrativamente, é dividida em 4 postos administrativos, com um total de 46 bairros. A população residente na cidade de Quelimane foi estimada em 245.886 habitantes para 2016; no último Recenseamento Geral da População e Habitação, realizado em 2007, a população residente na cidade foi contabilizada em 195.758 habitantes [95].

O clima é tropical úmido, com duas estações distintas: seca ou de inverno e úmida ou de verão. A precipitação média anual é de 1395 mm, com o registro de chuvas intensas durante o verão, entre os meses de dezembro e abril, cobrindo 87% da precipitação anual. A temperatura média anual é de 25,7 °C [96].

Nos últimos anos, a cidade de Quelimane tem apresentado um crescimento populacional e um incremento na ocupação dos espaços para construção de residências. As habitações são precárias e os bairros não apresentam uma estrutura urbana devidamente organizada. Esta situação dificulta a instalação de uma rede de saneamento básico (coleta de resíduos sólidos e a de águas pluviais) e, por conseguinte, se cria um cenário ideal para a ocorrência, sobretudo na época chuvosa, de doenças como diarreias, cólera, malária e outras de interesse para a saúde pública.

Em Quelimane, há uma rede de 19 centros de saúde públicos em funcionamento. O sistema de vigilância foi inicialmente implantado no centro de saúde de Coalane, localizado no Bairro Coalane na Avenida Julius Nyerere – cidade de Quelimane. O local foi escolhido como unidade sentinela pelo INS, por causa do seu raio de abrangência no que tange ao atendimento hospitalar, cobrindo um terço dos bairros residenciais e pela sua localização numa zona entre uma área peri-urbana e urbana. Após a identificação dos casos de chikungunya no centro de saúde de Coalane, outros quatro centros de saúde foram selecionados pelo INS para também conduzir uma vigilância para doenças febris agudas. Os centros escolhidos foram: centro de saúde 17 de setembro, centro de saúde 4 de dezembro, centro de saúde 24 de julho e o pronto socorro do hospital provincial de Quelimane.

7.3. Vigilância para doença febril aguda

Os centros de saúde onde a vigilância foi conduzida possuem unidades de pronto socorro que funcionam 24 horas por dia e sete dias por semana. Entretanto, a vigilância para doenças febris agudas foi realizada de segunda a sextas-feiras, entre 7 h: 30 minutos e 13 horas. Os clínicos foram treinados para a identificação de pacientes que preenchessem os critérios de elegibilidade para a vigilância.

Foram elegíveis os pacientes com idade não inferior a cinco anos completos, com febre referida ou medida, de duração máxima de até sete dias no momento da consulta. Não foram elegíveis para a vigilância os pacientes que apresentassem pneumonia confirmada por radiografia do tórax ou com suspeitos de tuberculose, bronquite e amigdalite.

Os pacientes foram recrutados mediante um consentimento verbal, antecedido pela explicação dos objetivos da vigilância. Para colheita de dados, cada paciente respondeu um questionário elaborado pelo INS com perguntas fechadas contemplando questões relacionadas à situação sociodemográfica, epidemiológica, clínica e ambiental. Durante o recrutamento, foram registrados os números de telefone e endereços dos pacientes para facilitar o lembrete sobre o retorno para a coleta de sangue na fase convalescente (14 dias depois da coleta da amostra na fase aguda) e permitir a visita às casas para a obtenção das coordenadas geográficas e realização das inspeções ambientais e entomológicas.

7.4. Procedimentos laboratoriais

Depois de responder ao questionário, os pacientes foram submetidos a coleta de amostra de sangue de 10 mL por venopunção em um tubo seco. As amostras de sangue foram mantidas num refrigerador (6 °C) e, diariamente foram transportadas refrigeradas com gelo reciclável para o laboratório provincial, onde foram centrifugadas, a 2500 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos. O soro resultante foi armazenado em alíquotas de 2 mL e congelado num freezer a -20 °C. Mensalmente, as amostras foram enviadas para o laboratório de referência nacional, do Instituto Nacional de Saúde, em Maputo.

