

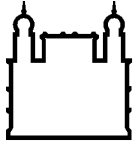
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

VIGILÂNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA NA ATUAL TRÍPLICE  
EPIDEMIA DE ARBOVÍRUS NO BRASIL: INVESTIGAÇÃO DE CASOS  
SUSPEITOS E GENOTIPAGEM DOS VÍRUS CIRCULANTES

**THIARA MANUELE ALVES DE SOUZA**

Rio de Janeiro  
Novembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***THIARA MANUELE ALVES DE SOUZA***

Vigilância do vírus Chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Ecologia e Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia Barreto dos Santos

**RIO DE JANEIRO**

Novembro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S729 Souza, Thiara Manuele Alves de

Vigilância do vírus Chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes / Thiara Manuele Alves de Souza. – Rio de Janeiro, 2016.

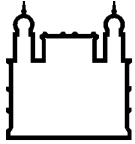
xxviii, 140 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 116-140

1. Arbovírus. 2. Vírus Chikungunya. 3. Diagnóstico sorológico. 4. Diagnóstico molecular. 5. Epidemiologia molecular. I. Título.

CDD 579.2562



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: THIARA MANUELE ALVES DE SOUZA**

Vigilância do vírus Chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia Barreto dos Santos**

**Aprovada em: 30/11/2016**

**EXAMINADORES:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Carvalho de Sequeira - Presidente (IOC/FIOCRUZ)**

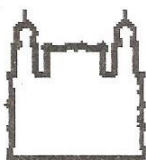
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Regina Sampaio Lemos (IOC/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco (UNIRIO/RJ)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro (IOC/FIOCRUZ)**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ronaldo Mohana Borges (UFRJ/RJ)**

Rio de Janeiro, 30 de Novembro de 2016.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Thiara Manuele Alves de Souza**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Flávia Barreto dos Santos. Ao trigésimo dia do mês de novembro de dois mil e dezesseis, realizou-se às treze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Vigilância do vírus chikungunya na atual tríplice epidemia de arbovírus no Brasil: investigação de casos suspeitos e genotipagem dos vírus circulantes**" no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Ecologia e Epidemiologia, na linha de pesquisa: Ecologia e Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Patrícia Carvalho de Sequeira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Elba Regina Sampaio de Lemos - IOC/FIOCRUZ, Dr. Paulo Vieira Damasco - UNIRIO/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro - IOC/FIOCRUZ e Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2016.

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Carvalho de Sequeira (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Elba Regina Sampaio de Lemos (Membro da Banca):

Dr. Paulo Vieira Damasco (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentoseac@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentoseac@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensinc](http://www.fiocruz.br/iocensinc)

Dedico esta dissertação ao meu Deus, minha inspiração e força. Aos meus pais Neide da Silva Alves de Souza e Manoel Ferreira de Souza, a quem eu dedico o meu eterno amor e dedicação. Aos familiares e amigos que sempre estarão guardados em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

O mestrado me trouxe grandes desafios desde o início. Consigo me lembrar perfeitamente dos dias e noites intermináveis de estudos em que a ansiedade e a vontade de fazer parte de uma pós-graduação dos meus sonhos dominavam todos os meus sentimentos e pensamentos. É difícil ganhar o mundo quando estamos distantes das nossas raízes, do lugar onde nascemos e pertencemos. Mas é neste momento que me lembro de três palavras essenciais para a minha jornada: resiliência, tenacidade e gratidão. A resiliência me ajudou a lidar com os problemas no meio do caminho e a não ceder à pressão diante de todos os que tentaram desafiar a minha capacidade. A tenacidade me trouxe persistência e resistência diante dos objetivos e adversidades. Por fim, a gratidão me permitiu o reconhecimento de grandes auxílios por parte de pessoas que se tornaram mais do que especiais em minha vida. Nada é possível quando estamos sozinhos. Precisamos de amigos e de pessoas do bem ao nosso lado.

Desta forma, agradeço a **Deus** em primeiro lugar, o dono de todos os meus sonhos e pensamentos. A força que reside em meu coração e o responsável pelas minhas vitórias e por todo aprendizado ao longo desta jornada.

À **Dr<sup>a</sup>. Flavia Barreto dos Santos**, minha eterna orientadora, por toda a paciência, sabedoria e amizade sincera que tornou a nossa convivência repleta de muita alegria, leveza, companheirismo e grandes conquistas.

À **Dr<sup>a</sup>. Rita Maria Ribeiro Nogueira**, pela oportunidade e confiança depositada no meu trabalho. Agradeço a todos os momentos ímpares de ensinamentos profissionais e pessoais que levarei pelo resto da minha vida.

À **Dr<sup>a</sup>. Ana Bispo de Filippis**, pela convivência diária, ensinamentos compartilhados e por todas as oportunidades pelas quais serei eternamente grata.

À **Fernanda de-Bruycker Nogueira (Doutoranda)**, pela linda amizade e ensinamentos desde a minha Iniciação Científica até todo o período do mestrado. Um grande ser humano que com certeza conquistará o mundo com a sua inteligência e dedicação.

À **Dr<sup>a</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo**, pela confiança, companheirismo, ensinamentos e muitas risadas que tornaram grande parte desta caminhada mais leve. Fico feliz por saber que ainda teremos grandes histórias para compartilhar!

Ao **Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha, Dr<sup>a</sup>. Márcia Dal Fabbro e Dr. Paulo Vieira Damasco**, exemplos de médicos e seres humanos, cheios de humildade, dedicação e disposição para compartilhar todos os seus conhecimentos.

À **Dr<sup>a</sup>. Luzia Pinto e à Dr<sup>a</sup>. Claire Kubelka**, pela convivência e por me concederem a oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa exemplar.

À **Dr<sup>a</sup>. Nieli Faria e Thaís Chouin (Doutoranda)**, presentes de Deus, que me conquistaram desde o primeiro dia pela sinceridade, atenção e humildade. Minhas eternas companheiras desta jornada.

À **Jéssica Badolato (Doutoranda) e Luciana Santos (Mestranda)**, que estiveram presentes em muitos momentos de trabalho árduo durante o mestrado. Tudo o que passamos juntas resultou em uma amizade consistente e eterna. Quando sinto tristeza ou alegria logo corro para perto de vocês. Não posso viver sem as nossas risadas, piadas internas e todas as besteiras que só nós três entendemos.

À **Msc. Edcelha D'Athaide Ribeiro**, amizade maravilhosa que conquistei durante esta jornada e que também levarei para sempre. Obrigada por todo o carinho e atenção, principalmente durante o difícil de trabalho de campo no Amapá.

À **Priscila Conrado e Manoela Heringer (Doutorandas) e Dr<sup>a</sup>. Monique Lima**, esse trio inseparável cheio de inteligência e vontade de crescer na vida. Nunca me esquecerei de todas as risadas, dicas e conversas intermináveis.

Aos grandes amigos do Laboratório de Imunologia Viral, **Dr. Juan Camilo, Dr<sup>a</sup>. Amanda Torrentes, Luciana Fialho, Iury Paiva e Márcio Cipitelli (Doutorandos)** que me tratam com tanto carinho e atenção. Sei que ainda teremos muitas histórias para contar!

Aos amigos inesquecíveis **Liliane Conteville (Doutoranda), Dinair Couto (Pesquisadora) e Allison Fabri (Mestrando)**, que mesmo distantes em alguns momentos, estão guardados dentro do meu coração. Tenho certeza que posso contar com vocês quando precisar, não só no meio profissional, mas também na vida.

Aos companheiros do Laboratório de Flavivírus, **Ana Lúcia Bastos, Leda Maria e José Faria (Técnicos), Dr. Marcos Mendonça, Dr<sup>a</sup>. Patrícia Sequeira, Solange Regina (Secretária), Simone Sampaio e Eliane Saraiva (Tecnologistas) e Cíntia Damasceno (Mestranda)** que de diversas formas fizeram parte desta jornada inesquecível.



Aos amigos do trabalho de campo realizado em Campo Grande (MS), **Dr<sup>a</sup>. Ana Rita Castro** (UFMS) pela estrutura laboratorial concedida durante as coletas, **Larissa Bandeira** (UFMS) e **Rita Benevides** (UFMS) pelo apoio técnico, além de **Marco Puga, Sabrina Torres, Grazielli Rezende, Adriana França, Izi Romanholi e Camila Montalbano** da UFMS, **Michel Sucupira** e **Karen Trinta** de Biomanguinhos/FIOCRUZ e toda a equipe da **UPA Coronel Antonino** (MS).

Aos amigos do trabalho de campo realizado no Amapá (AP), **Rose Mary** (LACEN-AP) pelo apoio técnico e companhia durante as coletas, **Samuel, Walmir Corrêa** (LAFRON-AP) pelas coletas realizadas em Oiapoque-AP e a toda a equipe do LACEN-AP.

Aos **pacientes e familiares**, que colaboraram de forma indispensável para a realização deste estudo, confiando no trabalho proposto, bem como nas suas importantes contribuições para a saúde pública brasileira.

Aos amigos do **Laboratório de Hantavírus e Rickettsioses (LHR)** chefiado pela **Dr<sup>a</sup>. Elba Lemos** e do **Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo (LVRS)** chefiado pela **Dr<sup>a</sup>. Marilda Siqueira** por permitirem o apoio e suporte técnico quando necessário.

À **Plataforma de Sequenciamento de DNA - PDTIS/FIOCRUZ**, pelo suporte técnico e eletroforese capilar das amostras utilizadas neste estudo. E ao técnico **Messias**, sempre disposto a oferecer o apoio necessário para a obtenção de materiais e soluções de confiança e qualidade para a realização dos experimentos.

À *melhor turma de mestrado do mundo!* Em especial aos meus queridos amigos **Melina Merlone, Stéphanie Campos, Agatha Rosa, Jéssica Raposo, Arthur Alves, Arthur Rasinhas, Camila Santos, Iasmim Mello, Larissa Vieira, Diana Rangel, Lana Chaves, Alessandra Araújo, Luciana Sousa, Beatriz Pavão, Taiza Braga, Leonardo Lara, Jéssica Lima, Monique Costa, Marcelle Cappato e Samyra Silveira.**

A todos os colegas do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira.

Aos meus pais, **Neide da Silva Alves de Souza** e **Manoel Ferreira de Souza**, que me inspiram todos os dias com tanto amor, carinho e atenção. Aqueles que dedicaram a própria vida para a minha criação e educação. Minha força, inspiração e a razão pela qual eu luto todos os dias para ser um ser humano melhor.

À **minha família e amigos**, que estiveram ao meu lado em diversos momentos e que de alguma forma tornaram esta caminhada mais leve.

A todos os membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

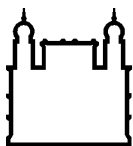
À *Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do IOC*, representada pela querida **Rita Gomes**, sempre disposta a auxiliar e oferecer uma palavra de carinho e atenção a todos que a procuram.

À *coordenação da Pós-Graduação em Biologia Parasitária do IOC/FIOCRUZ*, representada pelo **Dr. Rafael Freitas** e pelo **Dr. André Roque** e a toda comissão organizadora, em especial a **Dr<sup>a</sup>. Monick Guimarães**.

Ao Conselho **Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão da bolsa de estudo e ao **Ministério da Saúde, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)** pelo suporte financeiro e estrutural deste projeto.

“Você tem que ser o espelho da mudança que está propondo.  
Se eu quero mudar o mundo, tenho que começar por mim”.

***Mahatma Gandhi***



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

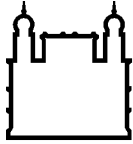
### VIGILÂNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA NA ATUAL TRÍPLICE EPIDEMIA DE ARBOVÍRUS NO BRASIL: INVESTIGAÇÃO DE CASOS SUSPEITOS E GENOTIPAGEM DOS VÍRUS CIRCULANTES

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Thiara Manuele Alves de Souza**

O vírus chikungunya (CHIKV) tem sido responsável por importantes epidemias emergentes e reemergentes de uma doença caracterizada por poliartralgia intensa e incapacitante em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo. No Brasil, os primeiros casos autóctones do genótipo Asiático deste vírus foram identificados em Oiapoque (AP) durante 2014 e neste mesmo período, o genótipo Leste-Centro-Sul Africano (ECSA) foi introduzido de forma independente em Feira de Santana (BA). Apesar da importância dos mosquitos *Ae. aegypti* na transmissão desta arbovirose, o vetor *Ae. albopictus* tem sido associado como um novo causador da doença devido a uma mutação E1-A226V que favoreceu a transmissão do CHIKV por esta espécie. Atualmente, o país vive uma tríplice epidemia de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) tornando o diagnóstico diferencial extremamente difícil para os profissionais de saúde. Desta forma, o presente estudo teve como principais objetivos investigar casos suspeitos de CHIKV e a possível ocorrência de co-infecções entre os três arbovírus circulantes, assim como realizar a genotipagem e caracterização molecular a partir do sequenciamento parcial da região E1 das cepas representativas de CHIKV provenientes de epidemias ocorridas no Amapá (AP) e Feira de Santana (BA) em 2014-2015 e em Campo Grande (MS) e Rio de Janeiro (RJ) durante 2016. No AP, os resultados demonstram que 107/208 (51.44%) dos casos avaliados foram confirmados para CHIKV, sendo 71.02% (76/107) da cidade de Oiapoque, 25.23% (27/107) de Macapá e 3.73% (4/107) de Porto Grande. Destes, foram observadas 24 co-infecções por CHIKV e DENV, 2 por CHIKV e DENV-1 e 2 por CHIKV e DENV-4. Na BA, 24/28 (85.71%) dos casos suspeitos foram confirmados para este vírus e destes, 12 co-infecções por CHIKV e DENV foram encontradas. No MS, 7/134 (5.22%) dos casos apresentaram apenas uma evidência sorológica desta infecção, indicando um quadro epidêmico em crescimento nesta região. Destes, foram observadas 1 co-infecção por CHIKV e DENV, 2 por CHIKV e DENV-1 e 1 por CHIKV, DENV-1 e ZIKV. No RJ, 70/91 (76.92%) dos casos foram confirmados para CHIKV, sendo estes prevalentes na Zona Sul da cidade (32.14%), com destaque para os bairros do Catete, Glória e Laranjeiras. Destes, foram observadas 8 co-infecções por CHIKV e DENV e 17 por CHIKV e ZIKV. Adicionalmente, os dados sugerem a predominância de infecção entre indivíduos do sexo feminino e maiores de 15 anos no AP e no RJ. No AP, o maior número de casos foi destacado para indivíduos entre 16 a 20 anos e 26 a 55 anos e no RJ, a maior frequência de casos confirmados foi para indivíduos entre 26 a 30 anos, seguido de 41 a 45 e 51 a 55 anos. Com relação às manifestações clínicas dos casos de CHIKV do AP, MS e RJ, houve predominância de febre, artralgia, mialgia, prostração, edema, exantema, hiperemia conjuntival, lombalgia, tontura, náusea, dor retro-orbitária e anorexia. Por fim, apesar de não ter sido observada nenhuma alteração de aminoácidos, foi demonstrado que todas as cepas de CHIKV do AP analisadas pertencem ao genótipo Asiático. No RJ, foi demonstrada pela primeira vez a circulação do ECSA nesta região e nenhuma mutação A226V foi observada. Apesar disso, foi revelada uma alteração E1-V156A em duas amostras e pela primeira vez na literatura a mutação E1-K211T em todas as amostras analisadas. Outros estudos serão necessários para esclarecer as consequências destas mudanças no *fitness* dos mosquitos e no sistema imunológico humano, sendo de fundamental importância o monitoramento dos casos suspeitos de CHIKV e da dispersão dos genótipos circulantes, além da identificação de possíveis mutações que facilitam a transmissão pelos mosquitos vetores, especialmente em regiões onde há um amplo território, alta densidade do vetor, presença de indivíduos suscetíveis e intenso movimento de turistas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### SURVEILLANCE OF CHIKUNGUNYA VIRUS IN THE CURRENT TRIPLE ARBOVIRUS EPIDEMIC IN BRAZIL: INVESTIGATION OF SUSPECTED CASES AND GENOTYPE OF CIRCULATING VIRUSES

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

**Thiara Manuele Alves de Souza**

The chikungunya virus (CHIKV) has been responsible for important emerging and reemerging epidemics of a disease characterized by intense and incapacitating polyarthralgia in several tropical and temperate regions of the world. In Brazil, the first autochthonous cases of the Asian genotype of this virus were identified in Oiapoque (AP) during 2014 and in this same period, the East-Central-South African (ECSA) genotype was independently introduced in Feira de Santana (BA). Despite the importance of *Ae. Aegypti* mosquitoes in the transmission of this arbovirus, *Ae. Albopictus* has been associated as a new vector for this disease due to an E1-A226V mutation that favored the transmission of CHIKV by this species. Currently, the country lives a triple arbovirus epidemic (DENV, ZIKV and CHIKV) making the differential diagnosis extremely difficult for health professionals. Thus, the main objective of the present study was to investigate CHIKV suspected cases and the possible occurrence of co-infections among the three circulating arboviruses, as well as perform the genotyping and molecular characterization from the partial sequencing of the E1 region of CHIKV representative strains from epidemics that have occurred in Amapá (AP) and Feira de Santana (BA) in 2014-2015 and in Campo Grande (MS) and Rio de Janeiro (RJ) during 2016. In AP, the results show that 107/208 (51.44%) of the evaluated cases were confirmed for CHIKV, being 71.02% (76/107) from the city of Oiapoque, 25.23% (27/107) from Macapá and 3.73% (4/107) from Porto Grande. Of these, 24 co-infections by CHIKV and DENV, 2 by CHIKV and DENV-1 and 2 by CHIKV and DENV-4 were observed. In BA, 24/28 (85.71%) of the suspected cases were confirmed for this virus and of these, 12 co-infections by CHIKV and DENV were found. In MS, 7/134 (5.22%) of the cases presented only serological evidence of this infection, indicating a growing epidemic in this region. Of these, 1 co-infection by CHIKV and DENV, 2 by CHIKV and DENV-1 and 1 by CHIKV, DENV-1 and ZIKV were observed. In Rio de Janeiro, 70/91 (76.92%) of the suspected cases were confirmed for CHIKV, being prevalent in the South zone of the city (32.14%), especially in the districts of Catete, Glória and Laranjeiras. Of these, 8 co-infections were observed by CHIKV and DENV and 17 by CHIKV and ZIKV. Additionally, the data suggest a predominance of infection among female subjects and those older than 15 years in the AP and RJ. In AP, the highest number of cases was reported for individuals aged 16 to 20 years and 26 to 55 years and in RJ, the highest frequency of confirmed cases was for individuals between 26 and 30 years, followed by 41 to 45 and 51 to 55 years. Concerning the clinical manifestations of CHIKV cases of AP, MS and RJ, fever, arthralgia, myalgia, prostration, edema, exanthema, conjunctival hyperemia, low back pain, dizziness, nausea, retroorbital pain and anorexia predominated. Finally, although no amino acid change was observed, it was shown that all the CHIKV strains analyzed from AP belong to the Asian genotype. In RJ, ECSA circulation was demonstrated for the first time in this region and no E1-A226V mutation was observed. Despite this, an E1-V156A alteration was revealed in two samples and for the first time in the literature the E1-K211T mutation was revealed in all analyzed samples. Other studies will be needed to clarify the consequences of these changes in mosquito fitness and in the human immune system, being of fundamental importance the monitoring of the CHIKV suspected cases and the dispersion of circulating genotypes, besides the identification of possible mutations that facilitate mosquito vectors transmission, especially in regions where there is a vast territory, high density of the vector, presence of susceptible individuals and intense movement of tourists.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>29</b>
<b>1.1 Histórico do CHIKV</b> .....	<b>31</b>
<b>1.2 Epidemiologia do CHIKV</b> .....	<b>34</b>
1.2.1 CHIKV nas Américas .....	34
1.2.2 CHIKV no Brasil .....	34
<b>1.3 Dinâmica de transmissão do CHIKV</b> .....	<b>36</b>
1.3.1 Vetores .....	36
1.3.2 Reservatórios .....	37
1.3.3 Período de Incubação .....	37
<b>1.4 Agente etiológico e organização genômica do CHIKV</b> .....	<b>38</b>
<b>1.5 Proteínas do CHIKV</b> .....	<b>40</b>
<b>1.6 Evolução e adaptação do CHIKV</b> .....	<b>41</b>
<b>1.7 Replicação do CHIKV</b> .....	<b>43</b>
<b>1.8 Patogênese do CHIKV</b> .....	<b>44</b>
<b>1.9 Resposta imune ao CHIKV</b> .....	<b>46</b>
<b>1.10 Manifestações clínicas das infecções por CHIKV</b> .....	<b>49</b>
1.10.1 Fase aguda .....	50
1.10.2 Fase subaguda e crônica .....	51
1.10.3 Manifestações atípicas .....	51
1.10.4 Grupos de risco .....	53
1.10.5 Infecção neonatal e transmissão mãe-filho .....	53
1.10.6 Óbito por CHIKV .....	54
1.10.7 Diagnóstico diferencial do CHIKV .....	54
<b>1.11 Diagnóstico laboratorial do CHIKV</b> .....	<b>55</b>
1.11.1 Isolamento viral .....	56
1.11.2 Métodos moleculares para detecção do CHIKV .....	57
1.11.3 Métodos sorológicos aplicados ao diagnóstico do CHIKV .....	57
<b>1.12 Tratamento</b> .....	<b>58</b>
<b>1.13 Prevenção e controle</b> .....	<b>59</b>
<b>1.14 Outros arbovírus de importância médica no Brasil</b> .....	<b>60</b>

1.15	Justificativa.....	62
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>64</b>
2.1	Objetivo Geral.....	64
2.2	Objetivos Específicos .....	64
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>65</b>
3.1	Aspectos éticos .....	65
3.2	Desenho de estudo .....	65
3.3	CrITÉrios de incluso e excluso para a investigao de casos suspeitos de CHIKV .....	65
3.4	Investigao de casos suspeitos de CHIKV no AP .....	66
3.5	Investigao de casos suspeitos de CHIKV na BA .....	67
3.6	Investigao de casos suspeitos de CHIKV no MS e no RJ.....	67
3.7	Determinao de anticorpos da classe IgM para CHIKV (MAC- ELISA).....	69
3.8	Determinao de anticorpos da classe IgM para DENV.....	70
3.9	Teste de captura do antgeno NS1 de DENV.....	70
3.10	Extrao do RNA viral.....	70
3.11	RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para deteco de CHIKV .....	70
3.12	RT-PCR para deteco e tipagem dos DENV .....	71
3.13	RT-PCR para deteco do ZIKV .....	73
3.14	RT-PCR para sequenciamento parcial (gene E1) do genoma do CHIKV .....	74
3.15	Purificao e quantificao dos produtos do RT-PCR para sequenciamento parcial (gene E1) do genoma do CHIKV .....	75
3.16	Reao de sequenciamento .....	75
3.17	Anlise das Sequncias e Filogenia.....	76
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
4.1	Investigao de casos suspeitos da infeco pelo CHIKV na regio Norte do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014-2015 no Amap (AP).....	77
4.1.1	Aspectos clnico-epidemiolgicos .....	78
4.1.2	Casos agudos.....	79
4.1.2.1	Testes laboratoriais realizados .....	79

4.1.2.2	Co-infecções.....	81
4.1.3	Casos convalescentes.....	82
4.1.3.1	Testes laboratoriais realizados.....	82
4.1.3.2	Co-infecções.....	83
<b>4.2</b>	<b>Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Nordeste do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014-2015 em Feira de Santana (BA).....</b>	<b>84</b>
4.2.1	Aspectos clínico-epidemiológicos.....	85
4.2.2	Testes laboratoriais realizados.....	85
4.2.3	Co-infecções.....	86
<b>4.3</b>	<b>Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Centro-Oeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade de Campo Grande (MS).....</b>	<b>87</b>
4.3.1	Critérios clínico-epidemiológicos.....	88
4.3.2	Testes laboratoriais realizados.....	90
4.3.3	Co-infecções.....	92
<b>4.4</b>	<b>Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Sudeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade do Rio de Janeiro (RJ).....</b>	<b>93</b>
4.4.1	Aspectos clínico-epidemiológicos.....	94
4.4.2	Testes laboratoriais realizados.....	97
4.4.3	Co-infecções.....	100
<b>4.5</b>	<b>Análise filogenética e caracterização molecular de cepas de CHIKV representativas do Amapá (AP) e Rio de Janeiro (RJ).....</b>	<b>101</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>115</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>116</b>
	<b>APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO</b>	<b>141</b>
	<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>146</b>



<b>APÊNDICE C -</b>	<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CNS 466/12)</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICE D -</b>	<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CAAE: 30757314.1.0000.5248)</b>	<b>148</b>
<b>APÊNDICE E -</b>	<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CAAE: 57221416.0.1001.5248)</b>	<b>152</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Países e territórios onde os casos de chikungunya foram reportados de forma autóctone até 22 de Abril de 2016 (CDC, 2016).....	<b>30</b>
<b>Figura 1.2:</b> Distribuição geográfica dos focos de infecção pelo CHIKV em regiões Africanas e Asiáticas. Cada país em que surtos da doença foram reportados está colorido de forma diferente: verde (surtos antigos) e azul ou vermelho para surtos antes ou depois de 2004 (Rougeron <i>et al.</i> , 2015).....	<b>33</b>
<b>Figura 1.3:</b> Casos notificados e confirmados da febre chikungunya por município de notificação até a Semana Epidemiológica 37 de 2016 (SVS/MS, 2016a).....	<b>35</b>
<b>Figura 1.4:</b> Ciclos silvestre e urbano de transmissão do CHIKV demonstrando os distintos vetores e hospedeiros vertebrados deste vírus (Powers, 2010).....	<b>37</b>
<b>Figura 1.5:</b> Períodos de incubação extrínseca e intrínseca para o CHIKV (Brasil/MS, 2014).....	<b>38</b>
<b>Figura 1.6:</b> Partícula viral do CHIKV (Fox <i>et al.</i> , 2015).....	<b>39</b>
<b>Figura 1.7:</b> Organização do genoma do CHIKV. 5'Cap: capacete do RNA na extremidade 5'; 6k: peptídeo sinal para E1; aa: aminoácidos; C: proteína do capsídeo ou <i>core</i> ; E1-E2: proteínas do envelope 1 e 2; nt: nucleotídeos; NTR: região não traduzida (do inglês: <i>untranslated region</i> ); nsP1-4: proteínas não estruturais 1-4; ORF: Fase de leitura aberta (do inglês: <i>open reading frame</i> ); E3: pequeno peptídeo do envelope; poli (A): cauda de poliadenilato na extremidade 3' (Thiberville <i>et al.</i> , 2013).....	<b>39</b>
<b>Figura 1.8:</b> Ciclo de replicação do CHIKV (Adaptado Lum & Ng, 2015).....	<b>44</b>
<b>Figura 1.9:</b> Patogênese da infecção por CHIKV (Adaptado de Lum & Ng, 2015).....	<b>45</b>
<b>Figura 1.10:</b> Resposta imune ao CHIKV (Adaptado de Schwartz & Albert <i>et al.</i> , 2010).....	<b>46</b>
<b>Figura 1.11:</b> Imunopatologia do CHIKV (Petitdemange <i>et al.</i> , 2015).....	<b>49</b>
<b>Figura 1.12:</b> Edemas bilaterais nas mãos e pés de um paciente com infecção aguda pelo CHIKV. (A) Edema nas mãos e pulsos; (B) Edema nos pés e tornozelos (Tappe <i>et al.</i> , 2010).....	<b>50</b>
<b>Figura 1.13:</b> Perfil diferencial das manifestações clínicas causadas a partir de infecções pelos arbovírus dengue, zika ou chikungunya (SESAB, 2016).....	<b>55</b>
<b>Figura 4.1:</b> Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=208$ ) selecionados para a investigação desta infecção na região Norte do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 no estado do Amapá (AP).....	<b>77</b>

<b>Figura 4.2:</b> Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=28$ ) recebidos por demanda espontânea no LABFLA (IOC/FIOCRUZ) a partir de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 na cidade de Feira de Santana (BA), região Nordeste do Brasil.....	<b>84</b>
<b>Figura 4.3:</b> Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=134$ ) a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade de Campo Grande (MS), região Centro-Oeste do Brasil.....	<b>88</b>
<b>Figura 4.4:</b> Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=91$ ) selecionados para a investigação desta infecção na região Sudeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade do Rio de Janeiro (RJ).....	<b>94</b>
<b>Figura 4.5:</b> Percentual de co-infecções ( $n=29$ ) entre CHIKV e DENV ( $n=8$ ), CHIKV e ZIKV ( $n=17$ ) e DENV e ZIKV ( $n=4$ ) provenientes da tríplice epidemia ocorrida na cidade do Rio de Janeiro (RJ) em 2016.....	<b>100</b>
<b>Figura 4.6:</b> Análise filogenética baseada em 372 nucleotídeos recuperados do gene E1 de linhagens de CHIKV identificadas no Rio de Janeiro ( $n=10$ ) durante 2016 e no Amapá ( $n=17$ ). Método <i>Neighbor-Joining</i> , modelo <i>Kimura-2</i> -parâmetros (K2), <i>bootstrap</i> de 1.000 repetições. As sequências de CHIKV analisadas estão representadas com um círculo preto. As estirpes de CHIKV foram designadas da seguinte forma: Número de acesso do GenBank (ou nome da cepa /país/ano). ECSA: genótipo Leste-Centro-Sul Africano.....	<b>102</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Características geográficas e populacionais dos municípios selecionados para a investigação de casos suspeitos de CHIKV nos estados do Amapá (AP), Bahia (BA), Mato Grosso do Sul (MS) e Rio de Janeiro (RJ).....	<b>65</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Frequência dos casos confirmados de chikungunya ( $n=94$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes no estado do Amapá (AP).....	<b>78</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Frequência de manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de chikungunya ( $n=87$ ) no Amapá (AP).....	<b>79</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=53$ ) de acordo com as diferentes metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico laboratorial deste vírus.....	<b>79</b>
<b>Tabela 4.4:</b> Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=53$ ) confirmados por apenas 1 ( $n=22$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=31$ ) das metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>80</b>
<b>Tabela 4.5:</b> Distribuição dos casos agudos confirmados para DENV ( $n=13$ ) apenas por sorologia ( $n=3$ ), apenas por técnicas moleculares ( $n=8$ ) ou simultaneamente por metodologias moleculares e sorológicas ( $n=2$ ).....	<b>81</b>
<b>Tabela 4.6:</b> Distribuição das co-infecções por CHIKV e DENV ( $n=4$ ) confirmadas por 2 ( $n=1$ ), 3 ( $n=2$ ) ou 4 ( $n=1$ ) das metodologias utilizadas para o diagnóstico destes arbovírus.....	<b>82</b>
<b>Tabela 4.7:</b> Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=52$ ) reagentes por apenas 1 ( $n=43$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=9$ ) das metodologias sorológicas de detecção de IgM anti-CHIKV utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>82</b>
<b>Tabela 4.8:</b> Distribuição dos casos convalescentes reagentes para DENV ( $n=44$ ) apenas por 1 ( $n=35$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=9$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>83</b>
<b>Tabela 4.9:</b> Distribuição das co-infecções por CHIKV e DENV ( $n=24$ ) reagentes por 2 ( $n=15$ ), 3 ( $n=6$ ) ou 4 ( $n=3$ ) das metodologias utilizadas o diagnóstico destes arbovírus.....	<b>83</b>
<b>Tabela 4.10:</b> Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=24$ ) de acordo com as diferentes metodologias sorológicas e moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>85</b>