Em Quelimane, no hospital provincial, parte do soro obtido das amostras da fase aguda foi testado através dos testes imunocromatográficos rápidos, para detecção de anticorpos anti-dengue (kit SD BIOLINE Dengue Duo: Dengue NS1 Ag + IgG/IgM) e anti-chikungunya (Kit SD BIOLINE Chikungunya IgM). Os resultados foram disponibilizados aos pacientes logo depois da sua realização. Já no Laboratório do INS, as amostras foram testadas através das técnicas: ELISA IgM e IgG para detecção de infecções pelos vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV); qRT-PCR Trioplex para DENV, CHIKV e ZIKV. O PRNT₅₀ foi empregado em um subgrupo de amostras que foram positivas para CHIKV por ELISA IgG. As amostras da fase convalescente foram testadas por ELISA para detecção de infecções pelo CHIKV. Para cada um dos ensaios foram seguidas as instruções do fabricante ou um protocolo validado para os devidos efeitos.

7.5. Vigilância entomológica

Através dos números de celulares disponibilizados pelos pacientes durante o recrutamento, a equipe estabeleceu contato tendo em vista a realização da inspeção ambiental e entomológica nas suas casas. As inspeções basearam-se na identificação de criadouros, coleta de larvas de mosquitos e instalação de armadilhas de oviposição (ovitrampa).

As armadilhas foram instaladas no peri-domicílio. Trata-se de um pote de flores de cor preta com uma infusão de gramíneas e uma palheta de madeira no seu interior. A remoção da armadilha foi feita sete dias depois da sua instalação. As amostras foram encaminhadas para o insetário provincial onde as larvas foram criadas por até 10 dias, período considerado suficiente para eclosão de adultos. Assim, os adultos que eclodiram eram aspirados e em seguida, colocados num freezer a -20 °C por 10 minutos. Na sequência, foram contabilizados e enviados para o laboratório de Entomologia do INS, para a identificação. Os ovos nas palhetas foram contabilizados e em seguida, as palhetas foram incineradas.

7.6. Confirmação laboratorial dos casos

Foi definido como caso de infecção aguda, confirmado laboratorialmente, o paciente com qRT-PCR positivo ou ELISA NS1 positivo (caso particular da dengue), na amostra de soro da fase aguda; ou ainda por seroconversão de IgM e/ou IgG. Os resultados do RDT não foram utilizados para a confirmação laboratorial do caso devido a discordância dos resultados em relação ao teste de referência (ELISA).

Por outro lado, foi definido como caso provável, o paciente suspeito cujo soro da amostra aguda apresenta anticorpos IgM e/ou IgG. Assim, de acordo com o tipo de anticorpos presentes no soro dos pacientes, os casos prováveis foram classificados conforme segue abaixo:

- Apenas IgM positivo : provável infecção aguda;
- IgM e IgG positivos : provável infecção recente; e
- Apenas IgG positivo : provável infecção pregressa.

Os resultados do PRNT foram utilizados para reforçar aqueles obtidos no ELISA, dado que apenas foram testadas as amostras de fase aguda.

7.7. Definição das variáveis

Para o presente estudo, foram analisadas as variáveis sociodemográficas (sexo, idade, nível de escolaridade, ocupação), epidemiológicas (infecção aguda, recente e pregressa por

arbovírus), manifestações clínicas (febre, cefaleia, artralgia, mialgia, exantema, dor retro-orbitária e outras), laboratoriais (presença de marcadores do vírus no soro dos pacientes) e ambientais (presença de criadouros na residência, presença do *Aedes spp*).

7.8. Plano de análise estatística

A unidade de análise foi o indivíduo. As respostas dos questionários foram descritas por meio de tabelas de frequências relativas e cálculo de medidas de tendência central e de dispersão. A prevalência de anticorpos foi calculada pela razão entre o número de pacientes positivos e o número total dos pacientes testados multiplicados por uma base decimal (100). Foram feitas análises bivariadas e multivariadas para detecção de possíveis associações, tendo como desfecho a prevalência de anticorpos no soro dos pacientes e como variáveis independentes, as características sociodemográficas. A magnitude das associações foi estimada pela razão de prevalência (RP), com um nível de confiança de 95%. Utilizou-se o coeficiente kappa de Cohen (k) para avaliar a concordância na detecção de IgM anti-CHIKV entre o RDT e o ELISA e para avaliar a concordância na detecção de IgG anti-CHIKV entre o ELISA e o PRNT.