<b>Tabela 4.11:</b> Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=24$ ) confirmados por 1 ( $n=9$ ), 2 ( $n=11$ ) ou 3 ( $n=4$ ) das metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>85</b>
<b>Tabela 4.12:</b> Distribuição dos casos de DENV ( $n=14$ ) reagentes por apenas 1 ( $n=13$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=1$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>86</b>
<b>Tabela 4.13:</b> Diagnóstico laboratorial diferencial para investigação dos casos de co-infecções pelos arbovírus DENV e CHIKV coletados durante a epidemia ocorrida em Feira de Santana, BA, 2015.....	<b>87</b>
<b>Tabela 4.14:</b> Frequência de casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes na cidade de Campo Grande (MS).....	<b>89</b>
<b>Tabela 4.15:</b> Frequência das manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) na cidade de Campo Grande (MS).....	<b>89</b>
<b>Tabela 4.16:</b> Distribuição dos casos de DENV ( $n=99$ ) confirmados por 1 ( $n=37$ ), 2 ( $n=40$ ), 3 ( $n=13$ ), 4 ( $n=7$ ) ou 5 ( $n=2$ ) das metodologias moleculares e/ou sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>90</b>
<b>Tabela 4.17:</b> Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) por apenas 1 ( $n=3$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=4$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico.....	<b>91</b>
<b>Tabela 4.18:</b> Diagnóstico laboratorial diferencial para investigação dos casos de co-infecções ( $n=33$ ) pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados durante a tríplice epidemia em Campo Grande, MS, 2016.....	<b>92</b>
<b>Tabela 4.19:</b> Distribuição dos casos confirmados da infecção pelo CHIKV ( $n=56$ ) de acordo com o bairro na cidade do Rio de Janeiro (RJ).....	<b>95</b>
<b>Tabela 4.20:</b> Frequência de casos confirmados de CHIKV ( $n=56$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes na cidade do Rio de Janeiro (RJ).....	<b>96</b>
<b>Tabela 4.21:</b> Frequência das manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de CHIKV ( $n=56$ ) na cidade do Rio de Janeiro (RJ).....	<b>97</b>
<b>Tabela 4.22:</b> Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=70$ ) de acordo com as diferentes metodologias utilizadas para o diagnóstico laboratorial.....	<b>98</b>
<b>Tabela 4.23:</b> Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=70$ ) por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus.....	<b>98</b>

<b>Tabela 4.24:</b> Distribuição dos casos de DENV ( $n=17$ ) confirmados por 1 ( $n=15$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=2$ ) das metodologias moleculares e/ou sorológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial.....	<b>99</b>
<b>Tabela 4.25:</b> Diagnóstico laboratorial diferencial para a investigação dos casos de co-infecções ( $n=29$ ) pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados durante a tríplice epidemia no Rio de Janeiro, RJ, 2016.....	<b>100</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 3.1:</b> Estratégias/metodologias utilizadas para a investigação de casos suspeitos de CHIKV provenientes do AP.....	<b>66</b>
<b>Quadro 3.2:</b> Estratégias e metodologias utilizadas para a investigação de casos agudos suspeitos de CHIKV provenientes da BA.....	<b>67</b>
<b>Quadro 3.3:</b> Estratégias/metodologias utilizadas para a investigação de casos suspeitos de CHIKV provenientes do MS e do RJ.....	<b>68</b>
<b>Quadro 3.4:</b> Oligonucleotídeos utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> 2007).....	<b>71</b>
<b>Quadro 3.5:</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992).....	<b>71</b>
<b>Quadro 3.6:</b> Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a detecção e tipagem dos DENV (Johnson <i>et al.</i> , 2005).....	<b>73</b>
<b>Quadro 3.7:</b> Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a detecção do ZIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2008).....	<b>74</b>
<b>Quadro 3.8:</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a detecção do CHIKV (Collao <i>et al.</i> , 2010).....	<b>74</b>
<b>Quadro 3.9:</b> Sequências disponíveis no GenBank utilizadas como referência para os diferentes genótipos do CHIKV (Asiático, ECSA e Oeste Africano).....	<b>76</b>
<b>Quadro 4.1:</b> Substituições de aminoácidos* nas cepas de CHIKV provenientes de uma epidemia ocorrida no Rio de Janeiro (RJ) em 2016 com base na análise parcial do gene do envelope (E1) e comparação com cepas de referência obtidas no Genbank.....	<b>103</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	sinal de porcentagem
>	maior que
≤	menor ou igual a
≥	maior ou igual a
μl	microlitro
6k	peptídeo sinal para E1
Aa	aminoácido
AC	Acre
ADE	<i>enhancement</i> dependente de anticorpos
Ae.	<i>Aedes</i>
AL	Alagoas
AM	Amazonas
AMV-RT	Transcriptase Reversa do Vírus da Mieloblastose Aviária (do inglês: <i>Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase</i> )
AP	Amapá
BA	Bahia
BHK-21	células de rim de hamster recém-nascido (do Inglês: <i>baby hamster kidney cell</i> )
BSL-3	Laboratório de Biossegurança Nível 3
C	proteína do capsídeo ou <i>core</i>
C6/36	célula de mosquito <i>Ae. Albopictus</i> clone 6 passagem 36
Cap	capacete do RNA na região 5'
CARDIF	<i>CARD</i> contendo proteína que interage com RIG-I (do inglês: <i>CARD - containing adaptor protein that interacts with RIG-I</i> )
CD69	Grupamento de diferenciação 69 (do inglês: <i>Cluster of Differentiation 69</i> )
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças (do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
cDNA	DNA complementar
CE	Ceará
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKV	Vírus chikungunya
CLR	receptor de Lectina tipo C
C-terminal	carboxi-terminal



D1	iniciador <i>sense</i> D1
D2	iniciador <i>anti-sense</i> D2
DCIR	imunoreceptor de células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cell immunoreceptor</i> )
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
DF	Distrito Federal
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dr.	doutor
Dr <sup>a</sup> .	doutora
DTT	ditiotreitól (do inglês: <i>dithiothreitol</i> )
E1	proteína do envelope 1
E2	proteína do envelope 2
E3	pequeno peptídeo do envelope
ECP	efeito citopático
ECSA	Leste-Centro-Sul Africano (do inglês: <i>East-Central-South African</i> )
ELISA	Ensaio imunoenzimático indireto
ES	Espírito Santo
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (do Inglês: <i>Fibroblast growth factors</i> )
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulócitos-Macrófagos (do Inglês: <i>Granulocyte - Macrophage Colony-Stimulating factor</i> )
GO	Goiás
H <sub>2</sub> O	água
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida (do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i> )
HRL	Hospital Rio Laranjeiras
IFI	imunofluorescência indireta
IFN- $\alpha$	interferon alfa

IFN- $\beta$	interferon beta
IgG	imunoglobulina da classe G
IgG3	isotipo 3 da imunoglobulina da classe G
IgM	imunoglobulina da classe M
IgM anti-CHIKV	ensaio imunoenzimático de captura do anticorpo IgM anti-CHIKV (do Inglês: <i>IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
IL-10	interleucina 10 (do inglês: <i>interleukin-2</i> )
IL-12	interleucina 12 (do inglês: <i>interleukin-12</i> )
IL-13	interleucina 13 (do inglês: <i>interleukin-13</i> )
IL-15	interleucina 15 (do inglês: <i>interleukin-15</i> )
IL-17	interleucina 17 (do inglês: <i>interleukin-17</i> )
IL-18	interleucina 18 (do inglês: <i>interleukin-18</i> )
IL-1RA	Receptor antagonista da interleucina 1 (do inglês: <i>interleukin-1 receptor antagonist</i> )
IL-2	interleucina 2 (do inglês: <i>interleukin-2</i> )
IL-2R	receptor de interleucina 2 (do inglês: <i>Interleukin-2 receptor</i> )
IL-2RA	receptor de cadeia alfa da interleucina 2 (do inglês: <i>interleukin-2 receptor alpha chain</i> )
IL-4	interleucina 4 (do inglês: <i>interleukin-4</i> )
IL-6	interleucina 6 (do inglês: <i>interleukin-6</i> )
IL-7	interleucina 7 (do inglês: <i>interleukin-7</i> )
IL-8	interleucina 8 (do inglês: <i>interleukin-8</i> )
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IOL	linhagem do Oceano Índico (do inglês: <i>Indian Ocean lineage</i> )
IP-10	proteína 10 induzida por interferon gama (do inglês: <i>interferon gamma-induced protein 10</i> )
kb	quilobases
KDa	quilodaltons
LABFLA	Laboratório de Flavivírus
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAMP	amplificação isotérmica mediada por <i>Loop</i> (do inglês: <i>Loop mediated isothermal amplification</i> )
LCR	líquido cefalorraquidiano
MA	Maranhão

MAC-ELISA	ensaio imunoenzimático de captura do anticorpo M (do Inglês: <i>IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
MAVS	Proteína de sinalização mitocondrial antiviral (do inglês: <i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i> )
MAVS	proteína mitocondrial de sinalização antiviral (do inglês: <i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i> )
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos-1 (do inglês: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MG	Minas Gerais
MIG	monoquina induzida por interferon gama 1 (do inglês: <i>Monokine induced by gamma interferon</i> )
Min	minutos
MIP-1 $\alpha$	proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (do inglês: <i>macrophage inflammatory protein 1-alpha</i> )
MIP-1 $\beta$	proteína inflamatória de macrófago 1 beta (do inglês: <i>macrophage inflammatory protein 1-beta</i> )
mRNA	RNA mensageiro
MS	Mato Grosso do Sul
MS	Ministério da Saúde
MT	Mato Grosso
n	tamanho amostral
NK	Célula matadora natural (do Inglês: <i>Natural killer</i> )
nm	Nanômetros
N <sup>o</sup>	número
NS1	proteína não-estrutural 1
NSP1	proteína não-estrutural 1
nsP123	poliproteína não-estrutural 1-3
NSP2	proteína não-estrutural 2
NSP3	proteína não-estrutural 3
NSP4	proteína não-estrutural 4
Nt	nucleotídeo
NTR	região não traduzida (do inglês: <i>untranslated region</i> )
°C	Grau Célsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONNV	Vírus o'nyong-nyong

OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OPG	osteoprotegerina
ORF	fase de leitura aberta (do inglês: <i>open reading frame</i> )
PA	Pará
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
PB	Paraíba
Pb	pares de base
PBS	tampão fosfato-salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDTIS	Plataforma de Sequenciamento de DNA
PE	Pernambuco
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	Piauí
Poli-A	cauda de poliadenilato
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placa
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões (do inglês: <i>pattern recognition receptors</i> )
qRT-PCR	transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RANKL	receptor ativador do fator nuclear kappa B (do inglês: <i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i> )
RIG-I	gene I induzível de ácido retinóico (do inglês: <i>retinoic acid-inducible gene-1</i> )
RJ	Rio de Janeiro
RLRs	Receptores semelhantes à RIG (do inglês: <i>RIG-I-like receptors</i> )
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido ribonucléico
RO	Rondônia
RR	Roraima
RT-PCR	transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
SE	Sergipe
Sec	segundos
SP	São Paulo

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T CD4+	Linfócito T auxiliar
T CD8+	Linfócito T citotóxico
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (do inglês: <i>T helper 1</i> )
Th17	Linfócito T auxiliar 17 (do inglês: <i>T helper 17</i> )
Th2	Linfócito T auxiliar 2 (do inglês: <i>T helper 2</i> )
TLR3	receptor <i>toll-like 3</i> (do inglês: <i>toll-like receptor 3</i> )
TLR7	receptor <i>toll-like 7</i> (do inglês: <i>toll-like receptor 7</i> )
TLR8	receptor <i>toll-like 8</i> (do inglês: <i>toll-like receptor 8</i> )
TLRs	receptores <i>toll-like</i> (do inglês: <i>toll-like receptors</i> )
TM	marca registrada (do inglês: <i>trade mark</i> )
TMB	3',3',5',5'-tetrametilbenzidina (do inglês: 3',3',5',5'- <i>tetramethylbenzidine</i> )
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral - alfa (do inglês: <i>tumor necrosis factor - alpha</i> )
TO	Tocantins
Tregs	células T reguladoras (do inglês: <i>regulatory T cells</i> )
TS1	iniciador tipo-específico para DENV-1
TS2	iniciador tipo-específico para DENV-2
TS3	iniciador tipo-específico para DENV-3
TS4	iniciador tipo-específico para DENV-4
U.V.	Luz ultravioleta
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
UTR	Regiões não traduzidas (do Inglês: <i>Untranslated regions</i> )
Vero	célula de rim de macaco verde Africano (do Inglês: <i>kidney epithelial cells extracted from an African green monkey</i> )
VLPs	partículas semelhantes a vírus
ZIKV	Vírus zika

# 1 INTRODUÇÃO

A tríplice epidemia causada pela presença concomitante dos vírus dengue (DENV), vírus chikungunya (CHIKV) e mais recentemente o vírus zika (ZIKV) representa um grave problema de saúde pública para o Brasil, que apresenta condições ideais para a dispersão destes patógenos devido às suas dimensões continentais. Além disso, a circulação simultânea destes três arbovírus compromete a eficiência do diagnóstico clínico e laboratorial para os profissionais da saúde devido à sobreposição dos sinais clínicos e indisponibilidade de testes confiáveis para o diagnóstico diferencial (Brasil *et al.*, 2016).

O DENV é considerado o causador da doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida (WHO, 2013b) e, nos últimos 50 anos, afetou mais de 100 países em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Akiner *et al.*, 2016). No Brasil, foram registrados 1.399.480 casos suspeitos de infecção por este vírus até 2016 (SVS/MS, 2016a), sendo o Rio de Janeiro destacado como a porta de entrada e dispersão para a maioria dos sorotipos (SVS/MS, 2014b).

O ZIKV, por sua vez, se tornou um destaque em todo o mundo após a sua emergência no Pacífico e mais recentemente nas Américas (Akiner *et al.*, 2016). Em 2015 foi identificado pela primeira vez no Brasil e até 2016 registrou 174.003 casos suspeitos (SVS/MS, 2016a). Este vírus é responsável por surtos de uma doença branda, porém perigosa durante a gestação, devido à sua associação com doenças neurológicas e anomalias congênitas (Brasil *et al.*, 2016).

Dando destaque ao CHIKV, este é um arbovírus causador da Febre Chikungunya, uma doença febril aguda caracterizada por grave e debilitante artralgia (Simon *et al.*, 2007). Pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus* (Griffin, 2007), sendo o genoma viral composto por uma fita simples de RNA polaridade positiva com aproximadamente 12 kb, que codifica quatro proteínas não estruturais (NSP1-4) e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) (Strauss & Strauss, 1994, Khan *et al.*, 2002).

O homem é o único hospedeiro capaz de desenvolver as formas clínicas da infecção pelo CHIKV (Powers & Logue, 2007), sendo este mantido na natureza por um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* (*Ae.*) (Gilotra & Shah, 1967, Diallo *et al.*, 1999). Os mosquitos da espécie *Ae. aegypti* são responsáveis pela transmissão desta arbovirose. Entretanto, o vetor *Ae. albopictus* tem sido repetidamente associado



## 1.1 Histórico do CHIKV

Apesar de erroneamente documentados como surtos de dengue, os primeiros relatos de uma doença epidêmica aguda assemelhando-se ao quadro clínico da infecção pelo CHIKV foram registrados na década de 1970 (Carey, 1971). Antes disso, inúmeros casos de febre, exantema e artralgia também eram observados na Índia em 1824 (Kucharz & Cebula-Byrska, 2012).

No entanto, a doença foi descrita pela primeira vez apenas em 1952 nas Planícies Makonde, ao longo das fronteiras entre Tanzânia e Moçambique (África Oriental). A denominação Chikungunya provém da língua *Makonde* do povo Bantu e significa “*Aquele que se curva*”, relacionando-se à postura curvada do paciente devido à poliartralgia intensa e incapacitante (Lumsden, 1955, Robinson, 1955).

Em 1953, uma epidemia que ocorreu em Newala (distrito da Tanzânia) permitiu pela primeira vez o isolamento do vírus a partir do soro de um paciente febril e esclareceu também algumas questões relacionadas à patogenia viral (Ross, 1956).

A partir da sua descoberta, o CHIKV foi responsável por surtos emergentes e reemergentes em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo (Brasil/MS, 2014, Lo Presti *et al.*, 2014). Entre 1960 e 1990, relatos foram constantemente registrados na África Central e do Sul (Sudão, Uganda, República Democrática do Congo, República Centro-Africana, Malawi, Zimbábue, Quênia e África do Sul) e na África Ocidental (Senegal, Benin, República da Guiné, Costa do Marfim e Nigéria), sendo muitos desses surtos relatados em pequenas comunidades rurais destas regiões (Powers & Logue, 2007, Brasil/MS, 2014).

No Sudeste Asiático, foram relatados casos na Índia, Malásia, Indonésia, Camboja, Vietnã, Mianmar, Paquistão e Tailândia durante o período de 1958 até 2003. Neste contexto, destacam-se como importantes os surtos urbanos ocorridos em Bangkok (Tailândia) no ano de 1958, que foi considerada uma região de transmissão ativa da doença (Hammon *et al.*, 1960, Lam *et al.*, 2001, Pongsiri *et al.*, 2010, Lo Presti *et al.*, 2014), além de Barshi, Calcutá e Vellore (Índia) durante as décadas de 60 e 70 (Shah *et al.*, 1964, Brasil/MS, 2014).

Os 30 anos que seguiram resultaram em poucos relatos de epidemias deste vírus, que se manteve restrito apenas em algumas regiões tropicais do mundo (Brasil/MS, 2014, Roques *et al.*, 2015). Somente em 2004-2005, o CHIKV reemergiu no leste da África e se espalhou pelo Oceano Índico e sudeste da Ásia, causando



milhões de casos da doença até 2010. Este surto se originou na costa do Quênia e foi primeiramente identificado na ilha de Lamu. Posteriormente, se espalhou pelas Ilhas Comores, Ilha da Reunião, Mayotte, Maurícias, Seychelles e Madagascar. Desde então, o vírus atingiu muitas outras regiões entre 2006-2010, tais como Ilhas de Andaman e Nicobar, Sri Lanka, Ilhas Maldivas, Cingapura, Malásia e Indonésia (Paquet *et al.*, 2006, Schuffenecker *et al.*, 2006, Renault *et al.*, 2012).

É importante observar que a epidemia ocorrida em 2005-2006 na Ilha da Reunião revelou o mosquito *Ae. albopictus* como um potencial vetor para o CHIKV em áreas urbanas tropicais e temperadas do mundo. Este fato se deve ao aparecimento de uma mutação A226V no gene E1 que promove uma melhoria da transmissão do vírus pelo mosquito (Thiboutot *et al.*, 2010).

Casos importados têm sido constantemente relatados principalmente em países americanos e europeus. Isto se deve aos viajantes virêmicos advindos da África, Índia e ilhas do Oceano Índico, tais como Ilha da Reunião, Maurícias, Seychelles e Madagascar. Durante 2006-2011 muitos casos importados foram reportados em diversas regiões do mundo, tais como na Europa (Alemanha, Bélgica, Espanha, França, Itália, Noruega, Suíça, Reino Unido, República Tcheca e Ucrânia), na América do Norte (Canadá, Estados Unidos e Guadalupe), no Caribe (Martinica), na América do Sul (Brasil e Guiana Francesa), Oceania (Austrália e Nova Caledônia) e Ásia (Hong Kong, Japão, Singapura, Sri Lanka e Taiwan) (Thiboutot *et al.*, 2010). A Figura 1.2 destaca alguns surtos importantes de CHIKV em países africanos e asiáticos que permitiram a introdução de casos importados desta infecção em novos países (Rougeron *et al.*, 2015).

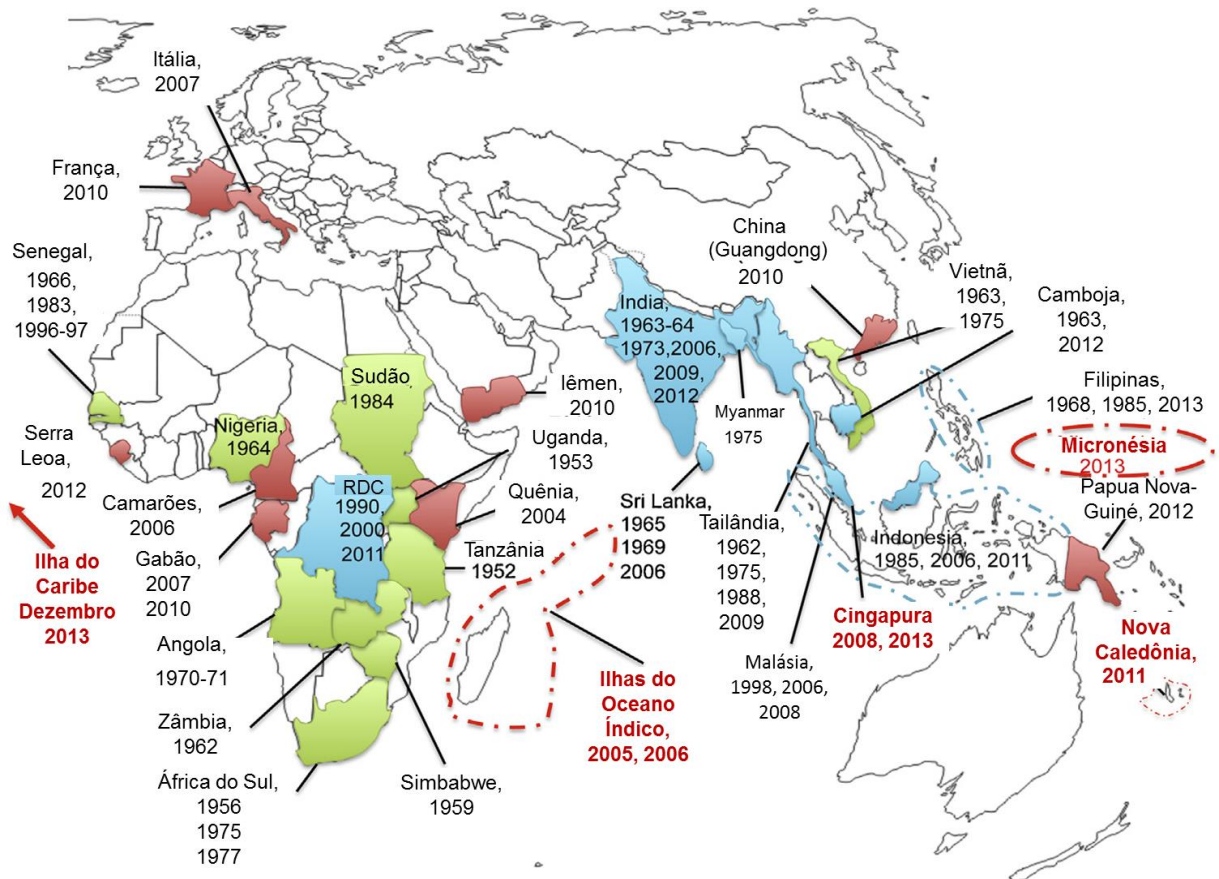
Em 2006, mais de 1,25 milhões de casos de CHIKV foram relatados em 151 distritos de 8 estados indianos (Andhra Pradesh, Andaman e Nicobar, Tamil Nadu, Karnataka, Maharashtra, Gujarat, Madhya Pradesh, Kerala e Delhi) (WHO, 2006b).

Com relação aos registros de transmissão autóctone, estimativas indicam a ocorrência de 204.000 casos da doença na Ilha da Reunião durante do período de Março de 2005 a Fevereiro de 2006. Neste mesmo período foram relatados 6000 casos suspeitos nas ilhas Maurícias, 2.833 casos em Mayotte e 8.818 em Seychelles, resultando em diversos casos importados na Alemanha, Itália, Noruega e Suíça. (WHO, 2006c, WHO, 2006a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reporta alguns registros importantes de transmissão autóctone do CHIKV na Ilha de San Martin (Caribe) no ano de 2013 (WHO, 2013a), em Montpellier (França) em 2014 onde foram registrados 4 casos

(WHO, 2014), na Papua-Nova Guiné em 2012, em 2013 na Nova Caledônia e estado de Yap na Micronésia (Roth *et al.*, 2014) e em 2015 no Kédougou (Senegal) (WHO, 2015c). Durante 2014 também havia sido registrado 1 caso suspeito em Gandia (Espanha) proveniente de um indivíduo sem histórico de viagem para áreas endêmicas do vírus, porém este foi negado após a confirmação de uma infecção por parvovírus B19 (WHO, 2015a, WHO, 2015b).

Em 2016, a OMS reportou 1.030 casos suspeitos de CHIKV na Argentina e estes foram identificados na província de Salta, especialmente das cidades de Tartagal e Apolinario Saravia, além da cidade de San Pedro na província de Jujuy (WHO, 2016a). Nos Estados Unidos, o primeiro caso autóctone de CHIKV foi confirmado no estado do Texas (WHO, 2016c). Neste mesmo ano foram notificados 1.792 casos suspeitos no Mandera (Quênia) e na Somália (WHO, 2016b).



**Figura 1.2:** Distribuição geográfica dos focos de infecção pelo CHIKV em regiões Africanas e Asiáticas. Cada país em que surtos da doença foram reportados está colorido de forma diferente: verde (surtos antigos) e azul ou vermelho para surtos antes ou depois de 2004 (Rougeron *et al.*, 2015).

## **1.2 Epidemiologia do CHIKV**

### **1.2.1 CHIKV nas Américas**

Desde 2010, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) tem se atentado e desenvolvido planos de contenção para uma possível introdução do CHIKV nas Américas (PAHO, 2011). Apesar disso, somente em 2013 foi reportada a primeira transmissão autóctone deste vírus nesta região através da confirmação de dois casos autóctones em San Martin, no Caribe (PAHO, 2013). A partir de então, muitos relatos de transmissão autóctone surgiram em 44 países do Caribe, costa Norte da América do Sul, América Central, Estados Unidos, México, Brasil e países da região Andina. Até 2015, o vírus já havia sido detectado no Paraguai e no leste da Bolívia (PAHO, 2015).

Em 2016, 319.379 casos suspeitos de transmissão autóctone de CHIKV nas Américas foram reportados até a semana epidemiológica 46, sendo 121.699 confirmados por critérios clínicos e/ou epidemiológicos. Os maiores índices desta doença foram registrados em San Martin ( $n=17$ ), Guadalupe ( $n=32$ ), Republica Dominicana ( $n=112$ ), Peru ( $n=116$ ), Equador ( $n=280$ ), Guiana Francesa ( $n=805$ ), Paraguai ( $n=873$ ), Venezuela ( $n=3.107$ ), Costa Rica ( $n=3.215$ ), Argentina ( $n=3.394$ ), Nicarágua ( $n=4.675$ ), Guatemala ( $n=4.859$ ), El Salvador ( $n=5.950$ ), Honduras ( $n=14.325$ ), Colômbia ( $n=19.092$ ), Bolívia ( $n=19.583$ ) e Brasil ( $n=236.287$ ) (PAHO, 2016a).

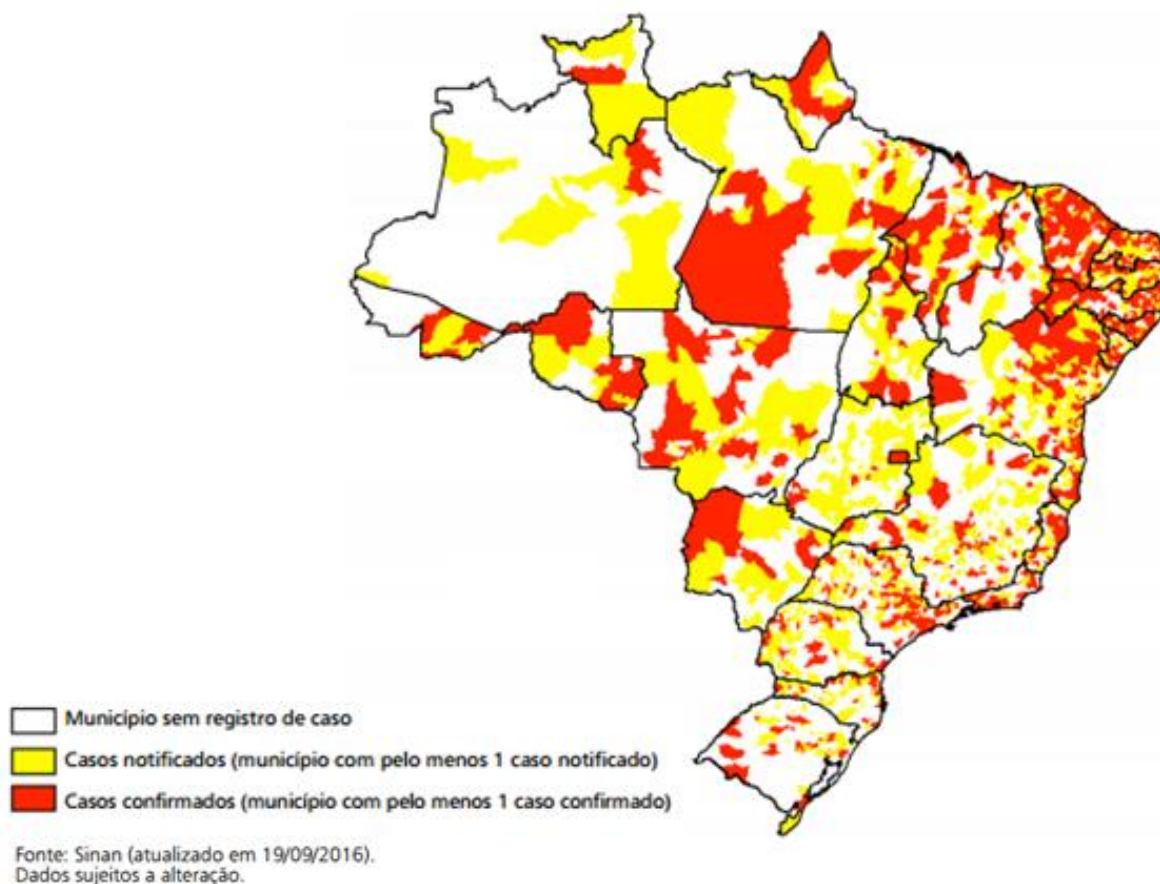
### **1.2.2 CHIKV no Brasil**

No Brasil, casos importados de CHIKV têm sido reportados pelo Ministério da Saúde desde 2010 (Figueiredo & Figueiredo, 2014). Até a semana epidemiológica 53 de 2014, foram notificados 93 casos importados suspeitos de CHIKV em 15 estados do país, sendo 36 destes confirmados em 11 estados. Com relação à procedência dos doentes, 21 (58%) eram militares e missionários advindos do Haiti, enquanto 10 (28%), 2 (5,5%), 2 (5,5%) e 1 (3%) eram provenientes da República Dominicana, Guadalupe, Venezuela e Guiana Francesa, respectivamente (SVS/MS, 2014b).

Os primeiros casos autóctones de CHIKV foram notificados em setembro de 2014 no município de Oiapoque (AP) e posteriormente em Feira de Santana (BA) (Nunes *et al.*, 2015). Em 2015, uma taxa de incidência de 18,7 casos/100 mil

habitantes foi demonstrada no país, sendo que 38.332 casos suspeitos de CHIKV distribuídos em 696 municípios foram registrados entre as semanas epidemiológicas 1 e 52. Destes, 13.236 casos foram confirmados por critérios clínicos e/ou epidemiológicos e 6 óbitos de indivíduos com idade acima de 75 anos foram confirmados em municípios dos estados da Bahia, Pernambuco, São Paulo e Sergipe (SVS/MS, 2016a).

Em 2016, uma taxa de incidência de 115,6 casos/100 mil habitantes foi demonstrada, sendo que até a semana epidemiológica 37 foram registrados 236.287 casos suspeitos de CHIKV distribuídos em 2.297 municípios (Figura 1.3). Destes, 116.523 casos foram confirmados por critérios clínicos e/ou epidemiológicos. A região Nordeste demonstrou a maior taxa de incidência da doença (368,4 casos/100 mil habitantes), com destaque para as regiões do Alagoas, Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Com relação aos óbitos, 120 foram confirmados em indivíduos idosos (média de 71 anos), distribuídos em Piauí ( $n=1$ ), São Paulo ( $n=1$ ), Alagoas ( $n=2$ ), Maranhão ( $n=3$ ), Rio de Janeiro ( $n=4$ ), Bahia ( $n=5$ ), Ceará ( $n=10$ ), Rio Grande do Norte ( $n=19$ ), Paraíba ( $n=21$ ) e Pernambuco ( $n=54$ ) (SVS/MS, 2016a).



**Figura 1.3:** Casos notificados e confirmados da febre chikungunya por município de notificação até a Semana Epidemiológica 37 de 2016 (SVS/MS, 2016a).

## 1.3 Dinâmica de transmissão do CHIKV

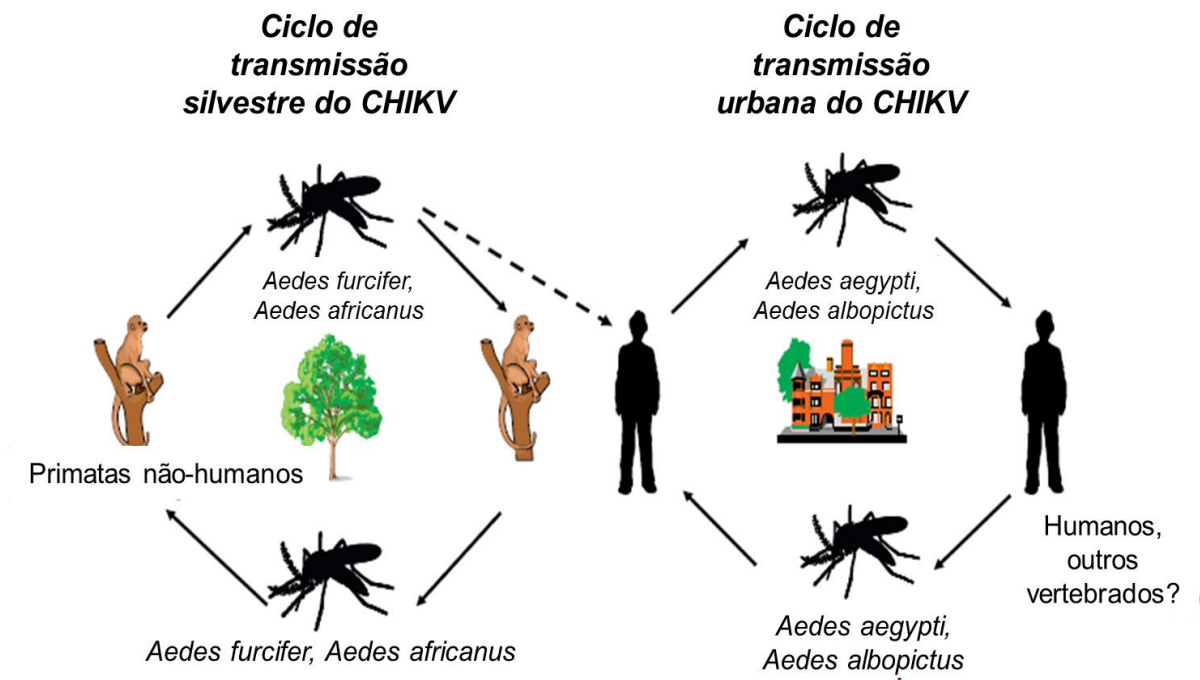
### 1.3.1 Vetores

O CHIKV é um arbovírus que pode ser transmitido de forma silvestre ou urbana (Figura 1.4). O ciclo enzoótico silvestre envolve espécies de vetores do gênero *Aedes*, tais como *Ae. furcifer-taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. vittatus*, *Ae. fulgens*, *Ae. vigilax*, *Ae. camptorhynchites*, *Ae. neoafricanus* (Jupp & McIntosh, 1990, Diallo *et al.*, 1999) e *Ae. africanus* (Powers *et al.*, 2000). Apesar de não estar envolvido diretamente na transmissão do vírus para os humanos, o ciclo enzoótico pode promover a infecção de indivíduos que vivem nas proximidades de florestas. Além disso, alguns estudos descrevem ainda *Culex annulirostris* e *Mansonia africana* como dois potenciais vetores causadores desta infecção (Jupp *et al.*, 1981, Jupp & McIntosh, 1990, Diallo *et al.*, 1999).

Com relação ao ciclo urbano (endêmico ou epidêmico), os principais são os vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, que são mosquitos altamente antropofílicos e iniciam a transmissão humano-mosquito-humano devido à necessidade das fêmeas de realizarem a hematofagia para maturação dos seus ovos (Brasil/MS, 2014, Rougeron *et al.*, 2015). Esses vetores habitam principalmente regiões tropicais e temperadas do mundo e, devido à sua enorme distribuição, tornam toda a região das Américas suscetível à propagação do CHIKV (Brasil/MS, 2014).

O mosquito *Ae. albopictus* ganhou destaque como um importante vetor urbano após a identificação da mutação E1-A226V durante a epidemia na Ilha da Reunião, que provocou o aumento da capacidade deste em transmitir o vírus (Thiboutot *et al.*, 2010).

Alguns fatores de risco podem favorecer o surgimento de epidemias de CHIKV, tais como o aumento da densidade do vetor devido a chuvas intensas, a microevolução do vírus (Schuffenecker *et al.*, 2006), alterações climáticas (Chretien *et al.*, 2007) e a ausência de imunidade ao patógeno em uma determinada população (Panning *et al.*, 2009b). Além disso, a globalização, o aumento do comércio e o elevado número de viagens podem promover a migração de indivíduos infectados para regiões onde o vírus não tem sido reportado (Chretien & Linthicum, 2007, Charrel *et al.*, 2008).



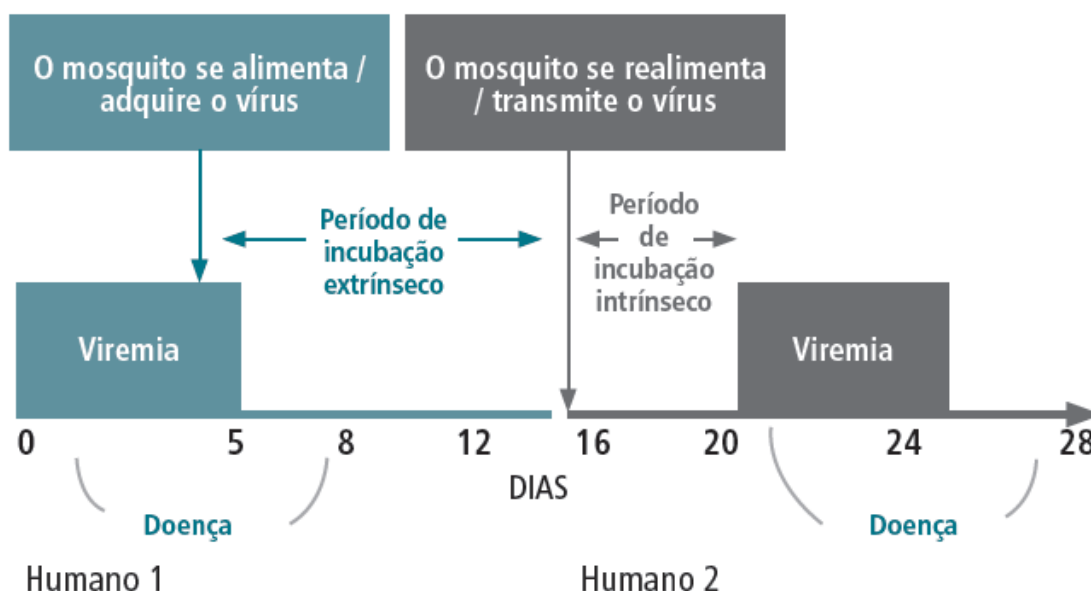
**Figura 1.4:** Ciclos silvestre e urbano de transmissão do CHIKV demonstrando os distintos vetores e hospedeiros vertebrados deste vírus (Powers, 2010).

### 1.3.2 Reservatórios

Os humanos são os principais reservatórios do CHIKV em períodos epidêmicos (Rao, 1964, Jupp *et al.*, 1981). Durante períodos interepidêmicos, diversos vertebrados são destacados como reservatórios em potencial para o vírus, tais como primatas não humanos, búfalos, roedores, pássaros e outros pequenos mamíferos (Kading *et al.*, 2013). Estudos revelam que apesar de produzirem viremia, estes animais não apresentam manifestações físicas da doença (Binn *et al.*, 1967, Jupp *et al.*, 1981, Diallo *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Período de Incubação

O mosquito adquire o vírus após a picada em um hospedeiro virêmico. O período de incubação extrínseco dura em média 10 dias e, após este período, o mosquito pode infectar um hospedeiro susceptível, tais como os seres humanos. O período de incubação intrínseco pode durar de 1-12 dias, porém mais comumente é observada uma duração de 3-7 dias (Brasil/MS, 2014), Figura 1.5.



**Figura 1.5:** Períodos de incubação extrínseca e intrínseca para o CHIKV (Brasil/MS, 2014).

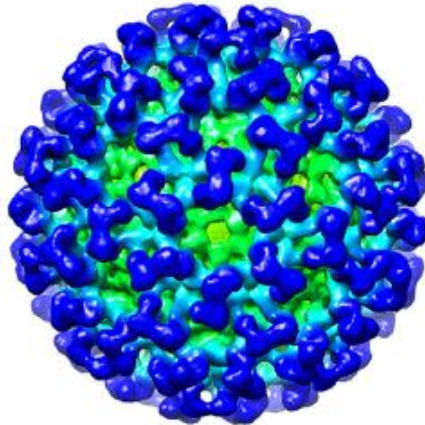
Na literatura, outros tipos de transmissão deste vírus já foram documentados, tais como a materno-fetal (Lenglet *et al.*, 2006, Robillard *et al.*, 2006, Staples *et al.*, 2009, Fritel *et al.*, 2010, Gérardin *et al.*, 2014, Taksande & Vilhekar, 2015, Laoprasopwattana *et al.*, 2016) e através de transplante de córnea (Couderc *et al.*, 2012, Long & Heise, 2012, Mahendradas *et al.*, 2013).

#### 1.4 Agente etiológico e organização genômica do CHIKV

O CHIKV é um membro da família *Togaviridae* e pertence ao gênero *Alphavirus* (Schuffenecker *et al.*, 2006, Volk *et al.*, 2010). Um total de 29 espécies de arbovírus pertencentes a este gênero são classificados em 7 complexos antigênicos distintos denominados como *Barmah Forest*, *Eastern Equine Encephalitis*, *Middelburg*, *Ndumu*, *Semliki Forest*, *Venezuelan Equine Encephalitis* e *Western Equine Encephalitis*. O CHIKV pertence ao complexo *Semliki Forest*, que envolve também outros patógenos causadores de febre, exantema e artralgia de importância médica, tais como os vírus O'nyong nyong (ONNV), Mayaro e Ross River (Solignat *et al.*, 2009).

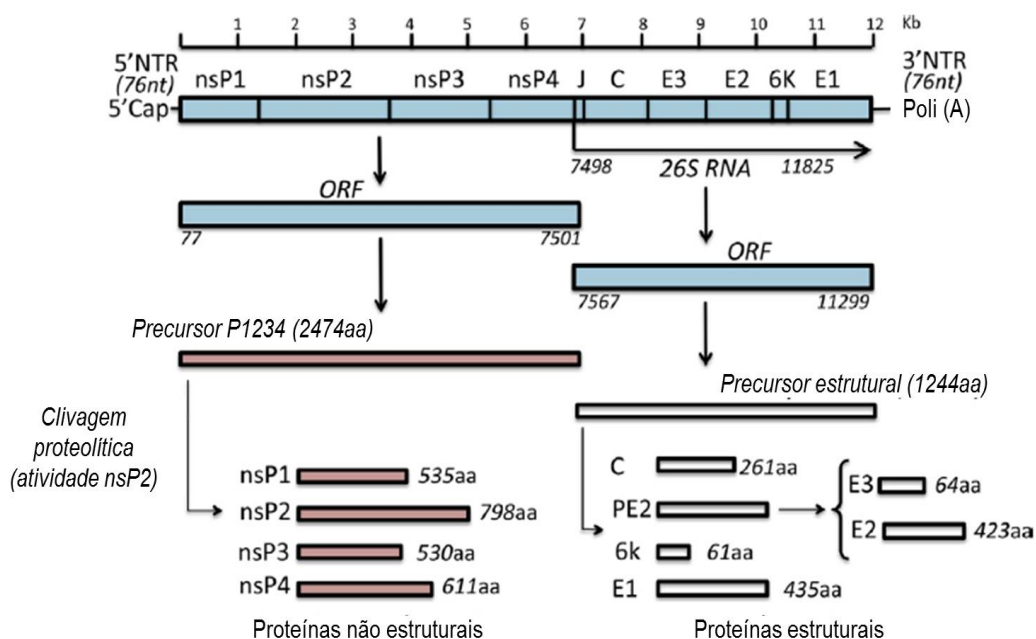
O CHIKV é esférico, pequeno e envelopado, sendo composto por um capsídeo icosaédrico envolvido por um envelope lipídico que mede aproximadamente 60-70 nm de diâmetro em pH neutro (Figura 1.6). Além disso, é

sensível à dessecação e a temperaturas acima de 58°C (Strauss & Strauss, 1994, Khan *et al.*, 2002, Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015).



**Figura 1.6:** Partícula viral do CHIKV (Fox *et al.*, 2015).

O genoma deste arbovírus é composto por um RNA de fita simples polaridade positiva medindo aproximadamente 11.8 kb de comprimento. Possui uma extremidade 5'-Cap, além de uma cauda poli-A na região terminal 3'. Apresenta também duas fases de leitura aberta (ORFs) que codificam para duas poliproteínas (não-estrutural e estrutural) que, ao sofrerem clivagem proteolítica, codificam para 4 proteínas não-estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 e 5 proteínas estruturais: C-E3-E2-6K-E1 (Strauss & Strauss, 1994, Khan *et al.*, 2002, Lum & Ng, 2015), Figura 1.7.



**Figura 1.7:** Organização do genoma do CHIKV. 5'Cap: capacete do RNA na extremidade 5'; 6k: peptídeo sinal para E1; aa: aminoácidos; C: proteína do capsídeo ou core; E1-E2: proteínas do envelope 1 e 2; nt: nucleotídeos; NTR: região



não traduzida (do inglês: *untranslated region*); nsP1-4: proteínas não estruturais 1-4; ORF: Fase de leitura aberta (do inglês: *open reading frame*); E3: pequeno peptídeo do envelope; poli (A): cauda de poliadenilato na extremidade 3' (Thiberville *et al.*, 2013).

## 1.5 Proteínas do CHIKV

A poliproteína denominada nsP123 possui 2474 aminoácidos e é a primeira a ser sintetizada pela ORF da extremidade 5'-Cap, que por sua vez é iniciada por um ATG na região 77/79 e é composta por 7424 nucleotídeos. Após clivagem proteolítica, essa poliproteína atua na produção das proteínas não-estruturais (nsP1-4) e na síntese da fita negativa de RNA durante a replicação viral (Barton *et al.*, 1991).

A nsP1 é composta por 535 aminoácidos, apresenta uma sequência consenso característica de outros *Alphavirus* (Q31-VTPNDHANARAFSHL-A47) (Wang *et al.*, 1994) e, ao lado da nsP4, catalisa a iniciação da síntese do RNA de fita negativa (Mi *et al.*, 1989).

A nsp2 possui 798 aminoácidos e uma similaridade de 98% com o ONNV. Essa proteína possui importante função de helicase e proteinase, atuando na clivagem do precursor do polipeptídeo e conseqüentemente na replicação viral (Strauss & Strauss, 1994).

A nsP3 é composta por 530 aminoácidos e contem 51% de conservação entre *Alphavirus* ao longo da sua região amino-terminal. Sua função consiste na transcrição da fita negativa (Wang *et al.*, 1994, Pehrson & Fuji, 1998), recrutamento de proteínas não-estruturais (Davis *et al.*, 1989), aumento da síntese de RNA e patogenicidade viral (Shirako & Strauss, 1994, Solignat *et al.*, 2009).

A nsP4 possui 611 aminoácidos e 91% de similaridade com a região nsP4 do ONNV. Além de catalisar a síntese de RNA fita negativa, também está envolvida na metilação e adição do Cap na fita de RNA positiva devido a sua propriedade de RNA polimerase RNA-dependente (Mi *et al.*, 1989).

A ORF que codifica as proteínas estruturais é composta por 3735 nucleotídeos, se inicia na posição 7567 e termina na posição 11.299. Sua função é codificar uma poliproteína de 1244 resíduos para posterior formação das proteínas estruturais (C, PE2, E1 e 6k) (Solignat *et al.*, 2009).

A proteína do capsídeo possui 261 aminoácidos e peso molecular em torno de 30 kDa. Além disso, é pouco conservada, com exceção de uma pequena região (43-KAGQLAQLISAVNKLTMR-60) e uma região C-terminal, que possuem a função

de montagem do nucleocapsídeo icosaédrico do vírion maduro e autoprotease, respectivamente. A atividade de autoprotease envolve os aminoácidos H139, D145, D161 e S213 (Khan *et al.*, 2002, Lum & Ng, 2015).

A E1 apresenta 435 aminoácidos, peso molecular de 44 kDa e 88% de identidade com a região E1 do ONNV. Além disso, possui um sítio de glicosilação na posição 141–143 e um resíduo C-433 conservado importante para um processo de palmitoilação (de Curtis & Simons, 1988).

A E2 contém 423 aminoácidos, 82% de similaridade com a região E2 do ONNV e peso molecular de 43 kDa (Schmidt *et al.*, 1988, Ivanova & Schlesinger, 1993). Essas proteínas se associam com a E1 formando um heterodímero antes de serem incorporadas na superfície do vírion maduro e estão relacionadas também com a fixação e entrada do vírus em células alvo durante a infecção (Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015).

A E3 apresenta 64 aminoácidos, peso molecular de 11 kDa e 50% de similaridade com alguns *Alphavirus*, tais como o ONNV (Simizu *et al.*, 1984). Essa proteína atua junto com a E2 e se relaciona com o direcionamento das proteínas estruturais que serão montadas no retículo endoplasmático, formação das espículas glicoprotéicas do envelope viral, proteção de pH durante a formação do vírus e brotamento (Parrott *et al.*, 2009, Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015).

Por fim, a 6K possui 61 aminoácidos e é gerada a partir da clivagem de PE2 e 6K. Maiores estudos serão necessários para esclarecer o seu papel, porém é observado que esta pequena proteína possui capacidade de afetar a permeabilidade da membrana, além de atuar também na montagem e brotamento viral (Strauss & Strauss, 1994, Lum & Ng, 2015).

## 1.6 Evolução e adaptação do CHIKV

Desde a sua descoberta, 4 genótipos distintos e geograficamente relacionados de CHIKV foram identificados como Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Linhagem do Oceano Índico (IOL). Os genótipos do Oeste Africano e o ECSA estão relacionados aos surtos urbanos ocorridos em toda a África subsaariana, enquanto o Asiático está associado a extensas epidemias ocorridas no Sudeste Asiático. O IOL é uma linhagem recentemente identificada e se relaciona com surtos na Ásia e em ilhas do Oceano Índico durante 2005-2011 (Volk *et al.*, 2010, Nunes *et al.*, 2015). O Oeste Africano é o mais divergente (cerca de

100-840 anos) quando comparado aos genótipos ECSA e Asiático (50-310 anos) (Powers *et al.*, 2000).

Devido ao surgimento do IOL como um grupo monofilético descendente do ECSA (Volk *et al.*, 2010, Nunes *et al.*, 2015), o mosquito *Ae. albopictus* foi responsável pelo surgimento de vários surtos no Oceano Índico, partes da Índia, Cingapura, Malásia, Tailândia, Sri-Lanka, Gabão e Itália a partir de 2006. Um estudo realizado com cepas provenientes da Ilha da Reunião esclareceu muitas questões a respeito do aumento do *fitness* viral neste vetor (Tsetsarkin *et al.*, 2011).

Os dados indicam uma mutação E1-A226V, ocasionando em uma substituição do aminoácido alanina para valina. Esta alteração está diretamente associada com o aumento da infectividade do intestino médio, disseminação para as glândulas salivares e transmissão do vírus pelo *Ae. albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2011). Outros estudos sugerem novas mutações que também oferecem vantagens para a transmissão do CHIKV por este mosquito, tais como a E2-L210Q da linhagem IOL (Niyas *et al.*, 2010). Com relação ao aumento do *fitness* em *Ae. aegypti*, mutações E1-K211E e E2-V264A foram observadas em uma epidemia ocorrida na Índia. (Agarwal *et al.*, 2016).

Além disso, o estabelecimento da evolução do vírus a partir das suas rotas de dispersão pelos continentes sugere que a atual pandemia do CHIKV se originou a partir de um surto ocorrido no Quênia durante o ano de 2004 (Kariuki Njenga *et al.*, 2008). O ECSA foi responsável por epidemias na Uganda em 1982 e na República Democrática do Congo em 2000 (Pastorino *et al.*, 2004). Acredita-se que o genótipo Asiático foi identificado em surtos atuais na Malásia (2006), Cingapura (2009-2010) e Taiwan (2006-2009), enquanto o IOL está associado às epidemias da Ilha da Reunião em 2005-2006 (Brasil/MS, 2014, Lanciotti & Valadere, 2014).

No Brasil, foram encontrados dois genótipos derivados de diferentes introduções do vírus: o ECSA e o genótipo Asiático, sendo a primeira vez que o ECSA foi reportado nas Américas. Este foi introduzido em 2014 na cidade de Feira de Santana (BA) e estudos confirmam a sua procedência a partir de Angola (África Ocidental). O genótipo asiático foi identificado também no ano de 2014 em Oiapoque (AP) e estudos genéticos confirmam a procedência a partir do Caribe e América do Sul. O primeiro caso importado de Oiapoque foi derivado da cidade de fronteira Guiana Francesa. É de fundamental importância o estabelecimento de uma vigilância epidemiológica constante para verificar possíveis mutações E1-A226V nas cepas brasileiras (Nunes *et al.*, 2015).

## 1.7 Replicação do CHIKV

Até 2009 não havia nenhuma demonstração experimental e poucos estudos relatam o ciclo de replicação do CHIKV, sendo este deduzido a partir de descrições gerais estabelecidas para *Alphavirus* (Solignat *et al.*, 2009). Além disso, o vírus entra nas células de hospedeiros susceptíveis por endocitose mediante um receptor ainda desconhecido (Lum & Ng, 2015).

Após a endocitose, o ambiente ácido do endossomo formado provoca modificações conformacionais no vírus que resultam na fusão da membrana viral e da membrana endossomal do hospedeiro, liberando o nucleocapsídeo para o citoplasma (Solignat *et al.*, 2009).

O RNA viral livre será então transcrito em uma poliproteína que, ao sofrer clivagem proteolítica, origina 4 proteínas não-estruturais (nsP1-4). Essas proteínas se associam para formar um complexo funcional de replicação viral com função de gerar um RNA intermediário de sentido negativo, que será utilizado como molde para a síntese do RNA genômico 49S e do mRNA subgenômico (Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015).

O mRNA 26S subgenômico é traduzido para codificar a proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6K). O capsídeo é então liberado para o citoplasma após sofrer processamento por serina endopeptidases. As proteínas estruturais restantes migram para o retículo endoplasmático onde sofrem modificações pós-traducionais (Solignat *et al.*, 2009, Thiberville *et al.*, 2013, Lum & Ng, 2015).

Após o transporte para o complexo de golgi, o heterodímero formado (pE2-E1) migra para a superfície celular e durante essa etapa a pE2 é clivada por uma proteinase furina ou semelhante para formar as glicoproteínas E2 e E3 (de Curtis & Simons, 1988).

Posteriormente, as glicoproteínas E1 e E2 formarão um dímero e serão transportadas para a membrana plasmática da célula hospedeira onde serão incorporadas na superfície do vírion sob a forma de espículas triméricas (Ekström *et al.*, 1994). Além disso, as proteínas do capsídeo irão se associar no citoplasma para formar um nucleocapsídeo icosaédrico que contem o RNA genômico 49S (Suomalainen *et al.*, 1992).

Durante o brotamento, o nucleocapsídeo se liga ao E2 por um processo de maturação e será então direcionado à membrana celular (Suomalainen *et al.*, 1992).

Durante esta etapa, o vírion maduro irá adquirir uma bicamada de membrana proveniente da célula hospedeira (Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015), Figura 1.8.

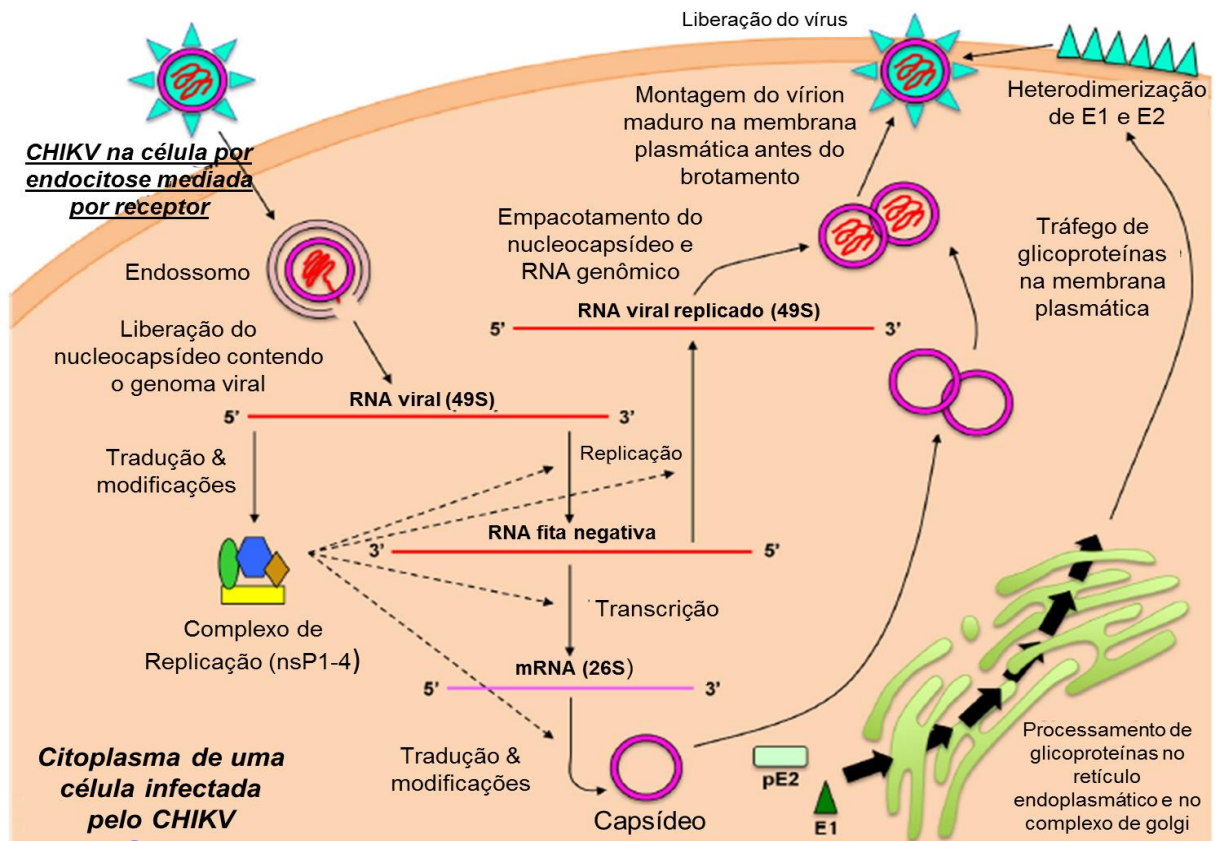
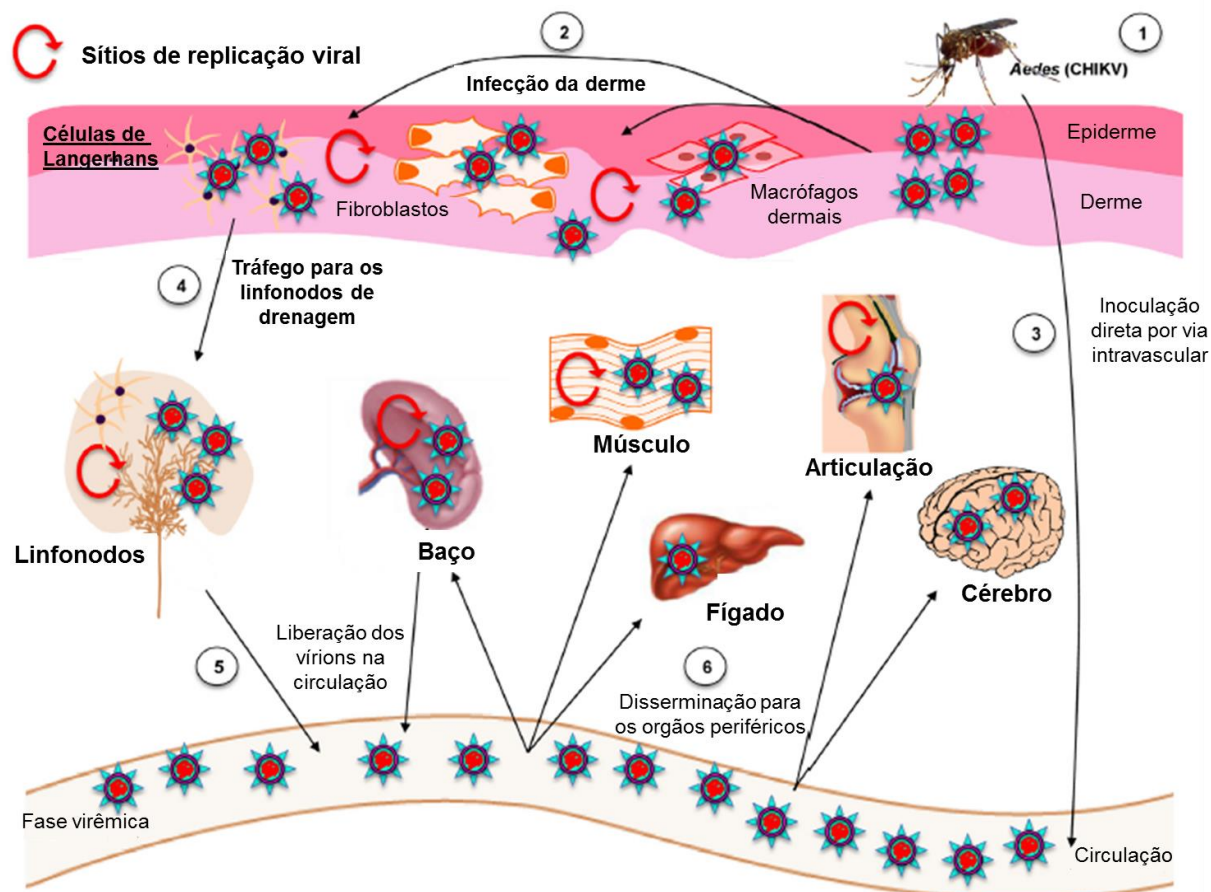


Figura 1.8: Ciclo de replicação do CHIKV (Adaptado Lum & Ng, 2015).

## 1.8 Patogênese do CHIKV

A infecção por CHIKV em indivíduos susceptíveis se inicia após a picada por um mosquito infectado. O vírus é então inoculado no hospedeiro e atinge primariamente os capilares subcutâneos, infectando e se replicando em fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e células epiteliais (Sourisseau *et al.*, 2007, Salvador *et al.*, 2009, Wikan *et al.*, 2012, Lum & Ng, 2015).

Posteriormente, o CHIKV migra para os órgãos linfóides secundários (linfonodo e baço) onde se replicam antes da sua disseminação para outros tecidos (baço, músculo, fígado, articulações e cérebro) pelo sistema circulatório. Estudos demonstram que, além dos órgãos linfóides secundários, foi encontrada replicação ativa nos músculos e nas articulações. A viremia do hospedeiro pode durar o período de 2 a 10 dias após a infecção e o ciclo se renova após a picada de um mosquito susceptível em um hospedeiro virêmico (Lum & Ng, 2015), Figura 1.9.