Também foram calculados os índices de positividade da ovitrampa (IPO) e o índice de densidade de ovos (IDO) definidos como: $IPO = NAP/NAE \times 100$ e $IDO = NO/NAP$, onde NAP – número de armadilhas positivas, NAE= número de armadilhas examinadas e NO - número de ovos. As coordenadas geográficas foram exportadas para o programa Qgis 2.14 para localizar, especialmente, os locais de residência dos pacientes em um mapa da cidade.

8. Considerações éticas

Em atenção às normas regulamentares sobre estudos envolvendo seres humanos, o trabalho foi realizado observando-se todos os aspectos éticos, assegurando o consentimento voluntário dos participantes, sigilo de identidade e confidencialidade dos dados. Os questionários foram aplicados por investigadores do INS treinados em matéria de comunicação efetiva para garantir uma boa abordagem aos pacientes. A coleta das amostras de sangue foi realizada por pessoas devidamente treinadas sobre os procedimentos laboratoriais de coleta de amostras. Os riscos para os participantes foram mínimos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia (ISC-UFBA) e pelo Comitê Institucional de Bioética para a Saúde de INS (CIBS).

10. Referências Bibliográficas

- [1] WHO. World Health Organization. Arboviruses Hum Dis 1967:84.
- [2] Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.
- [3] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504–7. doi:10.1038/nature12060.
- [4] Halstead SB. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. *Emerg Infect Dis* 2015;21:557–61. doi:10.3201/eid2104.141723.
- [5] Zanluca C, de Melo VCA, Mosimann ALP, dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110:569–72. doi:10.1590/0074-02760150192.
- [6] Cardoso, C.W. Paploski I et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil 2015.
- [7] Imperato PJ. The Convergence of a Virus, Mosquitoes, and Human Travel in Globalizing the Zika Epidemic. *J Community Health* 2016;41:674–9. doi:10.1007/s10900-016-0177-7.
- [8] CDC, PAHO. Preparedness and Response for Chikungunya Virus Introduction in the Americas. 2011.
- [9] Lyle Peterson, Jamieson D, Powers A, Honein M. Zika Virus. *Centers Dis Control Prev Zika Virus Home* 2016. doi:10.1056/NEJMra1602113.
- [10] Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines* 2014;2:3–9. doi:10.1177/2051013613507862.
- [11] Chawla S, Sahoo SS, Bharti, Singh I, Verma M, Gupta V, et al. Dengue vaccine: Come let???'s fight the menace. *Hum Vaccines Immunother* 2015;11:474–6. doi:10.4161/21645515.2014.981077.
- [12] Weaver SC, Osorio JE, Livengood JA, Chen R, Stinchcomb DT. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2012;11:1087–101. doi:10.1586/erv.12.84.
- [13] Amarasinghe A. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg Infect Dis* 2011;17.

doi:10.3201/eid1708.101515.

- [14] Mason PJ, Haddow AJ. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1957;51:238–40. doi:10.1016/0035-9203(57)90022-6.
- [15] DICK G et al. Zika virus. 1. Isolations and serological specificity. - *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg* 1952;55.
- [16] World Health Organization. Who confirms Zika strains imported from the americas to Cabo Verde. *World Heal Organ* 2016;37:3–5.
- [17] Sergon K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi LS, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:333–7. doi:78/2/333 [pii].
- [18] Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:1–6. doi:10.1371/journal.pntd.0002681.
- [19] Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. *Trends Microbiol* 2014;22:138–46. doi:10.1016/j.tim.2013.12.011.
- [20] Gubler DJ, Sather GE, Kuno G, Cabral JR. Dengue 3 virus transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:1280–4. doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01429.x.
- [21] Massangaie M, Pinto G, Padama F, Chambe G, Da Silva M, Mate I, et al. Clinical and epidemiological characterization of the first recognized outbreak of dengue virus-type 2 in Mozambique, 2014. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:413–6. doi:10.4269/ajtmh.15-0543.
- [22] Gudo ES, Pinto G, Vene S, Mandlaze A, Muianga AF, Cliff J, et al. Serological Evidence of Chikungunya Virus among Acute Febrile Patients in Southern Mozambique. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:1–11. doi:10.1371/journal.pntd.0004146.
- [23] Higa Y, Abílio AP, Futami K, Lázaro MAF, Minakawa N, Gudo ES. Abundant *Aedes (Stegomyia) aegypti aegypti* mosquitoes in the 2014 dengue outbreak area of Mozambique. *Trop Med Health* 2015;43:107–9. doi:10.2149/tmh.2014-29.
- [24] Kampango A, Abílio AP. The Asian tiger hunts in Maputo city—the first confirmed