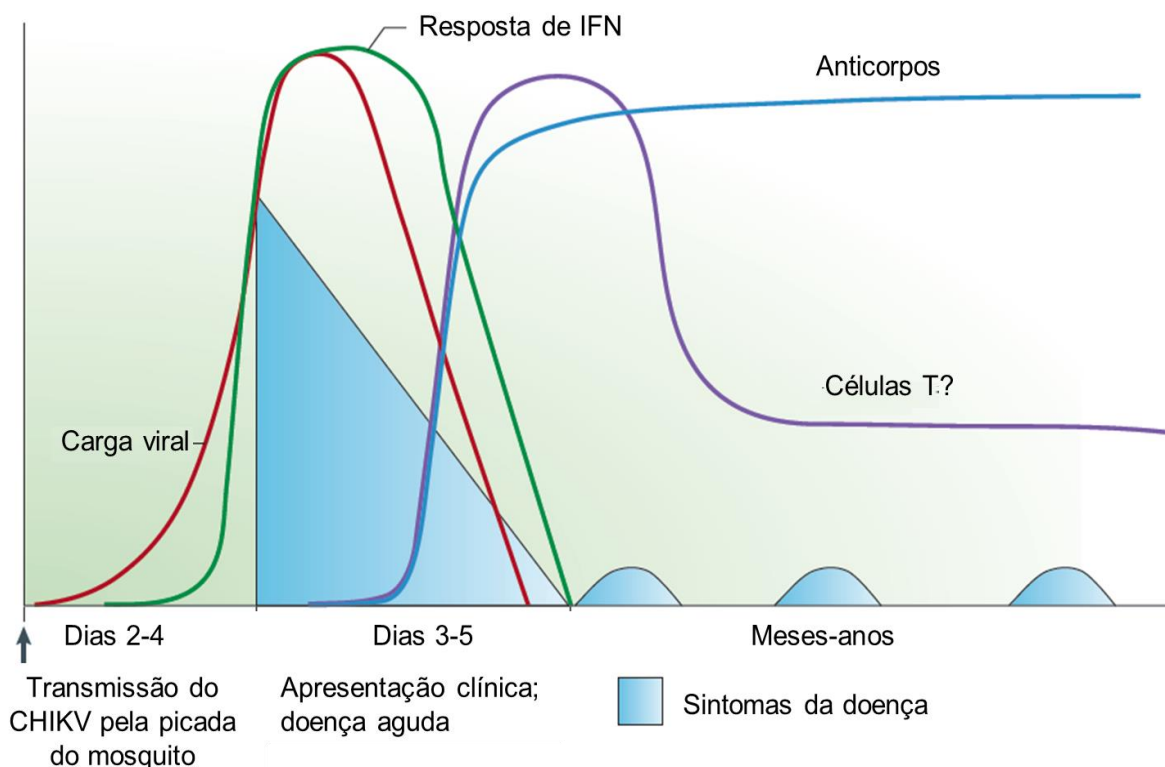
**Figura 1.9:** Patogênese da infecção por CHIKV (Adaptado de Lum & Ng, 2015).

Relatos de infecção persistente nas articulações, músculos, macrófagos esplênicos, células endoteliais do fígado, macrófagos perivascularares sinoviais e líquido cefalorraquidiano (LCR) foram observados (Chen *et al.*, 2010, Labadie *et al.*, 2010, Messaoudi *et al.*, 2013). Maiores estudos são necessários para esclarecer o neurotropismo e a neuroinvasividade viral diante do aumento de complicações neurológicas nos pacientes (Couderc *et al.*, 2008, Chandak *et al.*, 2009, Economopoulou *et al.*, 2009, Kashyap *et al.*, 2010).

Evidências demonstram também que o processo de apoptose aumenta a disseminação do vírus a partir de células infectadas apoptóticas para células vizinhas não infectadas. Foi demonstrado ainda que a autofagia eleva os níveis de replicação viral. Com relação aos eventos patológicos, alguns são considerados subclínicos, como os que ocorrem no fígado e nos órgãos linfóides (adenopatia), outros são responsáveis por intensas dores, como a infiltração mononuclear e a replicação do vírus nos músculos e nas articulações (Glick *et al.*, 2010, Krejbich-Trotot *et al.*, 2011, Lum & Ng, 2015).

## 1.9 Resposta imune ao CHIKV

O início da infecção pelo CHIKV é caracterizado pelo o aumento do título viral, que permanece em níveis muito elevados durante aproximadamente 4 dias da doença. Nesta fase ocorre também a ativação da resposta imune inata ao vírus seguida da resposta imune adaptativa após a primeira semana (Schwartz & Albert, 2010), Figura 1.10.



**Figura 1.10:** Resposta imune ao CHIKV (Adaptado de Schwartz & Albert *et al.*, 2010).

Na fase aguda da infecção pelo CHIKV, a imunidade inata é ativada com o intuito de suprimir a propagação, replicação e disseminação viral, havendo assim uma elevada e rápida produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, L-17 e IL-18), citocinas anti-inflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10), quimiocinas (Fator Estimulador de Colônias Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF), IP-10, MCP-1, Monoquina Induzida por Interferon Gama (MIG), Proteína Inflamatória de Macrófago (MIP) 1a e MIP-1b) e fatores de crescimento (Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico - FGF) (Wauquier *et al.*, 2011, Teng *et al.*, 2015).

Pesquisas demonstram que a IL-6 está relacionada com a artralgia persistente em pacientes crônicos, dado que o receptor de IL-6 é expresso em osteoblastos e conduz a perda do osso através da interrupção de RANKL/OPG no líquido sinovial dos pacientes. Esta via exerce fundamental importância na determinação da massa óssea e integridade do esqueleto (Li *et al.*, 2008, Hoarau *et al.*, 2010). Além disso, a IL-6 está relacionada com a indução da expressão de MCP-1 que, na fase aguda, provoca a infiltração de monócitos e macrófagos no local da inflamação. Nesse contexto, essas células funcionam como um veículo para a disseminação do vírus (Gardner *et al.*, 2010, Labadie *et al.*, 2010, Poo *et al.*, 2014a).

O IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$ , estes são encontrados em concentrações muito elevadas desde o primeiro dia da doença e são produzidos pelos leucócitos e fibroblastos, respectivamente. A produção de Interferon tipo I é desencadeada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), tais como os receptores *Toll-like* (TLRs) ou o gene I induzível de ácido retinóico (RIG-I), que detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). No caso do CHIKV, estão relacionados o TLR3, o TLR7, o TLR8 e os receptores semelhantes à RIG (RLRs). Em fibroblastos infectados, a produção de IFN é regulada pela proteína adaptadora CARDIF (Proteína de sinalização mitocondrial antiviral, também conhecida como MAVS) (Schwartz & Albert, 2010).

A fase aguda da infecção por CHIKV também é caracterizada pela elevada produção de IL-12. Essa citocina atua ativando as células *natural-killers* (NK), que também são detectadas desde o início e contribuem para a eliminação do vírus (Orange & Biron, 1996, Petitdemange *et al.*, 2011, Wauquier *et al.*, 2011). Alguns estudos relatam que células NK ativadas expressando CD69 foram detectadas no fluido sinovial de pacientes com infecção aguda por CHIKV (Hoarau *et al.*, 2010).

Com relação às células dendríticas, poucos estudos relatam o seu envolvimento com a resposta imune ao vírus, mas já é observada a ativação de células dendríticas plasmocitóides durante a infecção aguda. Foi observado também que um imunoreceptor de células dendríticas (DCIR) de Lectina tipo C (CLR) demonstra um papel importante na proteção do hospedeiro contra o vírus (Hoarau *et al.*, 2010, Long *et al.*, 2013).

Apesar da necessidade de maiores pesquisas com relação aos linfócitos, a infecção aguda é caracterizada por linfopenia, havendo diminuição da circulação de células B e T. Esse processo pode ser desencadeado a partir da apoptose de linfócitos mediado pelo IFN tipo I (Schwartz & Albert, 2010). A ação tardia dessas



células não desmerece a sua importância, tendo em vista que estas exercem importante papel na promoção da resposta de memória prolongada específica para o vírus (McCance & Huether, 2013).

Após a resolução da infecção, ocorre o repovoamento de linfócitos circulantes e as células B promovem a liberação de IL-4 e IL-10, iniciando uma produção de IgG específico para o vírus dominado pelo isotipo IgG3 (Kam *et al.*, 2012a). Apesar da sua importância protetora, pode ocorrer *Enhancement* Dependente de Anticorpos (ADE), normalmente relatada nas infecções graves por dengue (Chareonsirisuthigul *et al.*, 2007, Balsitis *et al.*, 2010, Zellweger *et al.*, 2010, Halstead, 2014). No caso do CHIKV, o ADE pode causar doença grave devido ao aparecimento de possíveis quasi-espécies com mutações que podem aumentar os níveis de anticorpos sub-neutralizantes (Stapleford *et al.*, 2014). Além disso, alguns anticorpos podem se tornar sub-neutralizantes após transmissão materna, podendo causar uma infecção mais grave caso a criança seja exposta ao vírus (Ng *et al.*, 2014).

Seguindo a ativação de respostas adaptativas, ocorre primeiramente a produção de células T CD8+. Posteriormente, há uma ativação das células T CD4+, que foram detectadas no líquido sinovial de pacientes crônicos e são as principais mediadoras da inflamação e inchaço nas articulações pela produção de IL-1 $\alpha$  e IL-2RA (Hoarau *et al.*, 2010, Wauquier *et al.*, 2011, Kam *et al.*, 2012b). Estudos demonstram um grande envolvimento de Th1 (Gardner *et al.*, 2010, Nakaya *et al.*, 2012, Teo *et al.*, 2013, Teo *et al.*, 2015) e Th17 produzida pela IL-17 (Ng *et al.*, 2009, Chow *et al.*, 2011, Teng *et al.*, 2015), sendo seu papel patogênico demonstrado na literatura em casos de artrite reumatóide (Kotake *et al.*, 1999, Chabaud *et al.*, 2000).

Além disso, células T reguladoras (Tregs) são frequentemente estudadas por estarem presentes no processo de tolerância imunológica das doenças auto-imunes, porém, pesquisas demonstram o envolvimento destas células em infecções pelo CHIKV (Belkaid & Rouse, 2005, Belkaid, 2007, Fessler *et al.*, 2013, Dhaeze *et al.*, 2015) onde ocorre proteção contra o vírus pela indução de células T específicas a um estado de anergia (Lee *et al.*, 2015).

Na fase crônica, a resposta inflamatória ao vírus leva a eliminação viral no sangue e a recuperação clínica do paciente. Em um grupo de indivíduos, a artralgia e mialgia podem persistir, culminando em casos de síndrome artrítica debilitante que pode durar até mais de 1 ano. Este fato se deve a forte resposta de Th1 durante a infecção aguda (Hoarau *et al.*, 2010).

Pacientes com doença crônica desenvolvem uma grave inflamação sistêmica com altos níveis Th2, IL-4 e IL-13 e isto pode estar associado aos elevados níveis de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-12 produzidos na fase aguda. Entre essas fases, macrófagos são ativados para regular a inflamação e um ciclo vicioso de produção de IL-6/RANKL pode também estar associado à persistência da doença (Dupuis-Maguiraga *et al.*, 2012, Noret *et al.*, 2012, Phuklia *et al.*, 2013), Figura 1.11.

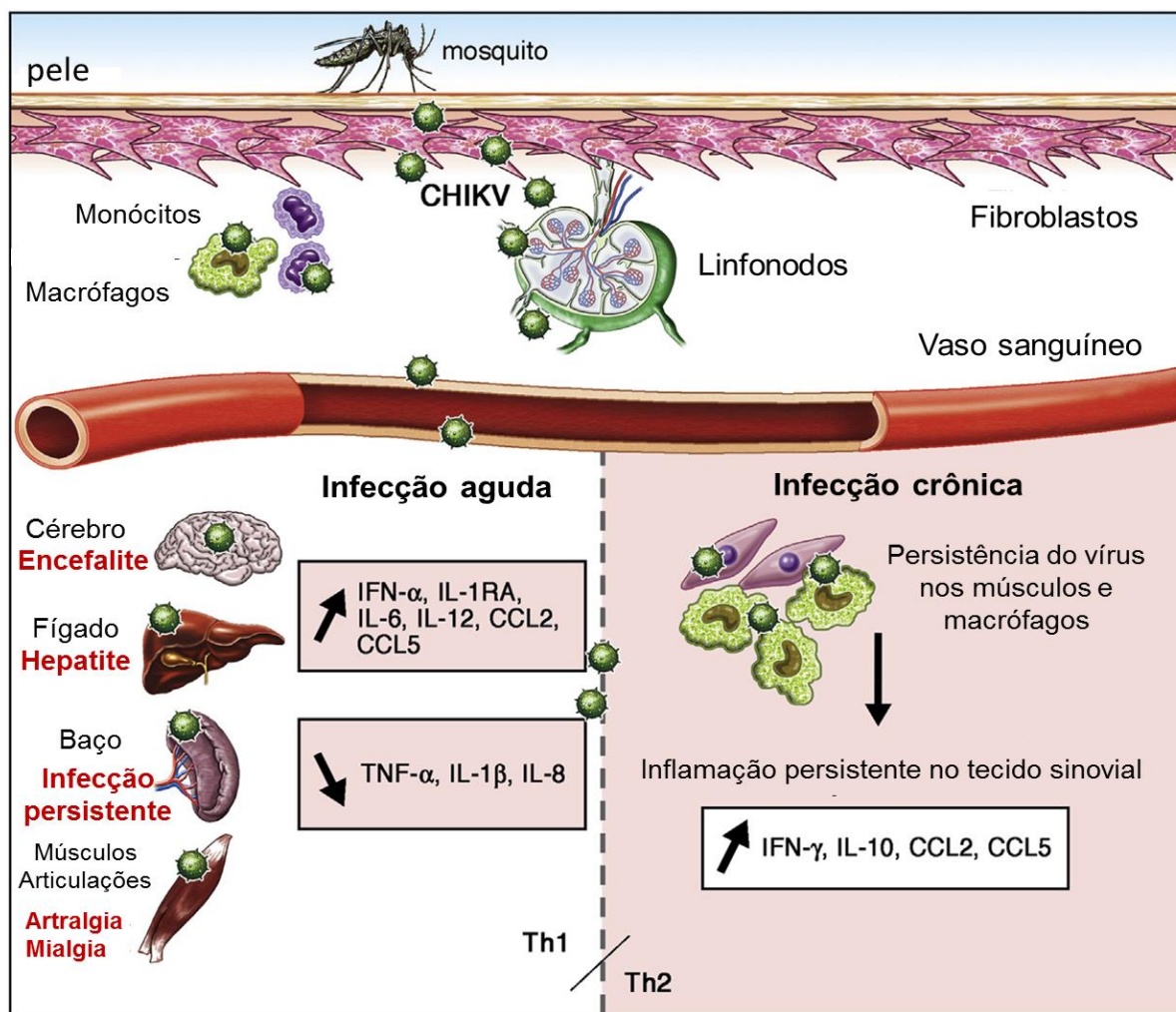


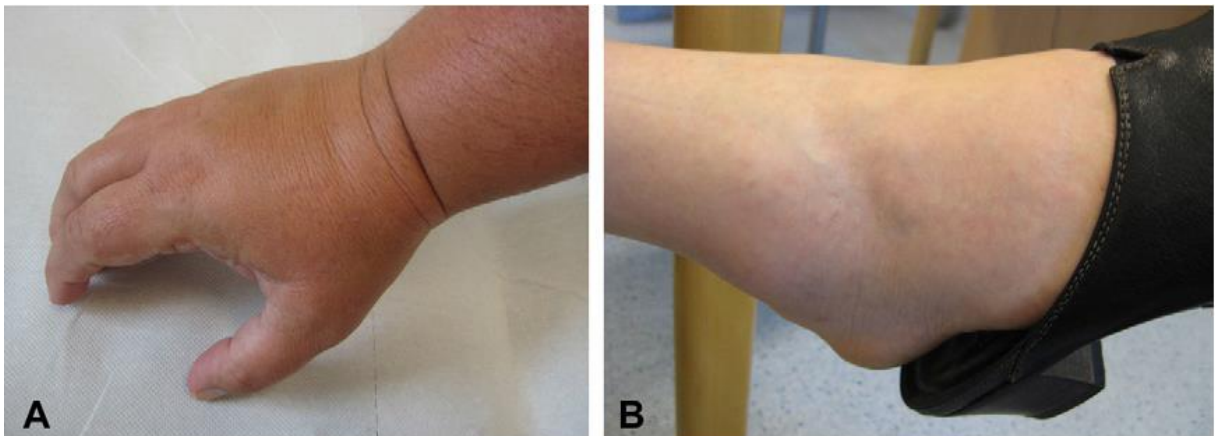
Figura 1.11: Imunopatologia do CHIKV (Petitdemange *et al.*, 2015).

## 1.10 Manifestações clínicas das infecções por CHIKV

Após o período de incubação, o hospedeiro virêmico inicia um quadro clínico agudo que pode evoluir para uma fase subaguda e/ou crônica da infecção pelo CHIKV (Brasil/MS, 2014).

### 1.10.1 Fase aguda

A fase aguda ou febril da infecção pelo CHIKV pode durar até 10 dias e é caracterizada por um início súbito de febre acompanhado pelos seguintes sintomas: 1) poliartralgia intensa, afetando principalmente as articulações distais de forma simétrica, como os joelhos, tornozelos, mãos e pulsos; 2) edema normalmente associado à tenossinovite ou dor ligamentar (Figura 1.12); 3) exantema (macular ou maculopapular) do segundo ao quinto dia após o início da febre; 4) prurido generalizado ou na região palmo-plantar, que pode ocorrer em 25% dos pacientes; 5) cefaléia; 6) fadiga e 7) mialgia leve ou moderada (Bandyopadhyay & Ghosh, 2008, Ali Ou Alla & Combe, 2011, Kucharz & Cebula-Byrska, 2012, Brasil/MS, 2014).



**Figura 1.12:** Edemas bilaterais nas mãos e pés de um paciente com infecção aguda pelo CHIKV. (A) Edema nas mãos e pulsos; (B) Edema nos pés e tornozelos (Tappe *et al.*, 2010).

As manifestações articulares podem resultar na incapacidade de realização das atividades diárias, redução da qualidade de vida, astenia, depressão e ansiedade (Queyriaux *et al.*, 2008, Couturier *et al.*, 2012, Sam *et al.*, 2015). Além disso, esses sintomas são menos pronunciados e menos frequentes em crianças (Gérardin *et al.*, 2008, Queyriaux *et al.*, 2008, Sebastian *et al.*, 2009).

Estudos demonstram também outros sinais menos comuns, tais como diarreia, vômito, hemorragia (Javelle *et al.*, 2014, Hyle & Alame, 2015), conjuntivite, dermatite esfoliativa, lesões vésico bolhosas, hiperpigmentação, fotossensibilidade, lesões simulando eritema nodoso, úlceras orais, linfadenomegalia cervical (Economopoulou *et al.*, 2009, Brasil/MS, 2014) e uveíte anterior (Mahendradas *et al.*, 2013), além de sintomas como inflamação do ouvido (Javelle *et al.*, 2014, Hyle &

Alame, 2015), dor retro-ocular, dor abdominal, neurite, faringite e manifestações do trato gastrointestinal em crianças (Economopoulou *et al.*, 2009, Brasil/MS, 2014).

### **1.10.2 Fase subaguda e crônica**

A fase subaguda se inicia a partir do décimo dia de doença, podendo ter até 3 meses de duração. Esta fase é caracterizada na maioria dos casos pelo desaparecimento da febre e persistência da poliartralgia, que é geralmente acompanhada de edema de intensidade variável e tenossinovite hipertrófica subaguda em punhos e tornozelos (Brasil/MS, 2014).

Além disso, é nesta fase que os sintomas depressivos costumam aparecer, pois diante das dores incapacitantes, o paciente fica impossibilitado de realizar as suas atividades diárias e isto atinge gravemente o seu estado emocional, ocasionando em depressão e ansiedade (Schilte *et al.*, 2013). Desta forma, é de fundamental importância o acompanhamento médico do paciente para tratamento dos sintomas emocionais e investigação sobre o possível aparecimento de sintomas crônicos, que devem ser combatidos de forma imediata com o auxílio de terapias específicas que visam evitar a persistência da artralgia e destruição da articulação (Couturier *et al.*, 2012, Yaseen *et al.*, 2014).

Após a fase aguda, a persistência dos sintomas por um período maior que 3 meses caracteriza a fase crônica da doença. Essa fase pode durar mais de 1 ano e o paciente pode apresentar persistência da poliartralgia simétrica com ou sem edema, limitação de movimento e deformidade, fadiga, cefaléia, prurido, alopecia, exantema, bursite, tenossinovite, disestesia, parestesia, dor neuropática, fenômeno de *Raynaud*, alterações cerebelares, distúrbios do sono, alterações da memória, déficit de atenção, alterações do humor, turvação visual e depressão. Alguns fatores de risco como a idade acima de 45 anos favorecem a cronificação e intensidade das lesões articulares (Parola *et al.*, 2007, Brasil/MS, 2014).

### **1.10.3 Manifestações atípicas**

A infecção pelo CHIKV foi considerada até recentemente como causadora de uma doença benigna. Apesar disso, numerosos relatos desafiaram a natureza branda da doença (Rajapakse *et al.*, 2010) e por isso esta deve ser estudada com atenção (Sam *et al.*, 2015).

As manifestações atípicas abrangem complicações neurológicas (meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, síndrome

cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias), cardíacas (miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia e instabilidade hemodinâmica), renais (nefrite e insuficiência renal aguda), dérmica (hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas e ulcerações aftosas) e ocular (neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte). Essas complicações podem ocorrer devido a uma resposta incomum do hospedeiro para o vírus ou devido a variantes mutantes de CHIKV ainda desconhecidas (Rajapakse *et al.*, 2010), podendo ser fatais em recém-nascidos e idosos portadores de co-morbidades (Mahendradas *et al.*, 2008, Rajapakse *et al.*, 2010, Sam *et al.*, 2015).

Apesar da necessidade de maiores pesquisas comprovando o neurotropismo, neuroinvasividade e neurovirulência (Arpino *et al.*, 2009), evidências confirmam a ocorrência de encefalite e meningoencefalite associadas ao CHIKV, sendo este detectado por RT-PCR em tempo real em 8 (14%) amostras de plasma e 3 amostras de fluido cerebrospinal de 58 crianças com suspeita de danos no sistema nervoso central (Lewthwaite *et al.*, 2009). Além disso, a síndrome de Guillain-Barré é uma doença desmielinizante inflamatória aguda que também pode ocorrer em dois terços dos pacientes infectados (Lebrun *et al.*, 2009).

Com relação às complicações oculares, o CHIKV pode causar conjuntivite, uveíte (Chanana *et al.*, 2007, Mittal *et al.*, 2007), coroidite macular (Chanana *et al.*, 2007) e neurite óptica (Mittal *et al.*, 2007), podendo esta última ocasionar em perda visual (Rose *et al.*, 2011).

Com relação ao sistema cardiovascular, estudos realizados a partir da observação de pacientes com miocardite pós-CHIKV sugerem uma relação de causa e efeito entre esta infecção e distúrbios cardíacos, comprovando que este vírus pode invadir o miocárdio e danificar as fibras musculares, ocasionando em danos devido a uma reação de hipersensibilidade ou autoimune. Após a doença inicial, a cardiomiopatia surge após sintomas persistentes de cardiomegalia e alterações eletrocardiográficas, sendo que o estado alterado do miocárdio pode persistir muito tempo após a infecção inicial e tornar o órgão mais propenso a danos recorrentes causados por outros agentes (Obeyesekere & Hermon, 1972). Desta forma, o possível envolvimento do miocárdio durante a infecção pode resultar em complicação letal e morte súbita (Mirabel *et al.*, 2007).

Além disso, pode ocorrer replicação do CHIKV em tecido renal (Solanki *et al.*, 2007). Estudos indicam a ocorrência de insuficiência hepática, rabdomiólise, falência de múltiplos órgãos, anormalidades endócrinas, vasculite e hemorragias cerebrais,

que foi comprovada pela morte de uma criança com manifestações hemorrágicas e colapso circulatório (Rajapakse *et al.*, 2010).

O CHIKV pode estar associado também com a perda auditiva neurossensorial súbita (Bhavana *et al.*, 2008). Com relação às desordens musculoesqueléticas, estudos revelam a ocorrência de artrite incapacitante, sendo o CHIKV considerado um importante fator desencadeante de artrite reumatóide e artrite psoriática (Chopra *et al.*, 2008).

#### **1.10.4 Grupos de risco**

O CHIKV pode afetar indivíduos de qualquer idade e ambos os sexos. Apesar disso, a apresentação clínica da doença pode variar de acordo com tais condições (Brasil/MS, 2014). O sexo feminino é destacado como fator de risco para o agravamento e persistência das dores articulares. Estudos indicam também que a idade avançada é considerada um fator de risco para a gravidade da doença devido à presença de comorbidades e uma resposta imunológica menos eficiente, sendo que indivíduos acima de 65 anos apresentaram uma taxa de mortalidade 50 vezes maior quando comparados a indivíduos menores de 45 anos de idade (Essackjee *et al.*, 2013, Brasil/MS, 2014).

Apesar da maioria dos casos de infecção por este vírus durante a gravidez não resultarem em transmissão para o feto, ainda assim podem ocorrer abortos espontâneos e neonatos podem apresentar manifestações neurológicas graves (Brasil/MS, 2014).

Com relação aos portadores de osteoartrite anterior à infecção, este parece ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de reumatismo (Sissoko *et al.*, 2009). Além disso, pacientes imunocomprometidos também podem sofrer agravamento dos sintomas e manifestações neurológicas (Kee *et al.*, 2010).

#### **1.10.5 Infecção neonatal e transmissão mãe-filho**

A infecção neonatal ocorre a partir da transmissão do CHIKV da mãe para o filho, sendo que a doença se desenvolve somente quando não há tempo suficiente para a produção materna de anticorpos neutralizantes para o vírus. A infecção pode ocorrer por transmissão intraparto e ainda não há evidência de que o vírus seja transmitido através do leite materno (Brasil/MS, 2014).

O recém-nascido se apresenta assintomático nos primeiros dias e a partir do quarto dia pode desenvolver sinais como febre, hiperalgesia, eritrodermia seguida de

descamação da pele, recusa alimentar, diarreia, edema das extremidades, encefalopatia com convulsões e manifestações hemorrágicas. O risco durante o desenvolvimento fetal pode ocorrer nos primeiros meses de gravidez e dentre as complicações para o feto, destacam-se a encefalopatia aguda, afasia e encefalomielite disseminada (Khandelwal *et al.*, 2012, Kucharz & Cebula-Byrska, 2012, Brasil/MS, 2014).

É fundamental que epidemiologistas e clínicos estejam atentos para o grande espectro de manifestações clínicas que podem ocorrer durante a infecção pelo CHIKV, pois a detecção precoce destas complicações pode reduzir a mortalidade em casos graves (Rajapakse *et al.*, 2010). Um fato importante é que em 2016 foi relatado no Brasil o primeiro caso de encefalite em um neonato que adquiriu o vírus por transmissão vertical (Bandeira *et al.*, 2016).

#### **1.10.6 Óbito por CHIKV**

Em surtos passados, complicações graves e mortes causadas por CHIKV foram raramente relatadas (Sam *et al.*, 2010), sendo este último um evento extremamente raro (Bandyopadhyay & Ghosh, 2008). Além disso, a avaliação do aumento da mortalidade é difícil devido à falta de dados clínicos, confirmação virológica e exclusão de outras causas infecciosas (Farnon *et al.*, 2008).

Alguns estudos relatam óbitos ocorridos na Ilha da Reunião (Josseran *et al.*, 2006), Índia (Mavalankar *et al.*, 2008), Ilhas Maurícias (Beesoon *et al.*, 2008) e Malásia (Chua, 2010, Sam *et al.*, 2010). Durante um surto na Ilha da Reunião foi concluído que a infecção por CHIKV pode levar a manifestações sistêmicas graves e doença fatal (Tandale *et al.*, 2009). Na Índia, o primeiro relato de óbito foi documentado na Bengala Ocidental em 2007 e um estudo realizado em Port Blair (2006) durante a epidemia do vírus revelou um aumento da mortalidade dos pacientes. Na Ásia, relatos têm associado a infecção com características hemorrágicas leves e embora rara, a morte é registrada em até 0,4% de recém-nascidos e idosos acometidos pelo vírus (Bandyopadhyay *et al.*, 2009, Manimunda *et al.*, 2011).

#### **1.10.7 Diagnóstico diferencial do CHIKV**

Diante da presença de diversas doenças exantemáticas ou que apresentam febre acompanhada de artralgia no Brasil, estas podem ser confundidas facilmente com a infecção pelo CHIKV. Desta forma, o diagnóstico diferencial apresenta

fundamental importância para o correto manejo clínico do paciente e é preconizado que este seja realizado pela exclusão de doenças como malária, dengue, leptospirose, infecções alfavirais, artrite pós-infecciosa e artrite reumatoide juvenil (Brasil/MS, 2014).

Além disso, a co-circulação de DENV, ZIKV e CHIKV no Brasil dificulta o sucesso do diagnóstico diferencial, tendo em vista que ambos apresentam sinais e sintomas muito semelhantes. Quando comparados, o CHIKV causa mais febre, artralgia, erupção cutânea e linfopenia, o dengue é caracterizado por mialgia, discrasias hemorrágicas, leucopenia, neutropenia, hematócrito elevado e trombocitopenia, enquanto o zika ocasiona principalmente febre baixa, exantema e prurido (Brasil/MS, 2014), Figura 1.13.



**Figura 1.13:** Perfil diferencial das manifestações clínicas causadas a partir de infecções pelos arbovírus dengue, zika ou chikungunya (SESAB, 2016).

### 1.11 Diagnóstico laboratorial do CHIKV

O diagnóstico de CHIKV pode ser realizado através de métodos virológicos ou sorológicos, que são escolhidos de acordo com a quantidade de dias de doença do paciente. Os métodos virológicos envolvem o isolamento viral e a reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), enquanto os métodos sorológicos são caracterizados pelo teste de neutralização por



redução de placas (PRNT), a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste ELISA para detecção de IgM ou IgG (Kucharz & Cebula-Byrska, 2012, Brasil/MS, 2014).

Os materiais biológicos a serem coletados são geralmente sangue, soro, líquido cérebro-espinhal (casos neurológicos) e/ou líquido sinovial. Independente da metodologia a ser utilizada para o diagnóstico, a coleta deve ser realizada de forma correta para evitar contaminação ou perda do material genético da amostra. Além disso, o armazenamento correto é essencial, sendo de -70°C para os espécimes destinados às técnicas virológicas e -20°C para as amostras que serão utilizadas na sorologia (Brasil/MS, 2014).

Atualmente, existem muitos testes disponíveis para o diagnóstico do CHIKV que detectam a fase aguda ou convalescente da doença, porém muitos estudos serão necessários para a identificação de métodos cada vez mais sensíveis e específicos. Durante a fase virêmica do paciente é recomendada a amplificação de ácidos nucleicos, enquanto os testes sorológicos são importantes para determinar o estado imunológico do indivíduo em fase de convalescência ou crônico (Sam *et al.*, 2015).

### **1.11.1 Isolamento viral**

O isolamento de CHIKV consiste em um método padrão-ouro e deve ser realizado em laboratórios de Biossegurança nível 3 (BSL-3) para que o risco de transmissão viral seja reduzido (Dash *et al.*, 2011). Este pode ser realizado em amostras de sangue ou soro bem conservadas e armazenadas de pacientes com doença aguda ( $\leq 5$  dias de doença) ou de mosquitos coletados no campo (Brasil/MS, 2014).

O isolamento pode ser realizado através de inoculação em um sistema de cultura celular com linhagem susceptível ao vírus ou através do uso de camundongos. A cultura celular pode ser feita em monocamadas de células Vero, BHK-21, células HeLa ou células C6/36 clonadas de mosquito *Ae. albopictus* (Kucharz & Cebula-Byrska, 2012, Brasil/MS, 2014).

A confirmação do isolamento pode ser feita por imunofluorescência indireta (IFI) através do uso de antissoro específico para CHIKV ou através de RT-PCR do sobrenadante da cultura ou suspensão do cérebro de camundongo (Brasil/MS, 2014).

### **1.11.2 Métodos moleculares para detecção do CHIKV**

Diversas metodologias de RT-PCR convencional e em tempo real que visam detectar o genoma do CHIKV têm sido publicadas na literatura. As ferramentas convencionais principais podem amplificar as regiões nsP1, nsP4, E1 ou E2 do vírus (Hasebe *et al.*, 2002, Pfeffer *et al.*, 2002, Dash *et al.*, 2008, Sánchez-Seco *et al.*, 2009, Collao *et al.*, 2010, Mishra *et al.*, 2011, Saha *et al.*, 2013, Soni *et al.*, 2013), sendo duas dessas capazes de diferenciar DENV e CHIKV através de uma reação *multiplex* (Mishra *et al.*, 2011, Saha *et al.*, 2013).

Com relação aos métodos de RT-PCR em tempo real, estes visam amplificar as regiões nsP1, nsP2, nsP3, nsP4 ou E1 do genoma do CHIKV (Pastorino *et al.*, 2005, Carletti *et al.*, 2007, Edwards *et al.*, 2007, Lanciotti *et al.*, 2007, Laurent *et al.*, 2007, Panning *et al.*, 2009a) Alguns protocolos utilizam o SYBR Green para a quantificação dos produtos amplificados (Ho *et al.*, 2010, Ummul Haninah *et al.*, 2010). Outros utilizam uma metodologia *multiplex* para detectar DENV e CHIKV simultaneamente (Pongsiri *et al.*, 2012, Cecilia *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2015).

Estudos demonstram também novos meios para o diagnóstico do CHIKV, tais como a detecção de fita negativa (Plaskon *et al.*, 2009, Chiam *et al.*, 2013), a amplificação isotérmica mediada por *Loop* (LAMP) (Parida *et al.*, 2007, Reddy *et al.*, 2012) e o *lab-on-chip*, que consiste em um chip microfluídico capaz de detectar simultaneamente 26 patógenos tropicais de importância médica, como o CHIKV e o DENV (Tan *et al.*, 2014, Sam *et al.*, 2015).

### **1.11.3 Métodos sorológicos aplicados ao diagnóstico do CHIKV**

O diagnóstico sorológico deve ser realizado com espécimes de paciente durante a fase convalescente ou crônica da doença ( $\geq 7$  dias após o início dos sintomas), que é o período em que os anticorpos da classe IgM e/ou IgG começam a ser detectados. Dentre as ferramentas utilizadas, é possível destacar a detecção de anticorpos IgM ou IgG pelo teste de imunoabsorção enzimática (ELISA), o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) e a imunofluorescência indireta (IFI) (Brasil/MS, 2014).

A IFI é muito importante para a confirmação do isolamento viral, enquanto o PRNT atua confirmando uma infecção recente devido à observação de reatividade cruzada para os vírus do grupo *Semliki Forest* (Brasil/MS, 2014).

O Ministério da Saúde (2014) preconiza como teste sorológico de referência (padrão-ouro) um protocolo *in house* do teste ELISA de captura de IgM anti-CHIKV. No entanto, diversos testes já se encontram disponíveis comercialmente, como por exemplo: NovaLisa<sup>®</sup> Chikungunya IgM  $\mu$ -capture (NovaTec Immundiagnostica, Alemanha) e NovaLisa<sup>®</sup> Chikungunya IgG capture (NovaTec Immundiagnostica, Alemanha), Anti-CHIKV ELISA IgG/IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha), Anti-CHIKV IgM human ELISA (Abcam, Reino Unido), SD Bioline Chikungunya IgM ELISA (Standard Diagnostics, Coreia do Sul), teste Rápido Chikungunya IgM OnSite (CTK Biotech Inc., San Diego, CA, USA), dentre outros.

No Brasil, um total de 19 produtos para o diagnóstico laboratorial do CHIKV, entre testes sorológicos, testes rápidos e moleculares, encontram-se registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, disponível em [http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto\\_correlato/rconsulta\\_produto\\_internet.asp](http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/rconsulta_produto_internet.asp), acesso em 15 de Novembro de 2016).

Estudos demonstram que os testes Anti-CHIKV ELISA IgG/IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) apresentam uma elevada especificidade (82%) e sensibilidade (85%), enquanto os demais apresentam um baixo desempenho para a detecção de casos de CHIKV (Prat *et al.*, 2014, Johnson *et al.*, 2016).

## 1.12 Tratamento

A infecção pelo CHIKV é autolimitada e possui resolução espontânea. Não há nenhuma vacina atualmente disponível e o tratamento não é específico, sendo este realizado de forma sintomática. Durante a fase aguda, o paciente deve permanecer em repouso, hidratado e distante da exposição ao mosquito de modo a não contribuir para o ciclo de transmissão viral (Bhakat *et al.*, 2014, Brasil/MS, 2014, Lo Presti *et al.*, 2014). O uso de medicamentos é restrito ao alívio da febre (acetaminofeno ou paracetamol) e das dores articulares (ibuprofeno, naproxeno ou outro anti-inflamatórios não hormonais) (Taubitz *et al.*, 2007, Sudeep & Parashar, 2008, Powers, 2010). Não é recomendado o uso de aspirina, pois esta pode resultar em hemorragia e, em menores de 12 anos, na síndrome de *Reye*. Além disso, o fosfato de cloroquina também não deve ser utilizado por não apresentar nenhum benefício para a recuperação do paciente (Lamballerie *et al.*, 2008, Brasil/MS, 2014).

Durante as fases subaguda e crônica, é necessário o tratamento fisioterápico do doente acompanhado de uma terapia anti-inflamatória prolongada com o uso de

corticosteroides, injeções intra-articulares de corticosteróides, anti-inflamatórios não-hormonais tópicos, morfina ou metotrexato (Jain *et al.*, 2008, Brasil/MS, 2014, Foissac *et al.*, 2015). Estudos demonstram alguns potenciais medicamentos, antivirais e/ou substâncias para o tratamento do CHIKV, tais como a ribavirina (Ravichandran & Manian, 2008), vitamina C (Gonzalez *et al.*, 2014) e produtos naturais inibidores do vírus (Bhakat & Soliman, 2015).

### 1.13 Prevenção e controle

Devido à existência de apenas um sorotipo viral, o desenvolvimento de uma vacina consiste em uma forma eficiente de proteção ao vírus. Muitos estudos se iniciaram desde 1967 e demonstram diferentes abordagens, tais como as vacinas inativadas ou de vírus vivo atenuado (Harrison *et al.*, 1971, Mallilankaraman *et al.*, 2011, Tretyakova *et al.*, 2014) vacinas quiméricas, de DNA recombinante, de peptídeos, de subunidades protéicas, recombinantes com adenovírus (Azevedo *et al.*, 2015), partículas semelhantes a vírus (VLPs) (Harrison *et al.*, 1971, Azevedo *et al.*, 2015) e vacinas baseadas em plantas (Salazar-González *et al.*, 2015).

Até o ano de 2015, algumas vacinas progrediram para a fase clínica, tais como a de vírus atenuado da cepa 181/clone25 criada pelo exército dos EUA em 1980 (Levitt *et al.*, 1986), uma vacina VLP produzida pela expressão de proteínas estruturais de CHIKV em células de vertebrados (Akahata *et al.*, 2010) e outra com um vírus vetor do sarampo (Brandler *et al.*, 2013).

Apesar de todos os estudos sugerindo potenciais candidatos, nenhuma vacina efetiva e licenciada para a prevenção da infecção pelo CHIKV foi estabelecida até o momento (Brasil/MS, 2014, Azevedo *et al.*, 2015).

Devido à ausência de uma forma de prevenção, a redução do contato homem-vetor consiste na principal ferramenta disponível para o controle desta doença. O controle vetorial deve ser realizado a partir da supressão da população de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, que costumam depositar suas larvas em criadouros artificiais, tais como pneus e vasos de plantas. Portanto, é necessária a coleta e armazenamento correto de pneumáticos, resíduos sólidos e vedação de depósitos de armazenamento de água das residências (Brasil/MS, 2014).

É importante também o estabelecimento de programas de controle químico e/ou biológico através do uso de inseticidas durante as fases larvária e adulta do vetor ou o uso de larvicidas biológicos, tais como a bactéria *Bacillus thuringiensis*.

Apesar disso, os inseticidas podem provocar o surgimento de vetores resistentes que reduzem a eficácia de um determinado produto químico (Brasil/MS, 2014).

Desta forma, novas técnicas prometem diminuir alguns impactos na natureza e são baseadas em mosquitos transgênicos ou no uso da bactéria *Wolbachia*, sendo esta última capaz de bloquear a transmissão de arbovírus sem provocar o colapso da população de dípteros (Garcia *et al.*, 2016).

## **1.14 Outros arbovírus de importância médica no Brasil**

Além do CHIKV, o DENV e o ZIKV se destacam como arbovírus causadores de extensas epidemias no Brasil. Ambos pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, sendo constituídos por RNA de fita simples polaridade positiva, medindo aproximadamente 11kb de comprimento (Lindenbach *et al.*, 2007, Ladner *et al.*, 2016).

Nos últimos 50 anos, o DENV afetou mais de 100 países em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (Akiner *et al.*, 2016), sendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou este como causador da doença viral transmitida por vetores com a propagação mais rápida, possuindo enorme potencial de causar grandes epidemias por todo o mundo (WHO, 2013b). No Brasil, foram registrados 1.438.624 casos suspeitos de dengue até a semana epidemiológica 37 do ano de 2016 (SVS/MS, 2016a), sendo o Rio de Janeiro destacado como a porta de entrada e dispersão da maioria dos sorotipos (SVS/MS, 2014b).

A infecção causada por um dos quatro sorotipos de DENV (DENV 1- 4) causa uma doença febril aguda, de amplo espectro clínico, que varia desde uma infecção inaparente, até formas mais graves e fatais (WHO, 2009). A imunidade desenvolvida após a infecção a um ou mais sorotipos é sorotipo-específica e permanente. A progressão para uma doença mais grave é frequentemente, mas não exclusivamente, associada a infecções heterólogas (secundárias) por outro sorotipo e pode ser afetada pela ordem na qual o indivíduo é infectado por um tipo específico de DENV (WHO, 2009, Sharp *et al.*, 2013). O período da doença em que o paciente se encontra é importante para a decisão do método para diagnóstico mais apropriado para ser utilizado e para uma correta interpretação dos resultados obtidos, embora o tratamento não dependa do diagnóstico virológico (Kao *et al.*, 2005).

Os métodos mais utilizados de diagnóstico nas infecções por DENV incluem o isolamento viral em cultura de células, detecção de ácido nucléico viral pela RT-PCR, técnicas sorológicas para pesquisa de anticorpos específicos e de antígeno NS1 (Cordeiro, 2012).

O ZIKV se tornou um problema em todo o mundo após a sua emergência no Pacífico e nas Américas (Akiner *et al.*, 2016). Este é um flavivírus emergente, isolado pela primeira vez na floresta Zika em Uganda (Dick *et al.*, 1952) e estudos filogenéticos descrevem a existência de três linhagens de ZIKV: Oeste africano, Leste africano e Asiático (Haddow *et al.*, 2012) e, assim como os DENV e CHIKV, também é transmitido por mosquitos *Aedes* (Faye *et al.*, 2013, Waggoner & Pinsky, 2016). Apesar de relatos de transmissão ocupacional, perinatal e sexual do ZIKV, considera-se até o momento que o principal modo de transmissão do vírus seja a vetorial (Foy *et al.*, 2011, Musso *et al.*, 2015, Zammarchi *et al.*, 2015).

A febre pelo ZIKV é uma doença febril aguda e autolimitada e estima-se que somente 18% das infecções resultem em manifestações clínicas, sendo, portanto, mais frequente a infecção assintomática (Ioos *et al.*, 2014). Quando sintomática, causa febre baixa, exantema maculopapular, artralgia, mialgia, cefaleia, hiperemia conjuntival e, menos frequentemente, edema, odinofagia, tosse seca e alterações gastrointestinais, principalmente vômitos. Em geral, o desaparecimento dos sintomas ocorre entre 3 e 7 dias após seu início. Normalmente, não é associada a complicações graves e óbitos, além de ocasionar uma baixa taxa de hospitalização (Balm *et al.*, 2012). No entanto, relatos de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB) em infecções por ZIKV, principalmente em regiões de co-circulação com os DENV foram descritos (Oehler *et al.*, 2014).

No Brasil, os primeiros casos autóctones confirmados de ZIKV ocorreram em Camaçari na BA (Soares *et al.*, 2016). A autoctonia foi em seguida confirmada em Natal, RN (Zanluca *et al.*, 2015). Até a semana epidemiológica 37 do ano de 2016, foram registrados 200.465 casos suspeitos de infecção por este vírus distribuídos em 2.288 municípios, sendo que 109.596 casos foram confirmados por critérios clínicos e/ou epidemiológicos (SVS/MS, 2016a).

Em novembro de 2015, o Ministério da Saúde registrou os três primeiros óbitos por ZIKV e reconheceu a relação entre o aumento na prevalência de microcefalias com a infecção por esta arbovirose recém introduzida no país (Brasil *et al.*, 2016). A associação do ZIKV com doenças neurológicas e anomalias congênitas (Brasil *et al.*, 2016), bem como o aumento da ocorrência de casos de SGB, levou a

OMS a declarar um estado de emergência internacional para este vírus nas Américas em fevereiro de 2016, sendo este considerado uma grande ameaça à saúde pública em todas as partes do mundo (PAHO, 2016b).

Devido à presença de reatividade cruzada com o DENV em reações sorológicas, o diagnóstico para o ZIKV ainda se restringe, principalmente às técnicas moleculares, sendo o protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti *et al.* (2008) utilizado nos Laboratórios de Referência do país (Brasil *et al.*, 2016).

### **1.15 Justificativa**

A crescente ocorrência de epidemias causadas pelo CHIKV em países africanos e caribenhos permitiu a introdução desta arbovirose no Brasil, que apresenta condições ideais para a dispersão deste vírus devido à ampla extensão do território, presença de vetores em todas as regiões e susceptibilidade da população. Além disso, a ocorrência de uma tríplice epidemia em algumas regiões do país devido à presença concomitante do DENV, CHIKV e mais recentemente o ZIKV constitui um sério problema de Saúde Pública, tendo em vista que as três infecções apresentam sinais e sintomas semelhantes, tornando o diagnóstico diferencial extremamente difícil para os médicos.

A partir da introdução do CHIKV no Brasil em 2014, foram registrados surtos de transmissão autóctone no Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país, resultando em 236.287 notificações até 2016 e, devido à escassa disponibilidade de insumos para o diagnóstico, 116.523 destes casos foram confirmados por critérios clínico-epidemiológicos. Em razão das limitadas opções de prevenção e controle, o diagnóstico laboratorial exerce um papel fundamental para o tratamento oportuno dos pacientes e monitoramento da doença diante da tríplice epidemia.

Atualmente, testes sorológicos comerciais estão disponibilizados e protocolos moleculares mais específicos de RT-PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico de arboviroses têm sido sugeridos. Desta forma, a aplicação de metodologias para a identificação das diferentes fases da infecção pelo CHIKV, a realização do diagnóstico diferencial para outros arbovírus (DENV e ZIKV) e a identificação de possíveis casos de co-infecções são indispensáveis para o sucesso da vigilância epidemiológica nos estados brasileiros.

Além disso, dois dos três genótipos de CHIKV já foram reportados no Brasil: o Asiático, comumente associado aos casos ocorridos na América Latina e Caribe e o

ECSA, associado aos surtos na África Ocidental. Mutações adaptativas em cepas pertencentes ao ECSA já foram descritas e associadas a uma maior transmissão pelo mosquito *Ae. albopictus*. No entanto, estas mutações ainda não foram observadas nas cepas brasileiras pertencentes a este genótipo. Neste contexto, estudos filogenéticos e de caracterização molecular podem representar uma importante ferramenta para monitorar a dispersão dos genótipos do CHIKV, identificar mutações e contribuir para o entendimento das possíveis consequências de tais eventos.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar casos suspeitos de CHIKV em epidemias deste arbovírus ocorridas no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil e genotipar cepas representativas em apoio à vigilância deste agente no país.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Investigar casos suspeitos da infecção pelo CHIKV durante a introdução deste arbovírus no Brasil a partir das regiões Norte (Amapá - AP) e Nordeste (Feira de Santana - BA) no período de 2014-2015.
- Investigar casos suspeitos da infecção pelo CHIKV durante as tríplices epidemias de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) a partir das regiões Centro-Oeste (Campo Grande - MS) e Sudeste (Rio de Janeiro - RJ) em 2016.
- Investigar possíveis casos de co-infecções entre DENV e CHIKV durante as epidemias ocorridas no Amapá (AP) e Feira de Santana (BA) em 2014-2015 e durante as tríplices epidemias (DENV, ZIKV e CHIKV) ocorridas em Campo Grande (MS) e Rio de Janeiro (RJ) em 2016.
- Realizar a análise filogenética e caracterização molecular de cepas representativas de CHIKV detectadas durante as epidemias nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo provêm da demanda espontânea do Laboratório de Flavivírus (LABFLA, IOC/FIOCRUZ), Centro de Referência Regional para Dengue, Febre Amarela, Zika e Chikungunya (CEP 466/12) e dos Projetos aprovados para a investigação arbovírus no Amapá (CAAE: 30757314.1.0000.5248) e nos demais estados brasileiros (CAAE: 57221416.0.1001.5248).

#### 3.2 Desenho de estudo

Este estudo é do tipo prospectivo, descritivo, observacional e transversal.

#### 3.3 Critérios de inclusão e exclusão para a investigação de casos suspeitos de CHIKV

Os critérios de inclusão abrangem casos de pacientes em qualquer faixa etária e qualquer gênero que experimentaram uma doença febril acompanhada de intensa poliartralgia de acordo com o Ministério da Saúde (2014), atendidos durante as epidemias de arbovírus (CHIKV e/ou DENV e/ou ZIKV) ocorridas em estados/municípios representativos das regiões Norte (Amapá-AP) e Nordeste (Bahia-BA) do país em 2014 e 2015, além da Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul-MS) e Sudeste (Rio de Janeiro-RJ) em 2016 (Tabela 3.1). Os critérios de exclusão englobam os pacientes que não concordaram em participar do estudo ou com suspeita de outros agravos.

**Tabela 3.1:** Características geográficas e populacionais dos municípios selecionados para a investigação de casos suspeitos de CHIKV nos estados do Amapá (AP), Bahia (BA), Mato Grosso do Sul (MS) e Rio de Janeiro (RJ).

Estado	Município	Latitude	Longitude	Extensão (km <sup>2</sup> )	População (hab.)
AP	Oiapoque	03°49'29"N	51°49'05"O	22.625.018	24.263
	Aporema	01°30'21"N	50°54'43"O	6.711.950	15.212
	Porto Grande	00°42'46"N	51°24'46"O	4.401.763	16.825
	Macapá	00°02'18.84"N	51°03'59.10"O	6.407.123	465.495
	Santana	00°02'06"S	51°10'30"O	1.577.517	110.565
	Mazagão	00°06'54"S	51°17'20"O	13.131	19.157
BA	Feira de Santana	12°16'01"S	38°58'01"O	1.337.993	622.639
MS	Campo Grande	20°26'34"S	54°38'45"O	8.096.051	863.982
RJ	Rio de Janeiro	22°54'10"S	43°12'28"O	1.197.463	6.498.837

### 3.4 Investigação de casos suspeitos de CHIKV no AP

Os espécimes do AP (soro, plasma ou sangue total) foram classificados de acordo com os dias de doença para posterior realização do diagnóstico laboratorial. Os casos agudos ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) foram destinados para o diagnóstico molecular pelo protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (2007) e pelo *kit* Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA). Alguns casos confirmados para CHIKV foram quantificados através do Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard *kit* (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido) e as cepas representativas tiveram a região E1 do seu genoma sequenciadas de acordo com o protocolo descrito por Collao *et al.* (2010).

Os casos convalescentes ( $>7$  dias após o início dos sintomas) foram destinados ao diagnóstico sorológico através do teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (2014) e do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).

Adicionalmente, como diagnóstico diferencial, todos os casos foram investigados para dengue por metodologias moleculares (amostras agudas) e/ou sorológicas (amostras convalescentes) através do *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), *kit* Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA) e a detecção molecular e tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti *et al.* (1992), Quadro 3.1.

**Quadro 3.1:** Estratégias/metodologias utilizadas para a investigação de casos suspeitos de CHIKV provenientes do AP.

Classificação do caso	Estratégia	Protocolos para CHIKV e DENV
Casos agudos ( $\leq 7$ dias após o início dos sintomas)	Metodologias moleculares	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (2007).
		Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA).
		Detecção molecular e tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (1992).
Casos convalescentes ( $>7$ dias após o início dos sintomas)	Metodologias sorológicas	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério da Saúde, 2014).
		Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).
		<i>Kit</i> Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália).
		Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA).
Quantificação de amostras representativas de CHIKV		Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard <i>kit</i> (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido)
Sequenciamento parcial (E1) do genoma de amostras representativas de CHIKV		RT-PCR descrito por Collao <i>et al.</i> (2010)

### 3.5 Investigação de casos suspeitos de CHIKV na BA

Os espécimes da BA (soro) foram classificados como casos agudos ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) e submetidos às metodologias sorológicas e moleculares para o diagnóstico de CHIKV através do teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (2014), do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) e do RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV de acordo com Lanciotti *et al.* (2007). Alguns casos confirmados para CHIKV foram quantificados através do Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard *kit* (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido) e as cepas representativas tiveram a região E1 do seu genoma sequenciadas de acordo com o protocolo descrito por Collao *et al.* (2010).

Adicionalmente, como diagnóstico diferencial, todos os casos foram investigados para dengue por metodologias moleculares e sorológicas através do *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), *kit* Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA) e a detecção molecular e tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti *et al.* (1992), Quadro 3.2.

**Quadro 3.2:** Estratégias e metodologias utilizadas para a investigação de casos agudos suspeitos de CHIKV provenientes da BA.

Alvo	Estratégia	Protocolos utilizados
CHIKV	Metodologias sorológicas	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Ministério da Saúde, 2014)
		Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).
	Metodologias moleculares	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (2007).
DENV	Metodologias sorológicas	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)
		Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA).
	Metodologias moleculares	Detecção molecular e tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (1992).
Quantificação de amostras representativas de CHIKV		Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard <i>kit</i> (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido).
Sequenciamento parcial (E1) do genoma de amostras representativas de CHIKV		RT-PCR descrito por Collao <i>et al.</i> (2010).

### 3.6 Investigação de casos suspeitos de CHIKV no MS e no RJ

Os espécimes do MS e do RJ (soro ou plasma) foram classificados como casos agudos ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) ou convalescentes ( $> 7$  dias após

o início dos sintomas) e posteriormente foram submetidos às metodologias sorológicas e moleculares para o diagnóstico de CHIKV pelo teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (2014), *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha), RT-PCR para detecção do CHIKV descrito por Lanciotti *et al.* (2007) e o *kit* Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA). Alguns casos confirmados para CHIKV foram quantificados através do Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard *kit* (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido) e as cepas representativas tiveram a região E1 do seu genoma sequenciadas de acordo com o protocolo descrito por Collao *et al.* (2010).

Adicionalmente, como diagnóstico diferencial, todos os casos foram investigados para dengue e zika. Para dengue foram utilizados o *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), o Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA), o ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA) e o Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA), sendo a detecção molecular e tipagem realizada de acordo com Lanciotti *et al.* (1992) e com o protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Johnson *et al.* (2005). Com a indisponibilidade de um teste sorológico, as amostras foram testadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti *et al.* (2008), Quadro 3.3.

**Quadro 3.3:** Estratégias/metodologias utilizadas para a investigação de casos suspeitos de CHIKV provenientes do MS e do RJ.

Alvo	Estratégia	Protocolos utilizados
CHIKV	Metodologias sorológicas	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Ministério da Saúde, 2014)
		Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).
	Metodologias moleculares	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (2007).
DENV	Metodologias sorológicas	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)
		Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)
		Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)
		ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA)
	Metodologias moleculares	Detecção molecular e tipagem dos DENV de acordo com Lanciotti <i>et al.</i> (1992).
Quantificação de amostras representativas de CHIKV		Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard <i>kit</i> (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido).
Sequenciamento parcial (E1) do genoma de amostras representativas de CHIKV		RT-PCR descrito por Collao <i>et al.</i> (2010).

### 3.7 Determinação de anticorpos da classe IgM para CHIKV (MAC-ELISA)

A determinação de anticorpos da classe IgM para CHIKV foi realizada de acordo com o método *in house* ELISA de captura de IgM anti-CHIKV preconizado e descrito pelo Ministério da Saúde (2014) e pelo *kit* comercial Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha). O *kit* comercial Anti-CHIKV ELISA IgM (Sensibilidade: 98.1%; Especificidade: 98.9%) foi realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

O método *in house* ELISA de captura de IgM anti-CHIKV foi realizado conforme a seguir: 60 poços de uma microplaca Immulon II (Dynatech Ind.) foram sensibilizados através da aplicação de 75 microlitros por poço de anti-IgM humano produzido em cabra diluído na proporção de 1:2.000 em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Após esse processo, a placa foi incubada à 4° C por uma noite e no dia seguinte, o anticorpo de revestimento foi despejado em papel absorvente, seguido da aplicação de 200 µl de tampão de bloqueio (5% de leite e 0,5% Tween 20 diluídos em 100 ml de PBS pH 7,2) por poço. Posteriormente, uma nova incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos e a microplaca foi então lavada cinco vezes em lavadora automática com solução de lavagem composta por 0,5% de Tween 20 diluído em 1000 ml de PBS (pH 7,2). Em seguida, 50 µl do soro dos pacientes e dos controles (positivos e negativos) diluídos 1:400 em tampão de lavagem (0,05% de Tween 20 diluído em 100 ml de PBS pH 7,2) foram adicionados em quadruplicata na placa e esta foi incubada em câmara úmida durante 1 hora à 37°C e depois lavada cinco vezes. Posteriormente, o antígeno viral e o antígeno normal diluídos em tampão de lavagem foram aplicados em fileiras alternadas da microplaca, seguido de uma nova incubação durante uma noite à 4° C. No dia seguinte, após lavagem por cinco vezes, foi adicionado 50 µl por poço do anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase diluído em tampão de bloqueio. A placa foi incubada em câmara úmida por 1 hora à 37°C e após dez lavagens foi aplicado o substrato TMB (Gibco™) em todos os poços. Nesta etapa a placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos no escuro e uma coloração azul foi observada em poços referentes às reações positivadas. Por fim, foi adicionado 50µl por poço da solução STOP em toda a placa, havendo uma modificação da coloração azul para amarela. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com o filtro de 450 nm.

### **3.8 Determinação de anticorpos da classe IgM para DENV**

A determinação de anticorpos da classe IgM para DENV foi realizada através dos *kits* comerciais Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália) com sensibilidade de 94.7% e especificidade de 100%, e Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA) com sensibilidade de 96% e especificidade de 97% , ambos realizados de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

### **3.9 Teste de captura do antígeno NS1 de DENV**

O teste de captura do antígeno NS1 para DENV foi realizado através dos *kits* comerciais ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA) com sensibilidade de 95% e especificidade de 100%, e Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA) com sensibilidade 88.2% e especificidade de 100%, ambos realizados de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

### **3.10 Extração do RNA viral**

O RNA total das amostras suspeitas de CHIKV foi extraído a partir do soro, plasma e/ou sangue total utilizando o *kit* comercial QIAamp Viral RNA Mini *kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O RNA viral obtido por esta metodologia foi armazenado em -70° C para posterior realização do diagnóstico molecular.

### **3.11 RT-PCR em tempo real (qRT-PCR) para detecção de CHIKV**

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do CHIKV foi realizada em microplaca óptica (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (2007). Neste procedimento, 5µl de RNA foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo H<sup>2</sup>O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), os reagentes provenientes do PCR SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR *kit* (Invitrogen™, California, EUA), além das sondas e *primers* específicos

para este vírus (Quadro 3.4). A reação foi realizada em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 50°C por 30 min); ativação (1 ciclo de 95°C por 2 min); desnaturação (50 ciclos de 95° C por 15 sec) e anelamento/extensão (50 ciclos de 60°C por 1 min).

**Quadro 3.4:** Oligonucleotídeos utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do CHIKV (Lanciotti *et al.* 2007).

Primers/sonda	Sequência (5'-3')	Posição no genoma
CHIKV 874	AAAGGGCAAACCTCAGCTTCAC	874–894
CHIKV 961	GCCTGGGCTCATCGTTATTC	961–942
CHIKV 899-FAM	CGCTGTGATACAGTGGTTTCGTGTG	899–923

Outros protocolos de qRT-PCR provenientes de *kits* comerciais foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. O Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA) realizado em termociclador 3M Integrated Cycler (Focus Diagnostics, California, EUA) e o Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard *kit* (Genesig®, Inglaterra, Reino Unido) para quantificação dos casos confirmados de CHIKV através do princípio TaqMan®, realizado em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China).

### 3.12 RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV

A detecção e tipagem de amostras de DENV foi realizada a partir da metodologia de RT-PCR, descrita por Lanciotti *et al.* (1992), que utiliza uma reação *semi-nested* capaz de identificar simultaneamente os quatro sorotipos de dengue (D1-4) através de duas reações utilizando oligonucleotídeos iniciadores consensuais e específicos para cada sorotipo (Quadro 3.5).

**Quadro 3.5:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a tipagem dos vírus dengue (Lanciotti *et al.*, 1992).

Primers	Sequência (5'-3')	Posição no genoma	Tamanho do amplicon (pb)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161	511
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC	616-644	511
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1 e TS1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1 e TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1 e TS3)
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 (D1 e TS4)



Durante a primeira etapa, 5µl de RNA foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo H<sub>2</sub>O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), PCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), DTT (Sigma Aldrich, Missouri, EUA), AMV-RT (Promega, Wisconsin, EUA) e oligonucleotídeos iniciadores consensuais (D1 e D2) para os quatro sorotipos dos DENV. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp modelo 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 42°C por 60 min); desnaturação (30 ciclos de 94°C por 30 sec); hibridização (30 ciclos de 56°C por 1 min); extensão (30 ciclos de 72°C por 2 min); extensão final (1 ciclo de 72°C por 10 min) e temperatura final (4°C).

Em uma segunda etapa, o procedimento semi-*nested* foi realizado a partir da diluição de 5 µl do cDNA obtido na primeira etapa em 495 µl da água destilada UltraPure™ DNase/RNase Free (Invitrogen™, California, EUA). Em seguida, 5 µl do produto diluído foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo H<sub>2</sub>O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), PCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), DTT (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e os *primers* específicos TS1, TS2, TS3 e TS4 para cada sorotipo de dengue (D1-4), respectivamente. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp modelo 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: desnaturação (18 ciclos de 94°C por 30 sec); hibridização (18 ciclos de 56°C por 1 min); extensão (18 ciclos de 72°C por 2 min); extensão final (1 ciclo de 72°C por 10 min) e temperatura final (4°C). Por fim, a análise dos amplicons obtidos foi realizada por eletroforese em gel de agarose (1.5%).