- report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) in Mozambique. *Parasit Vectors* 2016;9:76. doi:10.1186/s13071-016-1361-4.
- [25] Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. *Elife* 2015;4:1–18. doi:10.7554/eLife.08347.
- [26] Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 2015;4:e18. doi:10.1038/emi.2015.18.
- [27] Calisher CH. Medically important arboviruses of the United States and Canada. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:89–116. doi:10.1128/CMR.7.1.89.Updated.
- [28] Gould, EA & Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases E.A. 2009;103:109–21. doi:10.1016/j.trstmh.2008.07.025.Impact.
- [29] Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* 2010;3:35. doi:10.1186/1756-3305-3-35.
- [30] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504–7. doi:10.1038/nature12060.
- [31] Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* 2013;5:299–309. doi:10.2147/CLEP.S34440.
- [32] Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* 2012;366:1423–32. doi:10.1056/NEJMra1110265.
- [33] Schwarz NG, Girmann M, Randriamampionona N, Bialonski A, Maus D, Krefis AC, et al. Seroprevalence of antibodies against chikungunya, dengue, and Rift Valley fever viruses after febrile illness outbreak, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1780–6. doi:10.3201/eid1811.111036.
- [34] Vairo F, Mboera LEG, de Nardo P, Oriyo NM, Meschi S, Rumisha SF, et al. Clinical, virologic, and epidemiologic characteristics of dengue outbreak, Dar es Salaam, Tanzania, 2014. *Emerg Infect Dis* 2016;22:895–9. doi:10.3201/eid2205.151462.
- [35] Chipwaza B, Mugasa JP, Selemani M, Amuri M, Mosha F, Ngatunga SD, et al. Dengue and Chikungunya Fever among Viral Diseases in Outpatient Febrile Children in Kilosa District Hospital, Tanzania. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e3335.

- doi:10.1371/journal.pntd.0003335.
- [36] Carey DE& COR. DENGUE VIRUSES FROM FEBRILE Sum ary 1971:105–6.
- [37] WHO. Dengue. 2006.
- [38] World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. Spec Program Res Train Trop Dis 2009;x, 147.
doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
- [39] Wilder-Smith A, Macary P. Dengue: Challenges for policy makers and vaccine developers. *Curr Infect Dis Rep* 2014;16:1–8. doi:10.1007/s11908-014-0404-2.
- [40] Verdeal J, Filho RC, Vanzillotta C. Guidelines for the management of patients with severe forms of dengue. *Rev Bras Ter Intensiva* 2011;23:125–33.
- [41] Hadinegoro SRS. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health* 2012;32:33–8.
doi:10.1179/2046904712Z.00000000052.
- [42] WHO. Handbook for clinical management of dengue. 2012.
- [43] Kao C-L, King C-C, Chao D-Y, Wu H-L, Chang G-JJ. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. *J Microbiol Immunol Infect* 2005;38:5–16.
- [44] Rosen L. Disease exacerbation caused by sequential dengue infections: Myth or reality? *Rev Infect Dis* 1989;11:S840–2. doi:10.1093/clinids/11.Supplement_4.S840.
- [45] Whitehorn J, Farrar J. Dengue. *Br Med Bull* 2010;95:161–73.
doi:10.1093/bmb/ldq019.
- [46] Guzmán MG, Kourí G. Dengue : an update 2002;2:33–42.
- [47] Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med* 1970;42:311–28.
- [48] Khurram M, Qayyum W, Hassan SJ ul, Mumtaz S, Bushra HT, Umar M. Dengue hemorrhagic fever: Comparison of patients with primary and secondary infections. *J Infect Public Health* 2014;7:489–95. doi:10.1016/j.jiph.2014.05.005.
- [49] Wichmann O, Hongsiriwon S, Bowonwatanuwong C, Chotivanich K, Sukthana Y,