O outro protocolo para detecção e tipagem de dengue foi utilizado neste estudo e consiste em uma transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção dos DENV realizada em microplaca óptica (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Johnson *et al.* (2005). Neste procedimento, 5µl de RNA foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo H<sub>2</sub>O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen™, California, EUA), além das sondas e *primers* específicos para este vírus (Quadro 3.6). A reação foi realizada em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 45°C por 30 min); ativação da enzima (1 ciclo de 95°C por 10 min); desnaturação (45 ciclos de 95°C por 15 sec);

anelamento/extensão (45 ciclo de 57°C por 1 min); extensão final (45 ciclo de 72°C por 1 min) e temperatura final (4°C).

**Quadro 3.6:** Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a detecção e tipagem dos DENV (Johnson *et al.*, 2005).

<i>Primers/Sondas</i>	Sequência (5'-3')	Posição no genoma
DEN-1 F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	8973
DENV-1 C	CTGAGTGAATTCTCTACTGAACC	9084
DENV-1 FAM/BHQ-1	CATGTGGTTGGGAGCACGC	8998
DENV-2 F	CAGGTTATGGCACTGTCACGAT	1605
DENV-2 C	CCATCTGCAGCAACACCATCTC	1583
DENV-2 HEX/BHQ-1	CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA	1008
DENV-3 F	GGACTGGACACACGCACTCA	740
DENV-3 C	CATGTCTCTACCTTCTCGACTTGTCT	813
DENV-3 TR/BHQ-2	ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG	762
DENV-4 F	TTGTCCTAATGATGCTGGTTCG	904
DENV-4 C	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	992
DENV-4 Cy5/BHQ-3	TTCCTACTCCTACGCATCGCATTCCG	960

### 3.13 RT-PCR para detecção do ZIKV

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do ZIKV foi realizada em microplaca óptica (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (2008). Neste procedimento, 5µl de RNA foi aplicado em 15 µl de uma mistura contendo H<sub>2</sub>O livre de nucleases (Promega, Wisconsin, EUA), GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin, EUA), além dos *primers* e sondas descritos no Quadro 3.7. A reação foi realizada em termociclador LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 45°C por 15 min); ativação (1 ciclo de 95°C por 2 min); desnaturação (45 ciclos de 95°C por 15 sec) e anelamento/extensão (45 ciclos de 60°C por 1 min).

**Quadro 3.7:** Oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a detecção do ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008).

<i>Primers/Sondas</i>	Sequência (5'-3')	Posição no genoma
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086–1102
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162–1139
ZIKV 1107-FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	1107–1137

### 3.14 RT-PCR para sequenciamento parcial (gene E1) do genoma do CHIKV

O sequenciamento parcial da região E1 do genoma do CHIKV foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Collao *et al.* (2010), que utiliza uma reação “*semi-nested*” a partir dos *primers* descritos no Quadro 3.8.

**Quadro 3.8:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) para a detecção do CHIKV (Collao *et al.*, 2010).

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	Posição no genoma (pb)
<i>Primer 1 (sense)</i>	TTACCCNTTYATGTGGGG	10246-10793
<i>Primer 2 (antisense)</i>	CTTACSGGGTTTGTYGC	
<i>Primer 3 (antisense)</i>	TRAAGCCAGATGGTGCC	10246-10714

Durante a primeira etapa, 5µl de RNA foi aplicado em 20 µl de uma mistura contendo os reagentes do QIAGEN OneStep RT-PCR *kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), além dos *primers* 1 e 2. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp modelo 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 50°C por 60 min); desnaturação inicial (1 ciclo de 95°C por 15 min); desnaturação (40 ciclos de 94°C por 30 sec); hibridização (40 ciclos de 60°C por 3 min); extensão (40 ciclos de 68°C por 30 sec); extensão final (1 ciclo de 68°C por 10 min) e temperatura Final (4°C).

Em uma segunda etapa, o procedimento *semi-nested* foi realizado a partir da adição de 0,5 µl do cDNA obtido na primeira etapa em 24,5 µl de uma mistura contendo H<sub>2</sub>O livre de nucleases (Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA), PCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA), DTT (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) e os *primers* 1 e 3. A reação foi realizada em termociclador GeneAmp modelo 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros de

termociclagem: desnaturaç o inicial (1 ciclo de 94 C por 2 min); desnaturaç o (40 ciclos de 95 C por 30 sec); hibridizaç o (40 ciclos de 55 C por 1 min); extens o (40 ciclo de 72 C por 30 sec); extens o final (1 ciclo de 72 C por 5 min) e temperatura Final (4 C).

### **3.15 Purifica o e quantifica o dos produtos do RT-PCR para sequenciamento parcial (gene E1) do genoma do CHIKV**

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose em concentra o de 1% corado com brometo de et dio e visualizados atrav s de luz ultravioleta. Ap s a observa o dos fragmentos amplificados, estes foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o *kit* comercial QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instru es do fabricante. Posteriormente, os produtos purificados foram quantificados pelo Low DNA Mass Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>, California, EUA) em gel de agarose em concentra o de 2% corado com brometo de et dio.

### **3.16 Rea o de sequenciamento**

Os fragmentos de cDNA purificados foram sequenciados em ambas as dire es utilizando o *kit* BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction vers o 3.1 (Applied Biosystems®, California, EUA) e a rea o foi realizada em termociclador GeneAmp modelo 9700 (Applied Biosystems, California, EUA) de acordo com os seguintes par metros de termociclagem: transcri o reversa (1 ciclo de 50 C por 60 min); desnatura o inicial (1 ciclo de 95 C por 15 min); desnatura o (40 ciclos de 94 C por 30 sec); hibridiza o (40 ciclos de 60 C por 3 min); extens o (40 ciclos de 68 C por 30 sec); extens o final (1 ciclo de 68 C por 10 min) e temperatura final (4 C).

Posteriormente, os produtos foram enviados para a Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ, onde passaram por purifica o pelo Centri-Sep Spin Columns (Invitrogen, California, EUA) ou o DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, California, EUA) e foram incubados a 37 C por 24h para secagem. Em seguida, o DNA foi ressuspendido em 10 L de formamida e transferido para uma placa de 96 orif cios (MicroAmpOptical 96 Well Reaction Plate - Applied

Biosystems®, California, EUA). Por fim, a reação foi realizada por eletroforese capilar em Analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems®, California, EUA).

### 3.17 Análise das Sequências e Filogenia

A análise do sequenciamento foi realizada pelo programa Chromas® 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>) ou pelo programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). A identidade da sequência foi determinada pelo uso do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento das sequências foi realizado pelo software CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e as árvores filogenéticas foram construídas pelo programa MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) com suporte do teste de *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) e utilizando o método *Neighbor-joining*, modelo Kimura-2 parâmetros (K2), obtido pelo software como melhor modelo de substituição baseado na Máxima Verossimilhança (MV). Sequências disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram utilizadas como referência para os diferentes genótipos do CHIKV (Asiático, ECSA e Oeste Africano), Quadro 3.9.

**Quadro 3.9:** Sequências disponíveis no GenBank utilizadas como referência para os diferentes genótipos do CHIKV (Asiático, ECSA e Oeste Africano).

Genótipo	Localidade/Ano	GenBank	Referência
Genótipo Asiático	Amapá/Brasil/2014	KP164567.1	Nunes <i>et al.</i> (2015)
	Pernambuco/Brasil/2014	KP164571.1	Nunes <i>et al.</i> (2015)
	Rio de Janeiro/Brasil/2015	KU355832.1	Conteville <i>et al.</i> (2016)
	Rio de Janeiro/Brasil/2014	KU355833.1	Conteville <i>et al.</i> (2016)
	Rio de Janeiro/Brasil/2014	KU355834.1	Conteville <i>et al.</i> (2016)
	Rio de Janeiro/Brasil/2014	KU355835.1	Conteville <i>et al.</i> (2016)
	Haiti/2014	KX702402.1	White <i>et al.</i> (2016)
	Indonésia/2010	AB678695.1	Mulyatno <i>et al.</i> (2012)
	China/2012	KC488650.1	Zhou (2013)
	Malásia/2006	FN295484.2	Sam (2009)
	Tailândia/1988	HM045789.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
Índia/1963	HM045813.1	Volk <i>et al.</i> (2010)	
Genótipo ECSA*	Angola/1962	HM045823.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
	Uganda/1982	HM045812.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
	República Centro-Africana/1978	HM045822.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
	Bahia/2014	KP164570.1	Nunes <i>et al.</i> (2015)
Genótipo Oeste Africano	Nigéria/1965	HM045807.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
	Senegal/2005	HM045817.1	Volk <i>et al.</i> (2010)
	Costa do Marfim/1993	HM045820.1	Volk <i>et al.</i> (2010)

\*ECSA: genótipo Leste-Centro-Sul Africano.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Norte do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014-2015 no Amapá (AP)

Para a investigação de casos suspeitos da infecção por CHIKV na região Norte do Brasil, 538 amostras biológicas provenientes de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 no estado do Amapá (AP) foram coletadas a partir de um trabalho de campo realizado durante o período de 17 a 27 de maio como parte de colaboração estabelecida com o Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN/AP) e o Laboratório de Fronteira de Oiapoque (LAFRON/AP). Destas, um total de 208/538 (38.66%) provenientes de algumas localidades do estado (Figura 4.1) foram separadas para a realização deste estudo. Os casos foram divididos em 100 amostras agudas ( $\leq 7$  dias após do início dos sintomas) selecionadas para o diagnóstico molecular e 108 amostras convalescentes ( $> 7$  dias após o início dos sintomas) destinadas ao diagnóstico sorológico.



**Figura 4.1:** Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=208$ ) selecionados para a investigação desta infecção na região Norte do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 no estado do Amapá (AP).

#### 4.1.1 Aspectos clínico-epidemiológicos

Do total de casos suspeitos agudos e convalescentes selecionados para a investigação de chikungunya no AP ( $n=208$ ), 107/208 (51.44%) foram confirmados por metodologias sorológicas e/ou moleculares e, devido à disponibilidade de informações adicionais, estes foram caracterizados de acordo com a origem, sexo, faixa etária e frequência das manifestações clínicas apresentadas.

Todos os casos confirmados de chikungunya foram procedentes das cidades de Oiapoque (76/107; 71.02%), Macapá (27/107; 25.23%) e Porto Grande (4/107; 3.73%). Uma maior frequência da infecção foi observada em pacientes do sexo feminino (67/107; 62.61%) quando comparado ao sexo masculino (40/107; 37.38%).

A análise por faixa etária em 94/107 (87.85%) dos casos de chikungunya mostrou que os indivíduos maiores de 15 anos foram mais frequentemente acometidos (74/94; 78.72%) do que os menores de 15 anos (20/94; 21.27%). Especificamente, foi observado um maior número de casos confirmados em indivíduos com idade entre 16 e 20 anos (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** Frequência dos casos confirmados de chikungunya ( $n=94$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes no estado do Amapá (AP).

Faixa Etária (Anos)	Casos positivos / casos analisados (%)
0 a 5	4/94 (4.25)
6 a 10	7/94 (7.44)
11 a 15	9/94 (9.57)
16 a 20	15/94 (15.95)
21 a 25	4/94 (4.25)
26 a 30	9/94 (9.57)
31 a 35	8/94 (8.51)
36 a 40	8/94 (8.51)
41 a 45	9/94 (9.57)
46 a 50	9/94 (9.57)
51 a 55	5/94 (5.31)
56 a 60	3/94 (3.19)
61 a 65	3/94 (3.19)
>65	1/94 (1.06)

A análise de 87/107 (81.30%) dos casos de CHIKV demonstrou que todos os indivíduos relataram febre, que persistiu por mais de 8 dias em 14/87 (16.09%) dos casos. Dentre as demais manifestações clínicas apresentadas, artralgia, mialgia e

cefaleia foram as mais frequentemente relatadas pelos pacientes acometidos (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2:** Frequência de manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de chikungunya ( $n=87$ ) no Amapá (AP).

Manifestações clínicas	Frequência (%)
Febre	87/87 (100.0)
Artralgia	79/87 (90.80)
Cefaléia	70/87 (80.45)
Mialgia	58/87 (66.66)
Exantema	31/87 (35.63)
Vômito	16/87 (18.39)
Febre Persistente (+ 8 dias)	14/87 (16.09)
Petéquias/Hematomas	14/87 (16.09)
Edema	12/87 (13.79)
Diarréia	8/87 (9.19)
Dor retro-orbital	8/87 (9.19)
Dor abdominal	3/87 (3.44)
Tosse	4/87 (4.59)
Gânglios Palpáveis	1/87 (1.14)
Icterícia	1/87 (1.14)

#### 4.1.2 Casos agudos

##### 4.1.2.1 Testes laboratoriais realizados

Um total de 100 casos agudos ( $\leq 7$  dias após do início dos sintomas) selecionados para este estudo foram submetidos ao diagnóstico laboratorial molecular da infecção por CHIKV através do RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007) e do *kit* comercial de RT-PCR em tempo real Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, USA). Destes, 53/100 (53%) foram confirmados por pelo menos 1 metodologia citada (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=53$ ) de acordo com as diferentes metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico laboratorial deste vírus.

Metodologia	Positivo/Testado (%)
RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	37/53 (69.81)
Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, USA)	47/53 (88.67)



Além disso, 22/53 (41.50%) e 31/53 (58.49%) dos casos de CHIKV foram confirmados por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas, respectivamente (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=53$ ) confirmados por apenas 1 ( $n=22$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=31$ ) das metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Positivo/Testado (%)
1	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	6/53 (11.32)
	Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, USA)	16/53 (30.18)
2	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	31/53 (58.49)
	Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, USA)	

Um total de 35/53 (66.03%) dos casos confirmados de CHIKV foram quantificados pelo Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard kit e os títulos virais nestas amostras variaram de  $1.01 \times 10^2$  cópias de RNA/ $\mu\text{L}$  a  $9.84 \times 10^3$  cópias de RNA/ $\mu\text{L}$ .

Excepcionalmente, 11/100 (11%) casos agudos no 6º e 7º dia de sintomas foram submetidos também aos testes sorológicos para detecção de IgM anti-CHIKV, e 4/11 (36.36%) apresentaram sorologia reagente. Destes, 2/4 (50%) já haviam sido confirmados pelas metodologias moleculares e 2/4 (50%) foram detectados apenas pela sorologia.

De uma forma geral, os resultados analisados demonstram que um total de 55/100 (55%) dos casos agudos ( $\leq 7$  dias após do início dos sintomas) provenientes do Amapá (AP) tiveram a infecção por CHIKV confirmada por metodologias moleculares e/ou sorológicas.

Como diagnóstico diferencial, todos os casos agudos suspeitos de CHIKV ( $n=100$ ) foram submetidos à confirmação ou exclusão da infecção por DENV pela RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV, que confirmou 10/100 (10%) casos, sendo 8/10 (80%) de DENV-1 e 2/10 (20%) de DENV-4.

Dentre os 11 casos agudos (até 7 dias de sintomas) submetidos aos testes sorológicos, 2/11 (18.18%) foram confirmados pelo *kit* Dengue NS1 Antigen DxSelect™ e pelo *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA e 3/11 (27.27%) apenas

pelo Panbio dengue IgM Capture ELISA. Destes, 2/11 (18.18%) já haviam sido confirmados como DENV-1 e DENV-4 pela RT-PCR.

Desta forma, um total de 13/100 (13%) casos agudos suspeitos de CHIKV foram confirmados como dengue por metodologias sorológicas e/ou moleculares (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5:** Distribuição dos casos agudos confirmados para DENV ( $n=13$ ) apenas por sorologia ( $n=3$ ), apenas por técnicas moleculares ( $n=8$ ) ou simultaneamente por metodologias moleculares e sorológicas ( $n=2$ ).

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Positivo/Testado (%)
1	RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)	8/13 (61.53)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	2/13 (15.38)
2	RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)	1/13 (7.69)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	
	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics)	1/13 (7.69)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	
3	RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)	1/13 (7.69)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	
	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics)	

#### 4.1.2.2 Co-infecções

Foi observado que 64/100 (64%) dos casos agudos foram confirmados para CHIKV e/ou DENV através de metodologias sorológicas e/ou moleculares. Destes, 4/64 (6.25%) foram considerados como co-infecções pelos dois arbovírus, sendo 1 de 4, 2 de 4 e 1 de 4 confirmadas por 2, 3 e 4 das metodologias sorológicas e/ou moleculares para o diagnóstico de CHIKV e DENV, respectivamente (Tabela 4.6). Os resultados demonstram ainda que 2 de 4 dos casos representam co-infecções por CHIKV e DENV-1 e 2 de 4 por CHIKV e DENV-4.

**Tabela 4.6:** Distribuição das co-infecções por CHIKV e DENV ( $n=4$ ) confirmadas por 2 ( $n=1$ ), 3 ( $n=2$ ) ou 4 ( $n=1$ ) das metodologias utilizadas para o diagnóstico destes arbovírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Positivo/Testado
2	B e E	1/4
3	C, E e G	1/4
	A, B e E	1/4
4	D, E, F e G	1/4

\* A: RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV; B: Simplexa™ CHIKV; C: ELISA de captura de IgM anti-CHIKV; D: Anti-CHIKV ELISA IgM; E: RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV; F: Dengue NS1 Antigen DxSelect™; G: Panbio dengue IgM Capture ELISA.

### 4.1.3 Casos convalescentes

#### 4.1.3.1 Testes laboratoriais realizados

Um total de 108 casos convalescentes (>7 dias após do início dos sintomas) selecionados para este estudo foram submetidos ao diagnóstico laboratorial sorológico para detecção de IgM anti-CHIKV através do ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Brasil/MS, 2014) ( $n=43$ ) e/ou do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) ( $n=79$ ). Dos casos testados, 52/108 (48.14%) foram reagentes por pelo menos 1 metodologia.

A Tabela 4.7 demonstra que 43/52 (82.69%) e 9/52 (17.30%) dos casos de CHIKV foram reagentes por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para a detecção de IgM anti-CHIKV, respectivamente.

**Tabela 4.7:** Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=52$ ) reagentes por apenas 1 ( $n=43$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=9$ ) das metodologias sorológicas de detecção de IgM anti-CHIKV utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Positivo/Testado (%)
1	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Ministério de Saúde, 2014)	19/52 (36.53)
	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).	24/52 (46.15)
2	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério de Saúde, 2014)	9/52 (17.30)
	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).	

Adicionalmente, os casos convalescentes ( $n=108$ ) foram submetidos ao *kit* Dengue NS1 Antigen DxSelect™ e ao *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA. Destes, um total de 44/108 (40.74%) foram reagentes para dengue, sendo 35/44 (79.54%) e 9/44 (20.45%) reagentes por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus, respectivamente (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8:** Distribuição dos casos convalescentes reagentes para DENV ( $n=44$ ) apenas por 1 ( $n=35$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=9$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificações das metodologias	Positivo/Testado(%)
1	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics)	8/44 (18.18)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	27/44 (61.36)
2	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics)	9/44 (20.45)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	

#### 4.1.3.2 Co-infecções

Nos casos convalescentes ( $n=108$ ), um total de 72/108 (66.66%) foram reagentes para DENV e/ou CHIKV por metodologias sorológicas e destes, 24/72 (33.33%) indicam possíveis co-infecções pelos dois arbovírus. Dentre estas, 15/24 (62.5%), 6/24 (25%) e 3/24 (12.5%) foram reagentes por 2, 3 e 4 das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico de CHIKV e DENV, respectivamente (Tabela 4.9).

**Tabela 4.9:** Distribuição das co-infecções por CHIKV e DENV ( $n=24$ ) reagentes por 2 ( $n=15$ ), 3 ( $n=6$ ) ou 4 ( $n=3$ ) das metodologias utilizadas o diagnóstico destes arbovírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Positivo/Testado (%)
2	A e C	3/24 (12.5)
	A e D	3/24 (12.5)
	B e C	1/24 (4.16)
	B e D	8/24 (33.33)
3	A, B e D	2/24 (8.33)
	A, C e D	3/24 (12.5)
	B, C e D	1/24 (4.16)
4	A, B, C e D	3/24 (12.5)

\* A: ELISA de captura de IgM anti-CHIKV; B: Anti-CHIKV ELISA IgM; C: Dengue NS1 Antigen DxSelect™; D: Panbio dengue IgM Capture ELISA.

## 4.2 Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Nordeste do Brasil a partir de uma epidemia ocorrida em 2014-2015 em Feira de Santana (BA)

Para a investigação de casos da infecção por CHIKV na região Nordeste do Brasil, 28 casos suspeitos de fase aguda ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) provenientes de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 na cidade de Feira de Santana (BA) foram recebidos por demanda espontânea no LABFLA (IOC/FIOCRUZ). Todas as amostras foram submetidas ao diagnóstico molecular e sorológico para este vírus (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=28$ ) recebidos por demanda espontânea no LABFLA (IOC/FIOCRUZ) a partir de uma epidemia ocorrida em 2014 e 2015 na cidade de Feira de Santana (BA), região Nordeste do Brasil.

#### 4.2.1 Aspectos clínico-epidemiológicos

A avaliação de aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos de CHIKV em Feira de Santana (BA) não foi possibilitada devido à ausência de informações adicionais nas fichas epidemiológicas dos pacientes recebidas pelo LABFLA (IOC/FIOCRUZ).

#### 4.2.2 Testes laboratoriais realizados

Todas as amostras de fase aguda ( $n=28$ ) obtidas foram submetidas ao diagnóstico laboratorial sorológico e molecular para a confirmação ou exclusão da infecção por CHIKV através do teste ELISA de captura de IgM anti-CHIKV, preconizado pelo Ministério de Saúde, Brasil, do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun) e do RT-PCR em tempo real. Destes, 24/28 (85.71%) foram confirmados por pelo menos 1 das metodologias, Tabela 4.10.

**Tabela 4.10:** Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=24$ ) de acordo com as diferentes metodologias sorológicas e moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Metodologia	Positivo/Testado (%)
ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Ministério de Saúde, 2014)	13/24 (54.16)
Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	11/24 (45.83)
RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	19/24 (79.16)

Além disso, 9/24 (37.5%), 11/24 (45.83%) e 4/24 (16.66%) dos casos de CHIKV foram confirmados por 1, 2 ou 3 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus, respectivamente (Tabela 4.11).

**Tabela 4.11:** Distribuição dos casos de CHIKV ( $n=24$ ) confirmados por 1 ( $n=9$ ), 2 ( $n=11$ ) ou 3 ( $n=4$ ) das metodologias moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Positivo/Testado (%)
1	A	5/24 (20.83)
	B	3/24 (12.5)
	C	1/24 (4.16)
2	A e B	5/24 (20.83)
	A e C	5/24 (20.83)
	B e C	1/24 (4.16)
3	A, B e C	4/24 (16.66)

\* A: RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007); B: ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério de Saúde, 2014); C: Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).

Dentre os 19 casos de CHIKV confirmados pela RT-PCR em tempo real, 11/19 (57.89%) foram selecionados aleatoriamente para quantificação. Os resultados demonstram que a quantificação variou de  $8.69 \times 10^1$  cópias de RNA/ $\mu$ l a  $1.04 \times 10^4$  cópias de RNA/ $\mu$ l.

Como diagnóstico diferencial, todos os casos suspeitos de CHIKV ( $n=28$ ) foram submetidos a metodologias sorológicas e moleculares para a confirmação ou exclusão de dengue. Destes, 14/28 (50%) foram reagentes por pelo menos 1 das metodologias sorológicas, enquanto que o RT-PCR não confirmou nenhum caso, (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12:** Distribuição dos casos de DENV ( $n=14$ ) reagentes por apenas 1 ( $n=13$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=1$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Reativo/Testado (%)
1	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	13/14 (92.85)
2	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, Califórnia, EUA)	1/14 (7.14)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	

#### 4.2.3 Co-infecções

Os resultados demonstraram que 26/28 (92.85%) dos casos suspeitos analisados foram confirmados para CHIKV e/ou DENV através de metodologias sorológicas e/ou moleculares. Destas, 12/26 (46.15%) foram consideradas como co-infecções pelos dois arbovírus

Dentre as co-infecções por CHIKV e DENV ( $n=12$ ), 4/12 (33.33%), 6/12 (50%), 2/12 (16.66%) foram confirmadas por 2, 3 e 4 das metodologias utilizadas para o diagnóstico destes arbovírus (Tabela 4.13).

**Tabela 4.13:** Diagnóstico laboratorial diferencial para investigação dos casos de co-infecções pelos arbovírus DENV e CHIKV coletados durante a epidemia ocorrida em Feira de Santana, BA, 2015.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Percentual (%)
2	A e E	1/12 (8.33)
	B e E	2/12 (16.66)
	C e E	1/12 (8.33)
3	A, B e E	4/12 (33.33)
	A, C e E	2/12 (16.66)
4	A, B, C e E	1/12 (8.33)
	A, C, D e E	1/12 (8.33)

\* A: RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV; B: ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério de Saúde, 2014); C: Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun); D: Dengue NS1 Antigen DxSelect™ e E: Panbio dengue IgM Capture ELISA.

#### **4.3 Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Centro-Oeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade de Campo Grande (MS)**

Para a investigação de casos suspeitos da infecção por DENV, ZIKV e CHIKV na região Centro-Oeste do Brasil, um total de 134 amostras foram coletadas em um trabalho de campo realizado na cidade de Campo Grande (MS) durante o período de 16 de fevereiro a 05 de março de 2016 como parte de colaboração estabelecida com a Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS, Campo Grande, MS), com o Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha (UFMS e FIOCRUZ/MS) e com a Dra. Márcia Dal Fabbro da UPA Coronel Antonino (Figura 4.3). Destas, 119/134 (88.80%) foram classificadas como amostras agudas ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) e 15/134 (11.19%) como amostras convalescentes ( $> 7$  dias após o início dos sintomas), sendo todas estas submetidas ao diagnóstico molecular e sorológico para este vírus.





**Figura 4.3:** Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=134$ ) a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade de Campo Grande (MS), região Centro-Oeste do Brasil.

#### 4.3.1 Critérios clínico-epidemiológicos

Todos os casos confirmados de chikungunya ( $n=7$ ) provenientes de Campo Grande (MS) foram caracterizados de acordo com a origem, sexo, faixa etária e frequência das manifestações clínicas nos pacientes. Os casos foram procedentes dos bairros Bosque Avilan ( $n=1$ ), Coronel Antonino ( $n=1$ ), Jardim Maria Amélia ( $n=1$ ), Mata do Jacinto ( $n=1$ ), Monte Castelo ( $n=2$ ) e Morada Verde ( $n=1$ ). Dos sete casos, 3 ocorreram em pacientes do sexo feminino e 4, do sexo masculino.

De acordo com a faixa etária, todos os casos analisados neste estudo apresentavam idade acima de 15 anos, sendo que a frequência de confirmação do CHIKV foi igualmente distribuída entre as diferentes faixas etárias (Tabela 4.14).

**Tabela 4.14:** Frequência de casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes na cidade de Campo Grande (MS).

Faixa etária (Anos)	Casos confirmados de CHIKV (%)
16 a 20	2/7 (28.57)
21 a 25	2/7 (28.57)
46 a 50	1/7 (14.28)
51 a 55	1/7 (14.28)
56 a 60	1/7 (14.28)

Com relação à frequência de manifestações clínicas nos casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ), os resultados demonstram que artralgia, cefaléia, dor retro-orbitária, febre, mialgia e prostração destacam-se entre os sinais ou sintomas mais frequentes da doença (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15:** Frequência das manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) na cidade de Campo Grande (MS).

Manifestações clínicas	Frequência (%)
Dor retro-orbitária	7/7 (100)
Artralgia	6/7 (85.71)
Cefaléia	6/7 (85.71)
Mialgia	6/7 (85.71)
Prostração	6/7 (85.71)
Febre	5/7 (71.42)
Anorexia	4/7 (57.14)
Lombalgia	4/7 (57.14)
Hiperemia conjuntival	3/7 (42.85)
Náusea	3/7 (42.85)
Tontura/Vertigem	3/7 (42.85)
Exantema	2/7 (28.57)
Parestesia	2/7 (28.57)
Prurido	2/7 (28.57)
Tosse	2/7 (28.57)
Astenia	1/7 (14.28)
Dor abdominal	1/7 (14.28)
Edema	1/7 (14.28)

### 4.3.2 Testes laboratoriais realizados

Como diagnóstico diferencial, inicialmente, todos os casos suspeitos de DENV e/ou ZIKV ( $n=134$ ) foram submetidos às seguintes metodologias sorológicas e/ou moleculares para a confirmação ou exclusão de dengue e zika: 1) ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA,; 2) Panbio dengue IgM Capture ELISA; 3) Dengue Virus IgM Capture DxSelect™; 4) RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV; 5) Simplexa™ dengue; 6) RT-PCR em tempo real para detecção de DENV e 7) RT-PCR em tempo real para detecção de ZIKV .

Destes, 99/134 (73.88%) foram confirmados para DENV por pelo menos 1 das metodologias sorológicas e/ou moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus e 38/134 (28.35%) foram confirmadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR utilizada. Com relação aos casos de DENV ( $n=99$ ), 37/99 (37.37%), 40/99 (40.40%), 13/99 (13.13%), 7/99 (7.07%) e 2/99 (2.02%) foram confirmados por 1, 2, 3, 4 e 5 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus, respectivamente (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16:** Distribuição dos casos de DENV ( $n=99$ ) confirmados por 1 ( $n=37$ ), 2 ( $n=40$ ), 3 ( $n=13$ ), 4 ( $n=7$ ) ou 5 ( $n=2$ ) das metodologias moleculares e/ou sorológicas utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Positivo/Testado (%)
1	A	1/99 (1.01)
	B	1/99 (1.01)
	C	20/99 (20.20)
	D	8/99 (8.08)
	E	7/99 (7.07)
2	A e D	14/99 (14.14)
	B e C	17/99 (17.17)
	C e D	5/99 (5.05)
	C e E	1/99 (1.01)
	D e E	3/99 (3.03)
3	B; C e E	2/99 (2.02)
	B; C e D	3/99 (3.03)
	A, D e E	4/99 (4.04)
	C; D e E	4/99 (4.04)
4	B; C; D e E	7/99 (7.07)
5	B; C; D; E e F	2/99 (2.02)

\* A: RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992); B: PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005); C: Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA); D: ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA); E: Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA); F: Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália).

Os resultados demonstraram que dentre as 134 amostras testadas pela RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV, 19/134 (14.17%) foram identificadas como DENV-1. Utilizando o *kit* RT-PCR em Tempo Real Simplexa™ dengue, 112/134 (83.58%) foram testadas e dentre os casos confirmados ( $n=61$ ), 60/61 (98.36%) foram identificados como DENV-1 e 1/61 (1.63%) como DENV-4. A RT-PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005) em 59/134 (44.02%) dos casos, confirmou 32 casos e, 31/32 (96.87%) foram identificados como DENV-1 e 1/32 (3.12%) como DENV-4.

Todos os casos ( $n=134$ ) foram submetidos ao diagnóstico laboratorial sorológico e molecular para a confirmação ou exclusão da infecção por CHIKV através do teste ELISA de captura de IgM anti-CHIKV, do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun) e do RT-PCR em tempo real.

Os resultados demonstram uma evidência sorológica da infecção por este vírus em 7/134 (5.22%) dos casos testados possuindo entre 3 e 6 dias de doença, sendo 5/7 (71.42%) reagentes pelo ELISA de captura de IgM anti-CHIKV e 6/7 (85.71%) pelo *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun). O diagnóstico molecular não confirmou nenhum caso de infecção por CHIKV.

Destes, 3/7 (42.85%) e 4/7 (57.14%) foram confirmados por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para o diagnóstico sorológico, respectivamente (Tabela 4.17).

**Tabela 4.17:** Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=7$ ) por apenas 1 ( $n=3$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=4$ ) das metodologias sorológicas utilizadas para o diagnóstico.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Reativo/Testado (%)
1	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (Ministério de Saúde, 2014)	1/7 (14.28)
	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	2/7 (28.57)
2	ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério de Saúde, 2014)	4/7 (57.14)
	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	

### 4.3.3 Co-infecções

Após análise dos resultados obtidos, foi observado que 111/134 (82.83%) dos casos suspeitos foram confirmados para CHIKV e/ou DENV e/ou ZIKV. Destes, 33/111 (29.72%) foram caracterizados como co-infecções, sendo 3/33 (9.09%) entre CHIKV e DENV, 1/33 (3.03%) entre CHIKV, DENV e ZIKV e 29/33 (87.87%) entre DENV e ZIKV.