- Pukrittayakamee S. Risk factors and clinical features associated with severe dengue infection in adults and children during the 2001 epidemic in Chonburi, Thailand. *Trop Med Int Heal* 2004;9:1022–9. doi:10.1111/j.1365-3156.2004.01295.x.
- [50] McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes Infect* 2000;2:1041–50. doi:10.1016/S1286-4579(00)01258-2.
- [51] Serrano HP, Caballero MEV, Portuondo TMA. Dengue hemorrágico en dengue primario 2001;53:59–62.
- [52] Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clin Infect Dis* 2009;49:942–8. doi:10.1086/605496.
- [53] Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)* 1956;54:177–91. doi:10.1017/S0022172400044442.
- [54] Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 2007;88:2363–77. doi:10.1099/vir.0.82858-0.
- [55] Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D. Chikungunya Outbreaks — The Globalization of Vectorborne Diseases. *N Engl J Med* 2007;356:769–71. doi:10.1056/NEJMp078013.
- [56] Rezza G et al. Infection with chikungunya virus in Italy-an outbreak in a temperate region.pdf 2007;370.
- [57] Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *N Engl J Med* 2015;372:1231–9. doi:10.1056/NEJMra1406035.
- [58] Azevedo R do S da S, Oliveira CS, Vasconcelos PF da C. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica* 2015;49:1–6. doi:10.1590/S0034-8910.2015049006219.
- [59] MS. Febre de chikungunya: manejo clínico 2015:1–30.
- [60] Singh SS, Manimunda SP, Sugunan AP, Sahina, Vijayachari P. Four cases of acute flaccid paralysis associated with chikungunya virus infection. *Epidemiol Infect* 2008;136:1277–80. doi:10.1017/S0950268807009739.
- [61] Chusri S, Siripaitoon P, Hirunpat S, Silpapojakul K. Case reports of neuro-Chikungunya in southern Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2011;85:386–9.

doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0725.

- [62] Macnamara FN. Zika Virus: a Report on Three Cases of Human Infection During an Epidemic of Jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1954;48.
- [63] Boorman JPT, Porterfield JS. Transactions of the Royal Society of Transmission of Zika Virus By. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1956;50:238–42.
- [64] Worth CB, de MEILLON. Culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) recorded from the province of Mozambique (Portuguese East Africa) and their relationship to arthropod-borne viruses. *An Inst Med Trop (Lisb)* 1960;17:231–56.
- [65] Fagbami AH. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J Hyg (Lond)* 1979;83:213–9.
doi:10.1017/S0022172400025997.
- [66] Anielle Ferreira-de-Brito et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America Anielle. *Science* (80-) 2016;111:655–8. doi:10.1126/science.aaf5743.
- [67] Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, da Rosa AT, Haddock AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011;17:880–2. doi:10.3201/eid1705.101939.
- [68] Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 2015;21:359–61.
doi:10.3201/eid2102.141363.
- [69] Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* 2014;19:14–6.
doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761.
- [70] Paixão ES, Barreto F, Da Glória Teixeira M, Da Conceição N Costa M, Rodrigues LC. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: A systematic review. *Am J Public Health* 2016;106:606–12. doi:10.2105/AJPH.2016.303112.
- [71] Musso, D. & Gubler DJ. Zika Virus. *Nature* 2016;11:10–20. doi:10.1128/CMR.00072-15.Address.
- [72] Duffy et. al, M.P.H., Chen T-H, M.D. WTH, M.D., M.P.H. AMP, Ph.D., Jacob L.

- Kool, M.D. PD, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia — NEJM. *N Engl J Med* 2009;360(24), 2536-2543.
- [73] Hancock WT, Marfel M, Bel M. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1960. doi:10.3201/eid2011.141380.
- [74] Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015;21:doi: 10.3201/eid2110.150847. doi:10.3201/eid2110.150847.
- [75] Martin D a, Muth D a, Brown T, Alison J, Karabatsos N, Roehrig JT, et al. Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:1823–6.
- [76] Stoler J, al Dashti R, Anto F, Fobil JN, Awandare GA. Deconstructing “malaria”: West Africa as the next front for dengue fever surveillance and control. *Acta Trop* 2014;134:58–65. doi:10.1016/j.actatropica.2014.02.017.
- [77] Crump JA, Morrissey AB, Nicholson WL, Massung RF, Stoddard RA, Galloway RL, et al. Etiology of Severe Non-malaria Febrile Illness in Northern Tanzania: A Prospective Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002324.
- [78] Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* 2004;18:215–27. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x.
- [79] Consoli, Routraut AGB & Lourenço de Oliveira R, Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. 1994. doi:10.1590/S0102-311X1995000100027.
- [80] Ngoagouni C, Kamgang B, Nakouné E, Paupy C, Kazanji M. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases? *Parasit Vectors* 2015;8:191. doi:10.1186/s13071-015-0808-3.
- [81] Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BBB, et al. Recent introduction and rapid dissemination of chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in gabon, central africa. *Clin Infect Dis* 2012;55:45–53. doi:10.1093/cid/cis530.
- [82] Pagès F, Peyrefitte CN, Mve MT, Jarjaval F, Brisse S, Itean I, et al. *Aedes albopictus*

- mosquito: The main vector of the 2007 chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS One* 2009;4:2007–10. doi:10.1371/journal.pone.0004691.
- [83] Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souarès Y, Failloux AB, et al. Chikungunya virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2011;17:910–3. doi:10.3201/eid1705.101873.
- [84] Dick OB, San Martín JL, Montoya RH, Del Diego J, Zambrano B, Dayan GH. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* 2012;87:584–93. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0770.
- [85] Liu-Helmersson J, Quam M, Wilder-Smith A, Stenlund H, Ebi K, Massad E, et al. Climate Change and Aedes Vectors: 21st Century Projections for Dengue Transmission in Europe. *EBioMedicine* 2016;7:267–77. doi:10.1016/j.ebiom.2016.03.046.
- [86] Jupp PG, McIntosh BM. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc* 1990;6:415–20.
- [87] Fontenille D, Toto JC. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1066–7. doi:10.3201/eid0706.010631.
- [88] Savage HM, Ezike VI, Nwankwo a C, Spiegel R, Miller BR. First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *J Am Mosq Control Assoc* 1992;8:101–3.
- [89] Halstead SB. Successes and Failures in Dengue Control - Global Experience. *Dengue Bull* 2000;24:20–4.
- [90] Gubler DJ. Prevention and control of *Aedes aegypti*-borne diseases: Lesson learned from past successes and failures. *Asia-Pacific J Mol Biol Biotechnol* 2013;19:111–4.
- [91] Vineis P, Khan AE, Vlaanderen J, Vermeulen R. The impact of new research technologies on our understanding of environmental causes of disease: the concept of clinical vulnerability. *Environ Health* 2009;8:54. doi:10.1186/1476-069X-8-54.
- [92] Buss PM, Pellegrini Filho A. A Saúde e seus Determinantes Sociais. *PHYSIS Rev Saúde Coletiva* 2007;17:77–93. doi:10.1590/S0103-73312007000100006.

- [93] Batistella C. Abordagens Contemporâneas do Conceito de Saúde. O Territ E O Process Saúde-Doença 2007:265.
- [94] Lala A. ESTUDO DE BASE CONSELHO MUNICIPAL DA CIDADE DE QUELIMANE 2013.
- [95] INE. Projeções Anuais da População Total, Urbana e Rural, dos distritos da Cidade de Maputo, 2007 - 2040 2010;1:78.
- [96] Silva C. ARQUITETURA MODERNA NA ÁFRICA LUSÓFONA Quelimane e a obra de João Garizo do Carmo Arquitetura 2013.