Dentre as co-infecções, 13/33 (39.39%), 12/33 (36.36%), 4/33 (12.12%), 1/33 (3.03%), 2/33 (6.06%) e 1/33 (3.03%) foram confirmadas simultaneamente por 2, 3, 4, 5, 6, e 8 das metodologias utilizadas para o diagnóstico de CHIKV, DENV e ZIKV, respectivamente (Tabela 4.18).

**Tabela 4.18:** Diagnóstico laboratorial diferencial para investigação dos casos de co-infecções ( $n=33$ ) pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados durante a tríplice epidemia em Campo Grande, MS, 2016.

Co-Infecção ( $n$ )	Metodologias confirmadas*	Positivo/Testado (%)
CHIKV e DENV ( $n=3$ )	A; B e G	1/33 (3.03)
	A; B; C e F	1/33 (3.03)
	A; D; E; F e G	1/33 (3.03)
CHIKV, DENV e ZIKV ( $n=1$ )	A; B; D; E; F; G; H e I	1/33 (3.03)
DENV e ZIKV ( $n=29$ )	E e I	9/33 (27.27)
	F e I	2/33 (6.06)
	G e I	2/33 (6.06)
	D; E e I	5/33 (15.15)
	E; F e I	2/33 (6.06)
	C; F e I	4/33 (12.12)
	E; G; F e I	1/33 (3.03)
	D; E; G e I	1/33 (3.03)
	D; E; F e I	1/33 (3.03)
	D; E; F; G; H e I	2/33 (6.06)

\* A: ELISA de captura de IgM anti-CHIKV (CDC e Ministério de Saúde, 2014); B: Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha); C: RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992); D: PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005); E: Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA); F: ELISA Platelina™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA); G: Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA); H: Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália); I: RT-PCR em tempo real para detecção de ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008).

Dentre as co-infecções entre CHIKV e DENV, 1/3 (33.33%) foi confirmada como CHIKV e DENV-1 pela RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992) e 1/3 (33.33%) como CHIKV e DENV-1 pelo PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005) e pelo Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA). Com relação à co-infecção entre CHIKV, DENV e ZIKV, o DENV-1 também foi confirmado pela PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005) e pelo Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA). Dentre as co-infecções entre DENV e ZIKV, 9/29 (31.03%) foram confirmadas como DENV-1 pelo DENV (Johnson *et al.*, 2005) e pelo Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA), 12/29 (41.37%) como DENV-1 pelo Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA) e 4/29 (13.79%) como DENV-1 pela RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992).

#### **4.4 Investigação de casos suspeitos da infecção pelo CHIKV na região Sudeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade do Rio de Janeiro (RJ)**

Para a investigação de casos da infecção por CHIKV na região Sudeste do Brasil, casos suspeitos ( $n=91$ ) foram coletados em um trabalho de campo realizado na cidade do Rio de Janeiro (Figura 4.4) durante o período de 01 de abril a 15 de maio de 2016 e parte desta amostragem ( $n=74$ ) foi obtida em colaboração estabelecida com o Hospital Rio Laranjeiras (HRL) e com o Dr. Paulo Damasco. Destes, 72/91 (79.12%) foram classificados como casos agudos ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) e 19/91 (20.87%) como casos convalescentes ( $>7$  dias após o início dos sintomas).



**Figura 4.4:** Procedência dos casos suspeitos da infecção pelo CHIKV ( $n=91$ ) selecionados para a investigação desta infecção na região Sudeste do Brasil a partir de uma tríplice epidemia de arboviroses ocorrida em 2016 na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

#### 4.4.1 Aspectos clínico-epidemiológicos

Foi possível estabelecer a procedência de 56/70 (80%) dos casos confirmados de CHIKV ocorridos na cidade do Rio de Janeiro e analisados nesta casuística.

Os resultados demonstram que o maior percentual de casos foi identificado nos bairros do Catete, Glória e Laranjeiras, bairros próximos a um dos maiores pontos de coleta, Hospital Rio Laranjeiras, Tabela 4.19.

**Tabela 4.19:** Distribuição dos casos confirmados da infecção pelo CHIKV ( $n=56$ ) de acordo com o bairro na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

Procedência	Casos confirmados de CHIKV (%)
Laranjeiras	5/56 (8.92)
Catete	4/56 (7.14)
Glória	4/56 (7.14)
Catumbi	3/56 (5.35)
Centro	3/56 (5.35)
Pavuna	3/56 (5.35)
Bangu	2/56 (3.57)
Botafogo	2/56 (3.57)
Flamengo	2/56 (3.57)
Olaria	2/56 (3.57)
Santa Tereza	2/56 (3.57)
Santo Cristo	2/56 (3.57)
Tijuca	2/56 (3.57)
Belford Roxo	1/56 (1.78)
Bonsucesso	1/56 (1.78)
Colégio	1/56 (1.78)
Copacabana	1/56 (1.78)
Duque de Caxias	1/56 (1.78)
Estácio	1/56 (1.78)
Inhaúma	1/56 (1.78)
Itaboraí	1/56 (1.78)
Maria da Graça	1/56 (1.78)
Mesquita	1/56 (1.78)
Nilópolis	1/56 (1.78)
Nova Iguaçu	1/56 (1.78)
Pilares	1/56 (1.78)
Rio Comprido	1/56 (1.78)
Rocha Miranda	1/56 (1.78)
São Cristóvão	1/56 (1.78)
São João do Meriti	1/56 (1.78)
Sepetiba	1/56 (1.78)
Vaz Lobo	1/56 (1.78)
Vila Norma	1/56 (1.78)

Nesta casuística, pacientes do sexo feminino foram mais acometidos do que do sexo masculino (34/56; 60.71% e 22/56; 39.28, respectivamente).



Todos os casos analisados neste estudo apresentavam idade acima de 15 anos, sendo que a frequência de confirmação do CHIKV foi elevada em indivíduos com idade entre 26 a 30 (23.21%), seguido de 41 a 45 (14.28%) e 51 a 55 (12.5%), Tabela 4.20.

**Tabela 4.20:** Frequência de casos confirmados de CHIKV ( $n=56$ ) de acordo com a faixa etária dos pacientes na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

Faixa Etária (Anos)	Casos confirmados de CHIKV (%)
16 a 20	2/56 (3.57)
21 a 25	3/56 (5.35)
26 a 30	13/56 (23.21)
31 a 35	4/56 (7.14)
36 a 40	3/56 (5.35)
41 a 45	8/56 (14.28)
46 a 50	5/56 (8.92)
51 a 55	7/56 (12.5)
56 a 60	5/56 (8.92)
61 a 65	3/56 (5.35)
>65	3/56 (5.35)

Com relação à frequência de manifestações clínicas nos casos confirmados de CHIKV ( $n=56$ ), os resultados demonstram que artralgia, cefaléia, febre, mialgia e prostração destacam-se entre os sinais ou sintomas mais frequentes da doença (Tabela 4.21).

**Tabela 4.21:** Frequência das manifestações clínicas apresentadas pelos casos confirmados de CHIKV ( $n=56$ ) na cidade do Rio de Janeiro (RJ).

Manifestações clínicas	Frequência (%)
Artralgia	52/56 (92.85)
Febre	52/56 (92.85)
Cefaléia	49/56 (87.50)
Mialgia	49/56 (87.50)
Prostração	47/56 (83.92)
Calafrios	44/56 (78.57)
Anorexia	38/56 (67.85)
Lombalgia	35/56 (62.50)
Exantema	32/56 (57.14)
Edema	30/56 (53.57)
Prurido	28/56 (50.00)
Dor retro-orbitária	26/56 (46.42)
Náusea	26/56 (46.42)
Hiperemia conjuntival	24/56 (42.85)
Tontura/Vertigem	18/56 (32.14)
Dor de garganta	13/56 (23.51)
Adenomegalia	12/56 (21.42)
Coriza	10/56 (17.85)
Dor abdominal	9/56 (16.07)
Vômito	9/56 (16.07)
Epigastralgia	3/56 (5.35)
Tosse	3/56 (5.35)

#### **4.4.2 Testes laboratoriais realizados**

Todas as amostras biológicas coletadas ( $n=91$ ) foram submetidas ao diagnóstico laboratorial sorológico e molecular para a confirmação ou exclusão da infecção por CHIKV através do *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) e do RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007). Os resultados demonstram que 70/91 (76.92%) dos casos testados laboratorialmente tiveram a infecção por CHIKV confirmada por pelo menos 1 das metodologias utilizadas.

A RT-PCR em tempo real confirmou 50/70 (71.42%) casos de CHIKV com até 8 dias após o início dos sintomas e 9/70 (12.85%) casos acima de 10 dias após o

início dos sintomas, sendo 6/9 (66.66%) entre 10 e 15 dias de doença, 2/9 (22.22%) entre 20 e 25 dias e curiosamente, 1/9 (11.11%) com 71 dias de doença. O *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM confirmou apenas casos de CHIKV acima de 4 dias após o início dos sintomas,

A tabela 4.22 demonstra a distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=70$ ) de acordo com as diferentes metodologias moleculares e sorológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial.

**Tabela 4.22:** Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=70$ ) de acordo com as diferentes metodologias utilizadas para o diagnóstico laboratorial.

Metodologia	Positivo/Testado (%)
Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	34/70 (48.57)
RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	59/70 (84.28)

Além disso, 47/70 (67.14%) e 23/70 (32.85%) dos casos de CHIKV foram confirmados por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus, respectivamente (Tabela 4.23).

**Tabela 4.23:** Distribuição dos casos confirmados de CHIKV ( $n=70$ ) por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias	Positivo/Testado (%)
1	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	11/70 (15.71)
	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	36/70 (51.42)
2	Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha)	23/70 (35.85)
	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti <i>et al.</i> , 2007)	

Dentre os 59 casos de CHIKV confirmados pela RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007), 22/59 (37.28%) foram selecionados aleatoriamente e quantificados pelo Chikungunya Non Structural Protein 2 (NSP2) Standard *Kit* (Genesig®). A quantificação viral variou de  $1.07 \times 10^0$  a  $9.51 \times 10^0$  cópias de RNA/ $\mu$ l.

Como diagnóstico diferencial, todos os casos suspeitos de CHIKV ( $n=91$ ) foram submetidos às seguintes metodologias sorológicas e/ou moleculares para

confirmação ou exclusão de dengue e zika: 1) Dengue NS1 Antigen DxSelect™; 2) Panbio dengue IgM Capture ELISA; 3) RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992); 4) Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics); 5) RT-PCR em tempo real (Johnson *et al.*, 2005) e 6) RT-PCR em tempo real para detecção de ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008).

Destes, 17/91 (18.68%) foram confirmados para DENV por pelo menos 1 das metodologias sorológicas e/ou moleculares utilizadas para o diagnóstico deste vírus e 25/91 (27.47%) foram confirmadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR utilizada.

Com relação aos casos de DENV ( $n=17$ ), 15/17 (88.23%) e 2/17 (11.76%) foram confirmados por apenas 1 ou simultaneamente por 2 das metodologias utilizadas para o diagnóstico deste vírus (Tabela 4.24). Nenhum caso foi detectado pela RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992).

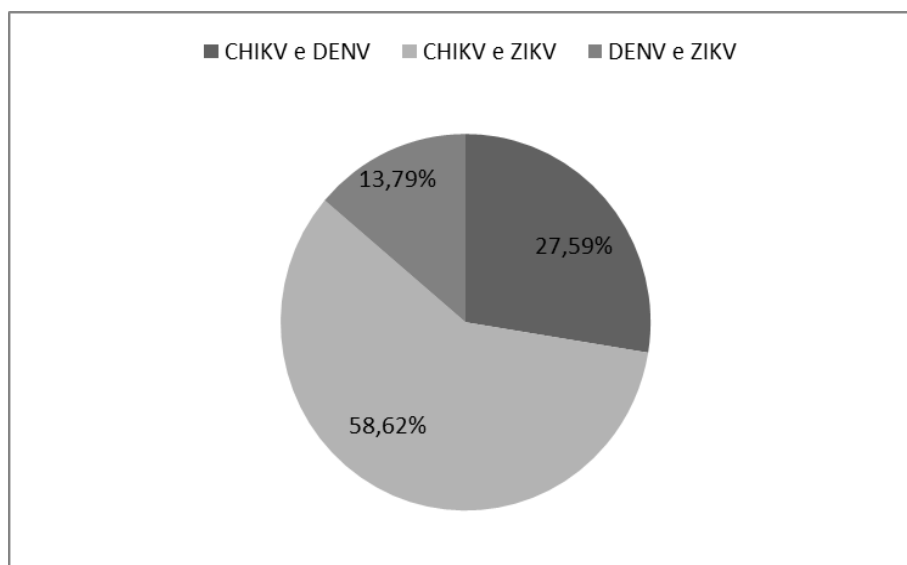
**Tabela 4.24:** Distribuição dos casos de DENV ( $n=17$ ) confirmados por 1 ( $n=15$ ) ou simultaneamente por 2 ( $n=2$ ) das metodologias moleculares e/ou sorológicas utilizadas para o diagnóstico laboratorial.

Nº de metodologias	Especificação das metodologias*	Positivo/Testado (%)
1	Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA)	3/17 (17.64)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	12/17 (70.58)
2	Dengue NS1 Antigen DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)	1/17 (5.88)
	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)	
	Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics, California, EUA)	1/17 (5.88)
	RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Johnson <i>et al.</i> , 2005)	

Os casos de DENV confirmados pelo *kit* Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics) ( $n=4$ ) foram identificados como pertencentes ao sorotipo DENV-4. Destes, um total de 1/4 (25%) também foi detectado como DENV-4 pelo protocolo de RT-PCR em tempo real estabelecido por Johnson *et al.* (2005).

#### 4.4.3 Co-infecções

Após análise dos resultados obtidos, foi observado que 83/91 (91.20%) dos casos suspeitos analisados foram confirmados para CHIKV e/ou DENV e/ou ZIKV. Destes, 29/83 (34.93%) foram identificadas como possíveis co-infecções, sendo 8/29 (27.58%) por CHIKV e DENV, 17/29 (58.62%) por CHIKV e ZIKV e 4/29 (13.79%) por DENV e ZIKV, Figura 4.5.



**Figura 4.5:** Percentual de co-infecções ( $n=29$ ) entre CHIKV e DENV ( $n=8$ ), CHIKV e ZIKV ( $n=17$ ) e DENV e ZIKV ( $n=4$ ) provenientes da tríplice epidemia ocorrida na cidade do Rio de Janeiro (RJ) em 2016.

Dentre as co-infecções, 25/29 (86.20%) e 4/29 (13.79%) foram confirmadas simultaneamente por 2 ou 3 das metodologias utilizadas para o diagnóstico de CHIKV, DENV e ZIKV, respectivamente (Tabela 4.25).

**Tabela 4.25:** Diagnóstico laboratorial diferencial para a investigação dos casos de co-infecções ( $n=29$ ) pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV coletados durante a tríplice epidemia no Rio de Janeiro, RJ, 2016.

Co-infecção ( $n$ )	Metodologias confirmadas*	Percentual (%)
CHIKV e DENV ( $n=8$ )	A, B e E	1/29 (3.44)
	A e E	2/29 (6.89)
	A e G	4/29 (13.79)
	B e G	1/29 (3.44)
CHIKV e ZIKV ( $n=17$ )	A, B e H	2/29 (6.89)
	A e H	14/29 (48.27)
	B e H	1/29 (3.44)
DENV e ZIKV ( $n=4$ )	F, G e H	1/29 (3.44)
	E e H	1/29 (3.44)
	G e H	2/29 (6.89)

\* A: RT-PCR em tempo real para detecção de CHIKV (Lanciotti *et al.*, 2007); B: Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck); C: RT-PCR para detecção e tipagem dos DENV (Lanciotti *et al.*, 1992); D: PCR em tempo real para detecção de DENV (Johnson *et al.*, 2005); E: Simplexa™ dengue (Focus Diagnostics); F: ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories) G: Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™) e H: RT-PCR em tempo real para detecção de ZIKV (Lanciotti *et al.*, 2008).

#### **4.5 Análise filogenética e caracterização molecular de cepas de CHIKV representativas do Amapá (AP) e Rio de Janeiro (RJ).**

A análise filogenética foi possibilitada através da recuperação de 372 nucleotídeos provenientes do sequenciamento parcial do gene E1 de cepas representativas de CHIKV detectadas em pacientes infectados durante as epidemias ocorridas no RJ ( $n=10$ ) em 2016 e no AP ( $n=17$ ) durante 2014-2015. Foram utilizadas sequências de referência disponíveis no Genbank para a representação dos genótipos Asiático, ECSA e Oeste Africano. Após análise comparativa, os resultados demonstram que todas as cepas provenientes do AP se encontram agrupadas no ramo do genótipo Asiático, enquanto as do RJ se agrupam no ramo do genótipo ECSA, juntamente com a sequência de uma amostra identificada na Bahia em 2014 (Figura 4.6). As sequências deste estudo foram depositadas no GenBank com número de acesso KX966400 a KX966409.



**Figura 4.6:** Análise filogenética baseada em 372 nucleotídeos recuperados do gene E1 de linhagens de CHIKV identificadas no Rio de Janeiro ( $n=10$ ) durante 2016 e no Amapá ( $n=17$ ). Método *Neighbor-Joining*, modelo *Kimura-2-parâmetros* (K2), *bootstrap* de 1.000 repetições. As sequências de CHIKV analisadas estão representadas com um círculo preto. As estirpes de CHIKV foram designadas da seguinte forma: Número de acesso do GenBank (ou nome da cepa/país/ano). ECSA: genótipo Leste-Centro-Sul Africano.

Adicionalmente, a caracterização molecular foi realizada e nenhuma diferença de aminoácidos foi observada nas cepas do AP. Apesar disso, a análise parcial do fragmento E1 das cepas do RJ não demonstrou a mutação A226V, revelando que o aminoácido alanina se encontra presente na posição E226. Curiosamente, uma substituição de aminoácidos K211T foi identificada em todas as amostras analisadas e uma substituição V156A foi identificada em duas amostras deste estudo. É importante observar que as sequências de CHIKV identificadas na BA pertencentes ao genótipo ECSA não mostraram esta substituição no aminoácido 211, havendo assim uma lisina (K), que também é observada na sequência de referência proveniente da Angola (1962), Quadro 4.1.

**Quadro 4.1:** Substituições de aminoácidos\* nas cepas de CHIKV provenientes de uma epidemia ocorrida no Rio de Janeiro (RJ) em 2016 com base na análise parcial do gene do envelope (E1) e comparação com cepas de referência obtidas no Genbank.

Cepas**	Posição de aminoácidos (aa) no gene E1		
	156	211	226
1. HM045823/Angola/1962	V	K	A
2. KP164570.1/BR/BA/2014	*	*	*
3. ASR24/BR/RJ/2016	A	T	*
4. EFSG07/BR/RJ/2016	A	T	*
5. EMC18/BR/RJ/2016	*	T	*
6. GP18/BR/RJ/2016	*	T	*
7. JOM22/BR/RJ/2016	*	T	*
8. LATC25/BR/RJ/2016	*	T	*
9. LCSS29/BR/RJ/2016	*	T	*
10. MMT16/BR/RJ/2016	*	T	*
11. SHCV30/BR/RJ/2016	*	T	*
12. SMSG20/BR/RJ/2016	*	T	*

\* Legenda dos aminoácidos: A: alanina; K: lisina; T: treonina; V: valina.

\*\* Amostra 1 (Cepa referência do genótipo ECSA – Angola/1962), 2 (Cepa referência do genótipo ECSA – BA/2014), 3-12 (Amostras analisadas nesse estudo pertencentes ao ECSA – RJ/2016).



## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou a investigação dos casos suspeitos de CHIKV no Brasil a partir da coleta de amostras de soro, plasma e/ou sangue total de fase aguda ( $\leq 7$  dias após o início dos sintomas) ou convalescente ( $> 7$  dias após o início dos sintomas) provenientes de pacientes em qualquer faixa etária e qualquer sexo que experimentaram uma doença febril acompanhada de intensa poliartralgia de acordo com o Ministério da Saúde (2014) atendidos durante surtos deste vírus ocorridos em cidades representativas das regiões Norte (Amapá, AP) e Nordeste (Feira de Santana, BA) durante 2014 e 2015, além da Centro-Oeste (Campo Grande, MS) e Sudeste (Rio de Janeiro, RJ) do país em 2016.

No AP, mais da metade dos casos agudos e convalescentes (107/208; 51.44%) analisados foram confirmados por metodologias moleculares e/ou sorológicas. Os 2 casos agudos entre 6 e 7 dias após o início dos sintomas confirmados apenas por sorologia comprovam a necessidade de uma combinação de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico da fase aguda do CHIKV, tendo em vista que estudos anteriores demonstram que anticorpos IgM anti-CHIKV podem ser detectados a partir de 2 dias de doença (Pialoux *et al.*, 2007, Mohan *et al.*, 2010).

Do total de casos de CHIKV no AP, a maioria provém da cidade de Oiapoque (27/107; 25.23%), o que corrobora com os dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), que registrou 789 casos nesta cidade somente até a Semana Epidemiológica 52 de 2015 (SVS/MS, 2016b), sendo que em todo o estado do AP foram notificados 865 casos até 2015 (SVS/MS, 2016a). Em razão da situação epidemiológica apresentada e diante do quadro de co-circulação de arbovírus (CHIKV e DENV) no Norte durante o período estudado, o estudo das epidemias ocorridas nesta região representa grande importância para o entendimento da dispersão do CHIKV pelo Brasil, tendo em vista que os primeiros casos do genótipo asiático deste vírus foram registrados em Setembro de 2014 na cidade de Oiapoque (Honório *et al.*, 2015, Nunes *et al.*, 2015).

Na BA, grande parte dos casos (24/28; 85.71%) analisados foram confirmados para CHIKV por metodologias moleculares e/ou sorológicas, sendo a maioria destes por RT-PCR, demonstrando a necessidade desta técnica no diagnóstico de casos agudos de CHIKV (Brasil/MS, 2014). Além disso, a importância da combinação de metodologias sorológicas e moleculares durante esta fase

também é demonstrada nesta região pela confirmação de casos desta infecção (11/24; 45.83%) por detecção simultânea de IgM anti-CHIKV e RNA viral.

Adicionalmente, o elevado número de casos deste vírus na BA corrobora com os dados publicados pela SVS (SVS/MS, 2016a) que registrou neste estado 17.453 casos de CHIKV em 2015, sendo 4.088 apenas na cidade de Feira de Santana (SVS/MS, 2016a). Em razão da situação epidemiológica apresentada e diante do quadro de co-circulação de arbovírus (CHIKV e DENV) no Nordeste durante o período estudado, o estudo das epidemias ocorridas nesta região representa grande importância para o entendimento da dispersão do CHIKV pelo Brasil, tendo em vista que os primeiros casos do genótipo ECSA deste vírus foram registrados em Setembro de 2014 na cidade de Feira de Santana (BA) (Honório *et al.*, 2015, Nunes *et al.*, 2015).

No MS, o presente estudo confirmou apenas por evidência sorológica um pequeno número de casos de CHIKV (7/134; 5.22%) entre 3 e 6 dias de doença, indicando um quadro epidêmico ainda em crescimento nesta região, o que corrobora com os dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS, 2016b) que registrou em Campo Grande 57 casos de CHIKV até a Semana Epidemiológica 52 de 2015 e 156 casos até a semana epidemiológica 37 de 2016 (SVS/MS, 2016a).

Os primeiros casos de ZIKV no Brasil em 2015 provocaram o surgimento de um quadro de tríplice epidemia de arbovírus causada pela co-circulação de CHIKV, DENV e ZIKV em alguns estados do país. Esta situação representa um grave problema de saúde pública devido ao comprometimento da eficiência do diagnóstico clínico e laboratorial para os profissionais da saúde em razão da sobreposição dos sinais clínicos e da indisponibilidade de testes confiáveis para o diagnóstico diferencial dos três vírus (Brasil *et al.*, 2016, Gautret & Simon, 2016).

No RJ, os resultados indicam que maioria das amostras coletadas foram confirmadas para CHIKV (70/91; 76.92%) por metodologias moleculares e/ou sorológicas, sendo que a maioria detectada por RT-PCR (50/70; 71.42%) apresentaram até 8 dias após o início dos sintomas. Apesar disso, o RNA viral do CHIKV também foi detectado em 18 amostras convalescentes acima de 10 dias após o início dos sintomas e curiosamente, uma destas foi coletada após 71 dias de doença. Em humanos, a persistência do RNA viral do CHIKV em macrófagos perivasculares do líquido sinovial de um paciente crônico foi demonstrada por até 18 meses após a infecção e isto pode ser justificado pela exaustão das células T devido à forte resposta imunológica durante a fase aguda, provocando como consequência

a persistência viral (Hoarau *et al.*, 2010). Em macacos, foi relatada a persistência do vírus em vários tecidos no 44º dia após a infecção e o RNA viral foi detectado em macrófagos 90 dias e 55 dias após a infecção (Labadie *et al.*, 2010). Outras pesquisas demonstram uma viremia longa em espécimes coletados a partir de 6 dias após o início dos sintomas (Riswari *et al.*, 2016) e persistência do RNA viral e/ou produtos genômicos após 17 dias de doença (Appassakij *et al.*, 2013). Em camundongos, estudos relatam a persistência do RNA viral deste vírus nas articulações por até 16 semanas (Hawman *et al.*, 2013). Em mosquitos *Ae. aegypti*, foi relatada a persistência do RNA viral por longos períodos, porém partículas infecciosas não foram detectadas (Mavale *et al.*, 2012, Wong *et al.*, 2016). Maiores estudos com humanos serão necessários para o esclarecimento de como e por quanto tempo o RNA viral do CHIKV persiste, além da sua relação com o sistema imune do paciente e a evolução clínica para artralgia crônica (Poo *et al.*, 2014b). Até o momento, é demonstrado que a persistência viral está diretamente associada à ineficácia imunológica e ao escape viral eficiente (Hoarau *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o elevado número de casos de CHIKV no RJ corrobora com os dados publicados durante a introdução deste vírus nesta cidade pela SVS, que registrou 13.571 casos no RJ até a semana epidemiológica 37 de 2016 (SVS/MS, 2016a). O primeiro caso importado de CHIKV no RJ foi descrito por Albuquerque *et al.*, (2012), que desde então atentou para uma possível introdução deste vírus no país devido à caracterização do território brasileiro como uma área de elevado risco para o surgimento de doenças causadas por arbovírus devido a alta infestação dos mosquitos vetores em todo o território nacional.

Com relação à região e ao bairro de origem dos pacientes confirmados para CHIKV, os resultados indicam uma prevalência de casos na Zona Sul (32.14%) da cidade do RJ, seguido do Centro (23.21%), Zona Norte (25%), Região Metropolitana (14.28%) e Zona Oeste (5.35%). Além disso, o maior percentual de casos se encontra nos bairros do Catete, Glória e Laranjeiras, o que provavelmente se justifica pelo hospital Rio Laranjeiras, localizado na zona Sul da cidade, que foi o principal local onde as coletas de amostras biológicas foram realizadas para este estudo nesta região.

Todas as amostras de fase aguda provenientes do AP, BA e RJ foram quantificadas por RT-PCR em tempo real e os resultados demonstraram elevados títulos virais, o que corrobora com a elevada viremia observada durante esta infecção, que pode aumentar de  $10^9$  a  $10^{12}$  cópias de RNA/mL (Chow *et al.*, 2011,

Simon *et al.*, 2011). Um fato interessante é que apesar de mais elevada, não existem grandes diferenças entre a elevada viremia em pacientes agudos sintomáticos quando comparado aos assintomáticos (Appassakij *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o presente estudo realizou o diagnóstico diferencial para DENV no AP e na BA e para DENV e ZIKV diante das tríplices epidemias ocorridas no MS e no RJ. No AP, 13/100 (13%) amostras agudas foram confirmadas para DENV por técnicas moleculares e/ou sorológicas e, dentre as confirmadas por RT-PCR ( $n=10$ ), 8 foram identificadas como DENV-1 e 2 como DENV-4. Das amostras convalescentes, 44/108 (40.74%) foram confirmadas para dengue através de metodologias sorológicas. Na BA, 14/28 (50%) casos também foram confirmados para DENV por sorologia. Sendo assim, os dados demonstram que durante 2014-2015, a epidemias de arbovírus ocorridas no AP e na BA foram predominantemente de CHIKV, onde poucos casos de DENV foram notificados, o que contraria os achados de Phommanivong *et al.* (2016), que identificou um maior percentual de casos de DENV em comparação aos de CHIKV durante uma epidemia ocorrida no ano de 2014 no Laos (Ásia).

No MS, 99/134 (73.88%) casos foram confirmados para DENV por metodologias sorológicas e/ou moleculares e 38/134 (28.35%) para ZIKV pela metodologia de RT-PCR utilizada. No RJ, 17/91 (18.68%) foram confirmados para DENV por metodologias sorológicas e/ou moleculares, sendo 4 deles identificados como pertencentes ao sorotipo DENV-4, e 25/91 (27.47%) foram positivos para ZIKV. Estes dados continuam a contrariar achados de Phommanivong *et al.* (2016) e com relação aos resultados encontrados no RJ, corrobora com Cabral-Castro *et al.* (2016), que afirma que os casos de ZIKV predominam sobre os de DENV diante de uma região com co-circulação de DENV, CHIKV e ZIKV. Outro estudo publicado por Singh *et al.* (2012) em Delhi (Índia) no ano de 2010 confirma a presença dominante de CHIKV durante surtos de DENV e CHIKV. (Singh *et al.*, 2012, Cabral-Castro *et al.*, 2016)

Com relação às co-infecções, o presente estudo observou no AP 24 co-infecções entre CHIKV e DENV, 2 entre CHIKV e DENV-1 e 2 entre CHIKV e DENV-4. Na BA, 12/26 (46.15%) co-infecções entre CHIKV e DENV foram encontradas. No MS, 33/111 (29.72%) foram identificadas como co-infecções, sendo 1 entre CHIKV e DENV, 2 entre CHIKV e DENV-1, 1 entre CHIKV, DENV-1 e ZIKV, 25 entre DENV-1 e ZIKV e 4 entre DENV e ZIKV. No RJ, 29/83 (34.93%) foram identificadas como co-infecções, sendo 8/29 (27.58%) entre CHIKV e DENV, 17/29 (58.62%) entre CHIKV

e ZIKV e 4/29 (13.79%) entre DENV e ZIKV. Devido à presença de reatividade cruzada com o DENV em reações sorológicas, o diagnóstico para o ZIKV ainda se restringe, principalmente às técnicas moleculares, sendo o protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Lanciotti *et al.* (2008) utilizado nos Laboratórios de Referência do país, o que dificulta a abrangência do diagnóstico laboratorial para este arbovírus (Brasil *et al.*, 2016).

Além disso, co-circulação de arbovírus em uma determinada região pode dificultar a vigilância epidemiológica e o diagnóstico diferencial dos pacientes, além de proporcionar uma maior ocorrência de co-infectados, conforme observado durante um surto ocorrido no ano de 2013 em Laos (Ásia) (Phommanivong *et al.*, 2016) e em 1962-1964 na Tailândia (Ásia) (Halstead *et al.*, 1969). Durante 2006, também foi observado em Kinta District (Ásia) que a possibilidade de co-infecções em áreas endêmicas para DENV e CHIKV é muito elevada, uma vez que ambos os vírus possuem períodos de incubação similares, o que irá permitir uma dupla viremia durante a fase aguda das duas doenças (Nayar *et al.*, 2007).

Estudos publicados na literatura relatam co-infecções entre CHIKV e DENV-2 em Laos (Ásia) no ano de 2013 (Phommanivong *et al.*, 2016), em Calcutá e Vellore (Índia) em 1967 (Myers & Carey, 1967, Taraphdar *et al.*, 2012), no Gabão (África) em 2007 (Leroy *et al.*, 2009) e um caso importado proveniente de um viajante que migrou de Taiwan para Cingapura (Chang *et al.*, 2010). Entre CHIKV e DENV-3 houveram relatos em Laos em 2013 (Phommanivong *et al.*, 2016) e em Delhi (Índia) em 2006. Entre CHIKV e DENV-4 foram relatados um caso importado proveniente de um paciente retornando de Luanda (Angola) em 2014 (Parreira *et al.*, 2014) e outro em Delhi (Índia) no ano de 2006 (Chahar *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2012). O estudo de Chahar *et al.* (2009) documenta ainda co-infecções entre CHIKV, DENV-1 e DENV-3, além de CHIKV, DENV-3 e DENV-4 em Delhi (Índia) em 2006. Outras publicações demonstram também pacientes co-infectados com CHIKV e DENV a partir de um caso importado na Alemanha em 2008 (Schilling *et al.*, 2009), entre CHIKV e ZIKV na Bahia (Sardi *et al.*, 2016) entre ZIKV e DENV na Nova Caledônia (Oceania) (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015), entre CHIKV, DENV e ZIKV na Colômbia (América do Sul) (Villamil-Gómez *et al.*, 2016) e entre CHIKV, DENV e Malária em um paciente que migrou na Nigéria para a Índia em 2014 (Raut *et al.*, 2015).

A co-circulação do CHIKV, DENV e ZIKV necessita de maiores investigações para a avaliação da gravidade da doença em pacientes co-infectados e para a aplicação de melhores estratégias de prevenção e de vigilância epidemiológica em

regiões endêmicas/epidêmicas para estes vírus (Hertz *et al.*, 2012, Pessoa *et al.*, 2016). Estudos sugerem que a rápida propagação de arbovírus em uma população sem imunização pode resultar em co-infecções que favorecem a evolução da genética, infectividade e patogenicidade viral (Caron *et al.*, 2012).

Devido à disponibilidade de informações adicionais, as amostras confirmadas para CHIKV provenientes do AP, MS e RJ foram caracterizadas de acordo com o sexo, faixa etária e frequência das manifestações clínicas nos pacientes. Os resultados demonstram que em todas as regiões estudadas, foi observada uma maior frequência da doença em indivíduos do sexo feminino no AP e no RJ, o que corrobora com alguns estudos que indicam que, apesar do CHIKV afetar ambos os sexos, o sexo feminino é um fator de risco para o agravamento e persistência das dores articulares (Essackjee *et al.*, 2013, Brasil/MS, 2014).

Além disso, em todas as regiões estudadas houve predominância de idade acima de 15 anos para os casos confirmados de CHIKV. No AP, o maior número de casos foi destacado para indivíduos entre 16 a 20 anos e de 26 a 55 anos. No MS, houve distribuição equilibrada de casos entre as diferentes faixas etárias. No RJ, a maior frequência de casos confirmados para CHIKV foi para indivíduos na faixa etária de 26 a 30 anos, seguido de 41 a 45 e 51 a 55 anos de idade. Estes dados corroboram com estudos anteriores que indicam predominância de adultos na população afetada por CHIKV durante a epidemia da Ilha da Reunião em 2006, seguido de indivíduos de meia meia-idade e idosos (Borgherini *et al.*, 2008). Outras publicações indicam também que a idade avançada é considerada um fator de risco para a gravidade da doença e persistência da artralgia devido à presença de comorbidades e uma resposta imunológica menos eficiente, sendo que indivíduos acima de 65 anos apresentaram uma taxa de mortalidade 50 vezes maior quando comparados a indivíduos menores de 45 anos de idade (Essackjee *et al.*, 2013, Brasil/MS, 2014).

Com relação às manifestações clínicas, em todas as regiões estudadas houve predominância de febre, artralgia, mialgia, prostração, edema, exantema, hiperemia conjuntival, lombalgia, tontura, náusea, dor retro-orbitária e anorexia. Publicações na literatura destacam todos os sintomas citados como muito comuns durante a infecção pelo CHIKV (Bandyopadhyay & Ghosh, 2008, Ali Ou Alla & Combe, 2011, Kucharz & Cebula-Byrska, 2012, Javelle *et al.*, 2014, Brasil/MS, 2015, Hyle & Alame, 2015). Outros estudos demonstram que o envolvimento cutâneo é elevado durante esta doença (Inamadar *et al.*, 2008), podendo haver exantemas, úlceras,

dermatoses, eritema (Bandyopadhyay & Ghosh, 2010), erupção cutânea e lesão maculopapular que cedem em 3-4 dias sem seqüelas (El Sayed & Dhaybi, 2008, Prashant *et al.*, 2009).

Dando destaque à artralgia, este é o sintoma mais característico da infecção por este vírus, sendo esta poliarticular e persistente por até 18 meses após a fase aguda (Borgherini *et al.*, 2008). A artralgia é relatada como persistente em muitas das epidemias de CHIKV (Malvy *et al.*, 2009, de Andrade *et al.*, 2010, Larrieu *et al.*, 2010, Ali Ou Alla & Combe, 2011, Chopra *et al.*, 2012, Lui *et al.*, 2012, Essackjee *et al.*, 2013, Schilte *et al.*, 2013, Anderson *et al.*, 2014, Foissac *et al.*, 2015, Hyle & Alame, 2015).

Durante a fase crônica da doença, as dores incapacitantes podem afetar a realização das atividades diárias do paciente (Borgherini *et al.*, 2008), provocando uma redução da qualidade de vida, astenia, depressão e ansiedade (Queyriaux *et al.*, 2008, Couturier *et al.*, 2012, Schilte *et al.*, 2013, Sam *et al.*, 2015). Desta forma, é de fundamental importância o acompanhamento médico do paciente durante esta fase para o tratamento dos sintomas emocionais e também para o combate da artralgia e destruição da articulação (Couturier *et al.*, 2012, Yaseen *et al.*, 2014). Outro fato importante é que um estudo confirmou que a prevalência de anticorpos IgM é ainda maior entre os pacientes que apresentaram recuperação da doença, descartando assim a associação entre a presença de IgM e a artralgia persistente (Borgherini *et al.*, 2008).

Devido à indisponibilidade de dados adicionais nas fichas epidemiológicas dos pacientes, a avaliação dos casos de CHIKV em Feira de Santana de acordo com o bairro de origem, sexo, idade e manifestações clínicas foi impossibilitada. Entretanto, dados demonstram que nesta região ocorreu a predominância de casos positivos para o sexo feminino e para indivíduos com 20 a 49 anos durante 2015. Com relação às manifestações clínicas, houve predominância da febre, artralgia intensa e simétrica, edema e limitações dos movimentos (SVS/MS, 2016b).

Por fim, este estudo realizou também a análise filogenética e caracterização molecular de cepas representativas de CHIKV provenientes do AP e RJ. Os estudos genéticos com os casos confirmados em Campo Grande (MS) foram impossibilitados devido ao achado de apenas evidências sorológicas da infecção por este vírus neste estado. No AP, apesar de não ter sido observada nenhuma alteração de aminoácidos, foi demonstrado que todas as cepas analisadas pertencem ao genótipo Asiático, corroborando com outros estudos que revelam a cidade de

Oiapoque (AP) como local de introdução para este genótipo no Brasil durante 2014 a partir de cepas originárias do Caribe e da América do Sul (Parreira *et al.*, 2014, Nunes *et al.*, 2015, Teixeira *et al.*, 2015).

No RJ, foi demonstrada pela primeira vez a circulação do ECSA a partir de um surto ocorrido em 2016 e dados anteriores indicam que este genótipo foi identificado pela primeira vez nas Américas na cidade de Feira de Santana (BA) no ano de 2014, onde foi introduzido de forma independente a partir de cepas originárias da Angola (África Ocidental). Antes do presente estudo, não existia nenhuma publicação na literatura relatando análises filogenéticas em cepas autóctones deste vírus nesta região, havendo apenas uma descrição do genótipo asiático proveniente do Caribe, Guadalupe, República Dominicana e México encontrado em casos importados durante um estudo de 2014-2015 de Conteville e colaboradores (2016). (Conteville *et al.*, 2016)

Adicionalmente, a caracterização molecular deste fragmento revelou que o aminoácido alanina estava presente na posição 226 do gene E1, não mostrando nenhuma mutação A226V nas cepas do RJ. Estudos realizados durante uma epidemia de 2005-2006 ocorrida na ilha da Reunião revelaram que essa mutação foi responsável pela geração da linhagem do Oceano Índico (IOL), responsável pelo aumento da transmissão de CHIKV por *Ae. Albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007, Thiboutot *et al.*, 2010, Tsetsarkin *et al.*, 2011, Leparc-Goffart *et al.*, 2014).

Apesar disso, este estudo revelou uma alteração de aminoácidos E1-K211T em todas as amostras analisadas e uma E1-V156A em duas amostras. A mudança do K211T ainda não foi identificada nas cepas da Bahia, que possui o aminoácido Lisina (K), assim como na sequência de referência proveniente da Angola (1962). Outros estudos serão necessários para esclarecer as consequências destas mudanças na aptidão dos mosquitos e no sistema imunológico humano, mas algumas publicações sugerem que novas mutações como L210Q, I211T e G60D na região E2 da IOL também oferecem vantagens para a transmissão do CHIKV por *Ae. Albopictus* (Tsetsarkin *et al.*, 2007, Kariuki Njenga *et al.*, 2008, Niyas *et al.*, 2010). Com relação ao aumento do *fitness* em *Ae. Aegypti*, mutações E1-K211E e E2-V264A foram observadas na Índia durante 2006-2010 (Sumathy & Ella, 2012, Agarwal *et al.*, 2016).

É importante destacar que o gene E1 representa uma região alvo para esta análise devido à elevada variabilidade antigênica, sendo esta também necessária para a ligação, entrada do vírus em células alvo e replicação viral durante a infecção



pelo CHIKV (Solignat *et al.*, 2009, Lum & Ng, 2015). Sendo assim, este estudo fornece os primeiros dados de caracterização molecular e análise filogenética em casos autóctones de CHIKV provenientes de uma epidemia ocorrida no RJ em 2016.

O crescimento exponencial dos casos desta doença nesta cidade representa um grave problema de saúde pública e a co-circulação de três arbovírus (DENV, CHIKV e ZIKV) prejudica o diagnóstico laboratorial e clínico destas arboviroses (Brasil *et al.*, 2016). Além disso, é de fundamental importância o monitoramento da dispersão dos genótipos do CHIKV e identificação de possíveis mutações que facilitam a transmissão pelos mosquitos vetores, especialmente em uma região onde há uma ampla área de terra, alta densidade do vetor, presença de indivíduos suscetíveis e intenso movimento de turistas (Tsetsarkin *et al.*, 2007, Tsetsarkin *et al.*, 2011, Rodrigues Faria *et al.*, 2016)

## 6 CONCLUSÕES

- Em 2014 e 2015 houve predomínio de casos de CHIKV e co-infecções entre CHIKV e DENV no Amapá (AP) e Feira de Santana (BA).
- Em 2016 houve predomínio de casos de DENV e ZIKV, assim como co-infecções entre ZIKV e DENV em Campo Grande (MS), onde somente evidências sorológicas foram identificadas para CHIKV.
- No Rio de Janeiro (RJ) houve predomínio de casos de CHIKV e de co-infecções entre CHIKV e DENV, CHIKV e ZIKV e DENV e ZIKV na tríplice epidemia de 2016.
- No RJ, o RNA viral do CHIKV foi detectado por qRT-PCR em 1 caso convalescente coletado 71 dias após o início dos sintomas.
- A utilização e combinação dos métodos sorológicos e moleculares foram imprescindíveis para o diagnóstico diferencial das arboviroses, principalmente nas investigações dos casos de co-infecções.
- Febre, artralgia, mialgia, prostração, edema, exantema, hiperemia conjuntival, lombalgia, tontura, náusea, dor retro-orbitária e anorexia foram predominantes nos casos de CHIKV no AP, MS e RJ.
- O genótipo asiático foi encontrado em todas as cepas de CHIKV do AP, não havendo nenhuma diferença de aminoácidos nas sequências genômicas.
- O genótipo ECSA foi identificado pela primeira vez todos os casos autóctones de CHIKV analisados no RJ e as cepas não apresentaram a mutação A226V. No entanto, uma substituição de aminoácidos K211T foi exclusiva das cepas do RJ deste genótipo.
- A co-circulação de arbovírus em uma determinada região pode proporcionar a maior ocorrência de co-infecções e maiores estudos são necessários para a

investigação da evolução da genética, infectividade e patogenicidade viral a partir destes casos.

- A tríplice epidemia de arbovírus (CHIKV, DENV e ZIKV) presente no Brasil desde 2015 e 2016 representa um grave problema de saúde pública para o país, tornando o diagnóstico diferencial de extrema relevância na investigação de casos suspeitos.

## 7 PERSPECTIVAS

- Investigar o papel da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) e das células T reguladoras (Tregs) em pacientes naturalmente infectados pelo CHIKV e comparar os achados com aspectos clínicos e laboratoriais.
- Dosar a atividade da IDO em amostras plasmáticas dos casos confirmados de CHIKV apresentando diferentes formas clínicas da doença (típicas, atípicas e graves) e nos coinfectados com CHIKV/DENV ou CHIKV/ZIKV em comparação a indivíduos saudáveis;
- Avaliar a frequência das células Tregs CD4+ em pacientes monoinfectados apresentando diferentes formas clínicas da doença (típicas, atípicas e graves) e nos coinfectados com CHIKV/DENV ou CHIKV/ZIKA em comparação a indivíduos saudáveis;
- Quantificar as citocinas circulantes e mediadores inflamatórios nos diferentes grupos de estudo e correlacionar os níveis com a atividade da IDO;
- Avaliar a expressão da IDO em monócitos de pacientes infectados pelo CHIKV com diferentes formas da doença (típicas, atípicas e graves) e nos coinfectados com CHIKV/DENV ou CHIKV/ZIKA em comparação a indivíduos saudáveis;
- Avaliar a expressão da IDO em monócitos humanos frente à infecção pelo CHIKV e a secreção de citocinas nos sobrenadantes das culturas infectadas.
- Realizar a análise filogenética e caracterização de subpopulações virais de cepas de CHIKV detectadas em pacientes monoinfectados e coinfectados e determinar sua potencial associação com o desfecho clínico da doença.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal A, Sharma AK, Sukumaran D, Parida M, Dash PK. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. *Virology*. 2016;497:59-68.
2. Akahata W, Yang Z-y, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong W-P, Lewis MG, Higgs S, Rossmann MG, Rao S, Nabel GJ. A VLP vaccine for epidemic Chikungunya virus protects non-human primates against infection. *Nature medicine*. 2010;16(3):334-8.
3. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(4).
4. Albuquerque IGCd, Marandino R, Mendonça AP, Nogueira RMR, Vasconcelos PFdC, Guerra LR, Brandão BC, Mendonça APP, Aguiar GR, Bacco PAMd. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2012;45:128-9.
5. Ali Ou Alla S, Combe B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2011;25(3):337-46.
6. Anderson KB, Pureza V, Walker PF. Chikungunya: Acute Fever, Rash and Debilitating Arthralgias in a Returning Traveler From Haiti. *Journal of Travel Medicine*. 2014;21(6):418-20.
7. Appassakij H, Khuntikij P, Kemapunmanus M, Wutthananarungsan R, Silpapojakul K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion*. 2013;53(10pt2):2567-74.
8. Arpino C, Curatolo P, Rezza G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. *Reviews in Medical Virology*. 2009;19(3):121-9.
9. Azevedo RdSdS, Oliveira CS, Vasconcelos PFdC. Chikungunya risk for Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 2015;49.
10. Balm MND, Lee CK, Lee HK, Chiu L, Koay ESC, Tang JW. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. *Journal of Medical Virology*. 2012;84(9):1501-5.
11. Balsitis SJ, Williams KL, Lachica R, Flores D, Kyle JL, Mehlhop E, Johnson S, Diamond MS, Beatty PR, Harris E. Lethal Antibody Enhancement of Dengue Disease in Mice Is Prevented by Fc Modification. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000790.
12. Bandeira AC, Campos GS, Sardi SI, Rocha VFD, Rocha GCM. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: First report in Brazil. *IDCases*. 2016;5:57-9.

13. Bandyopadhyay B, Bandyopadhyay D, Bhattacharya R, De R, Saha B, Mukherjee H, Hati AK. Death due to chikungunya. *Tropical Doctor*. 2009;39(3):187-8.
14. Bandyopadhyay D, Ghosh SK. Mucocutaneous features of Chikungunya fever: a study from an outbreak in West Bengal, India. *International Journal of Dermatology*. 2008;47(11):1148-52.
15. Bandyopadhyay D, Ghosh SK. Mucocutaneous manifestations of chikungunya fever. *Indian Journal of Dermatology*. 2010;55(1):64-7.
16. Barton DJ, Sawicki SG, Sawicki DL. Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. *Journal of Virology*. 1991;65(3):1496-506.
17. Beeson S, Funkhouser E, Kotea N, Spielman A, Robich RM. Chikungunya Fever, Mauritius, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(2):337-8.
18. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(11):875-88.
19. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*. 2005;6(4):353-60.
20. Bhakat S, Karubiu W, Jayaprakash V, Soliman MES. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2014;87:677-702.
21. Bhakat S, Soliman MES. Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: a medicinal chemistry perspective. *Journal of Natural Medicines*. 2015;69:451-62.
22. Bhavana K, Tyagi I, Kapila RK. Chikungunya virus induced sudden sensorineural hearing loss. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2008;72(2):257-9.
23. Binn LN, Harrison VR, Randall R. Patterns of Viremia and Antibody Observed in Rhesus Monkeys Inoculated with Chikungunya and Other Serologically Related Group a Arboviruses. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1967;16(6):782-5.
24. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Goux A, Cotte L, Michault A, Arvin-Berod C, Paganin F. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus: A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island. *Clinical Infectious Diseases*. 2008;47(4):469-75.
25. Brandler S, Ruffié C, Combredet C, Brault J-B, Najburg V, Prevost M-C, Habel A, Tauber E, Desprès P, Tangy F. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine*. 2013;31(36):3718-25.
26. Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, Quintana MdSB, de Mendonça MCL, Lupi O, de Souza RV, Romero C, Zogbi H, Bressan CdS, Alves SS, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira RMR, Carvalho

- MS, de Filippis AMB, Jaenisch T. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(4).
27. Brasil/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de Chikungunya: Manejo Clínico. Brasília 2015. 28 p.
  28. Brasil/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e resposta à introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. Brasília 2014. 100 p.
  29. Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RHS, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *Journal of Clinical Virology*. 2016;82:108-11.
  30. Carey DE. Chikungunya and dengue: A Case of Mistaken Identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*. 1971;XXVI(3):243-62.
  31. Carletti F, Bordi L, Chiappini R, Ippolito G, Sciarrone MR, Capobianchi MR, Di Caro A, Castilletti C. Rapid Detection and Quantification of Chikungunya Virus by a One-Step Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction Real-Time Assay. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;77(3):521-4.
  32. Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BBB, Kassa Kassa F, Nkoghe D, Leroy EM. Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated With Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(6):e45-e53.
  33. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Geographic Distribution| Chikungunya virus| 2016.
  34. Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, Patil J, Salunke A, Parashar D, Shah PS. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. *Archives of Virology*. 2015;160(1):323-7.
  35. Chabaud M, Garnero P, Dayer J-M, Guerne P-A, Fossiez F, Miossec P. Contribution of Interleukin 17 to synovium matrix destruction in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2000;12(7):1092-9.
  36. Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra SK, Broor S. Co-infections with Chikungunya Virus and Dengue Virus in Delhi, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(7):1077-80.
  37. Chanana B, Azad RV, Nair S. Bilateral macular choroiditis following Chikungunya virus infection. *Eye*. 2007;21(7):1020-1.
  38. Chandak N, Kashyap R, Kabra D, Karandikar P, Saha S, Morey S, Purohit H, Taori G, Daginawala H. Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*. 2009;57(2):177-80.

39. Chang S-F, Su C-L, Shu P-Y, Yang C-F, Liao T-L, Cheng C-H, Hu H-C, Huang J-H. Concurrent Isolation of Chikungunya Virus and Dengue Virus from a Patient with Coinfection Resulting from a Trip to Singapore. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(12):4586-9.
40. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *Journal of General Virology*. 2007;88(2):365-75.
41. Charrel RN, de Lamballerie X, Raoult D. Seasonality of mosquitoes and chikungunya in Italy. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008;8(1):5-6.
42. Chen C-I, Clark DC, Pesavento P, Lerche NW, Luciw PA, Reisen WK, Brault AC. Comparative Pathogenesis of Epidemic and Enzootic Chikungunya Viruses in a Pregnant Rhesus Macaque Model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;83(6):1249-58.
43. Chen H, Parimelalagan M, Lai YL, Lee KS, Koay ES-C, Hapuarachchi HC, Ng LC, Ho PS, Chu JJH. Development and evaluation of a SYBR green based real-time multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection and serotyping of dengue and chikungunya viruses. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015;17(6):722-8.
44. Chiam CW, Chan YF, Loong SK, Yong SSJ, Hooi PS, Sam IC. Real-time polymerase chain reaction for diagnosis and quantitation of negative strand of chikungunya virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;77(2):133-7.
45. Chopra A, Anuradha V, Ghorpade R, Saluja M. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. *Epidemiology and Infection*. 2012;140(5):842-50.
46. Chopra A, Anuradha V, Lagoo-Joshi V, Kunjir V, Salvi S, Saluja M. Chikungunya virus aches and pains: An emerging challenge. *Arthritis & Rheumatism*. 2008;58(9):2921-2.
47. Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J-m, Dimatatac F, Kwek DJC, Barkham T, Yang H, Rénia L, Leo Y-S, Ng LFP. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;203(2):149-57.
48. Chretien J-P, Anyamba A, Bedno SA, Breiman RF, Sang R, Sergon K, Powers AM, Onyango CO, Small J, Tucker CJ, Linthicum KJ. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007;76(3):405-7.
49. Chretien J-P, Linthicum KJ. Chikungunya in Europe: what's next? *The Lancet*. 2007;370(9602):1805-6.



50. Chua KB. Epidemiology of chikungunya in Malaysia: 2006-2009. *Med J Malaysia*. 2010;65(4):277-82.
51. Collao X, Negro AI, Cano J, Tenorio A, de Ory F, Benito A, Masia M, Sánchez-Seco M-P. Different Lineages of Chikungunya Virus in Equatorial Guinea in 2002 and 2006. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;82(3):505-7.
52. Conteville LC, Zanella L, Marín MA, de Filippis AMB, Nogueira RMR, Vicente ACP, de Mendonça MCL. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2015. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2016;111(5):347-8.
53. Cordeiro MT. Laboratory diagnosis for dengue. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2012;54:10-2.
54. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, Touret Y, Barau G, Cayet N, Schuffenecker I, Desprès P, Arenzana-Seisdedos F, Michault A, Albert ML, Lecuit M. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e29.
55. Couderc T, Gangneux N, Chrétien F, Caro V, Le Luong T, Ducloux B, Tolou H, Lecuit M, Grandadam M. Chikungunya Virus Infection of Corneal Grafts. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(6):851-9.
56. Couturier E, Guillemin F, Mura M, Léon L, Virion J-M, Letort M-J, De Valk H, Simon F, Vaillant V. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. *Rheumatology*. 2012.
57. Dash M, Mohanty I, Padhi S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: do we really need it? *Indian J Med Sci*. 2011;65(3):83-91.
58. Dash PK, Parida M, Santhosh SR, Saxena P, Srivastava A, Neeraja M, Lakshmi V, Rao PVL. Development and evaluation of a 1-step duplex reverse transcription polymerase chain reaction for differential diagnosis of chikungunya and dengue infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2008;62(1):52-7.
59. Davis NL, Willis LV, Smith JF, Johnston RE. In vitro synthesis of infectious venezuelan equine encephalitis virus RNA from a cDNA clone: Analysis of a viable deletion mutant. *Virology*. 1989;171(1):189-204.
60. de Andrade DC, Jean S, Clavelou P, Dallel R, Bouhassira D. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. *BMC Infectious Diseases*. 2010;10(1):31.
61. de Curtis I, Simons K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(21):8052-6.
62. Dhaeze T, Stinissen P, Liston A, Hellings N. Humoral autoimmunity: A failure of regulatory T cells? *Autoimmunity Reviews*. 2015;14(8):735-41.

63. Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999;60(2):281-6.
64. Dick G, Kitchen S, Haddock A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1952;46(5):509-20.
65. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon J-P, Gourinat A-C. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerging Infectious Disease journal*. 2015;21(2):381.
66. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(3):e1446.
67. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, Germonneau P, Quatresous I. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion. *Epidemiology and Infection*. 2009;137(4):534-41.
68. Edwards CJ, Welch SR, Chamberlain J, Hewson R, Tolley H, Cane PA, Lloyd G. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. *Journal of Clinical Virology*. 2007;39(4):271-5.
69. Ekström M, Liljeström P, Garoff H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *The EMBO Journal*. 1994;13(5):1058-64.
70. El Sayed F, Dhaybi R. Chikungunya associated with cutaneous ulcerations. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2008;33(4):463-4.
71. Essackjee K, Goorah S, Ramchurn SK, Cheeneebash J, Walker-Bone K. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. *Postgraduate Medical Journal*. 2013;89(1054):440-7.
72. Farnon EC, Sejvar JJ, Staples JE. Severe disease manifestations associated with acute chikungunya virus infection\*. *Critical Care Medicine*. 2008;36(9):2682-3.
73. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology*. 2013;10:311.
74. Fessler J, Felber A, Duftner C, Dejaco C. Therapeutic Potential of Regulatory T cells in Autoimmune Disorders. *BioDrugs*. 2013;27(4):281-91.
75. Figueiredo MLGd, Figueiredo LTM. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2014;47:677-83.

76. Foissac M, Javelle E, Ray S, Guérin B, Simon F. Post-Chikungunya Rheumatoid Arthritis, Saint Martin. *Emerging Infectious Disease journal*. 2015;21(3):530.
77. Fox Julie M, Long F, Edeling Melissa A, Lin H, van Duijl-Richter Mareike KS, Fong Rachel H, Kahle Kristen M, Smit Jolanda M, Jin J, Simmons G, Doranz Benjamin J, Crowe James E, Jr., Fremont Daved H, Rossmann Michael G, Diamond Michael S. Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. *Cell*. 2015;163(5):1095-107.
78. Foy BD, Kobylinski KC, Blitvich BJ, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. 2011.
79. Fritel X, Rollot O, Gérardin P, Gaüzere B-A, Bideault J, Lagarde L, Dhuime B, Orvain E, Cuillier F, Ramful D, Samperiz S, Jaffar-Bandjee M-C, Michault A, Cotte L, Kaminski M, Fourmaintraux A. Chikungunya Virus Infection during Pregnancy, Réunion, France, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(3):418--25.
80. Garcia GdA, dos Santos LMB, Villela DAM, Maciel-de-Freitas R. Using *Wolbachia* Releases to Estimate *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Population Size and Survival. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0160196.
81. Gardner J, Anraku I, Le TT, Larcher T, Major L, Roques P, Schroder WA, Higgs S, Suhrbier A. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *Journal of Virology*. 2010;84(16):8021-32.
82. Gautret P, Simon F. Dengue, Chikungunya and Zika and mass gatherings: what happened in Brazil, 2014. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2016;14(1):7-8.
83. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, Lenglet Y, Touret Y, Bouveret A, Grivard P, Roux KL, Blanc S, Schuffenecker I, Couderc T, Arenzana-Seisdedos F, Lecuit M, Robillard P-Y. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008;5(3):e60.
84. Gérardin P, Sampéris S, Ramful D, Boumahni B, Bintner M, Alessandri J-L, Carbonnier M, Tiran-Rajaoefera I, Beullier G, Boya I, Noormahomed T, Okoi J, Rollot O, Cotte L, Jaffar-Bandjee M-C, Michault A, Favier F, Kaminski M, Fourmaintraux A, Fritel X. Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(7):e2996.
85. Gilotra SK, Shah KV. Laboratory studies on transmission of Chikungunya virus by mosquitoes. *American Journal of Epidemiology*. 1967;86(2):379-85.
86. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*. 2010;221(1):3-12.
87. Gonzalez MJ, Miranda-Massari JR, Berdiel MJ, Duconge J, Rodríguez-López JL, Hunninghake R, Cobas-Rosario VJ. High Dose Intravenous Vitamin C

- and Chikungunya Fever: A Case Report. *Journal of orthomolecular medicine : official journal of the Academy of Orthomolecular Medicine*. 2014;29(4):154-6.
88. Griffin DE. Alphaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
  89. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(2):e1477.
  90. Halstead SB. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. *Microbiology Spectrum*. 2014;2(6).
  91. Halstead SB, Nimmannitya S, Margiotta MR. Dengue and Chikungunya Virus Infection in Man in Thailand, 1962–1964: II. Observations on Disease in Outpatients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1969;18(6):972-83.
  92. Hammon WM, Rundnick A, Sather GE. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science*. 1960;131(3407):1102-3.
  93. Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C. Production and Evaluation of a Formalin-Killed Chikungunya Vaccine. *The Journal of Immunology*. 1971;107(3):643-7.
  94. Hasebe F, Parquet MC, Pandey BD, Mathenge EGM, Morita K, Balasubramaniam V, Saat Z, Yusop A, Sinniah M, Natkunam S, Igarashi A. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology*. 2002;67(3):370-4.
  95. Hawman DW, Stoermer KA, Montgomery SA, Pal P, Oko L, Diamond MS, Morrison TE. Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. *Journal of Virology*. 2013;87(24):13878-88.
  96. Hertz JT, Munishi OM, Ooi EE, Howe S, Lim WY, Chow A, Morrissey AB, Bartlett JA, Onyango JJ, Maro VP, Kinabo GD, Saganda W, Gubler DJ, Crump JA. Chikungunya and Dengue Fever among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;86(1):171-7.
  97. Ho PS, Ng MML, Chu JJH. Establishment of one-step SYBR green-based real time-PCR assay for rapid detection and quantification of chikungunya virus infection. *Virology Journal*. 2010;7:13-.
  98. Hoarau J-J, Jaffar Bandjee M-C, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, Denizot M, Guichard E, Ribera A, Henni T, Tallet F, Moiton MP, Gauzère BA, Bruniquet S, Jaffar Bandjee Z, Morbidelli P, Martigny G, Jolivet M, Gay F, Grandadam M, Tolou H, Vieillard V, Debré P, Autran B, Gasque P. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic

- Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *The Journal of Immunology*. 2010;184(10):5914-27.
99. Honório NA, Câmara DCP, Calvet GA, Brasil P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2015;31:906-8.
100. Hyle EP, Alame D. Case 13-2015: A 27-Year-Old Woman with Arthralgias and a Rash. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(17):1657-64.
101. Inamadar AC, Palit A, Sampagavi VV, Raghunath S, Deshmukh NS. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: observations made during a recent outbreak in south India. *International Journal of Dermatology*. 2008;47(2):154-9.
102. Iosifidis S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014;44(7):302-7.
103. Ivanova L, Schlesinger MJ. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *Journal of Virology*. 1993;67(5):2546-51.
104. Jain M, Rai S, Chakravarti A. Chikungunya: a review. *Tropical Doctor*. 2008;38(2):70-2.
105. Javelle E, Tiong TH, Leparac-Goffart I, Savini H, Simon F. Inflammation of the external ear in acute chikungunya infection: Experience from the outbreak in Johor Bahru, Malaysia, 2008. *Journal of Clinical Virology*. 2014;59(4):270-3.
106. Johnson BW, Goodman CH, Holloway K, de Salazar PM, Valadere AM, Drebot MA. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;95(1):182-92.
107. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(10):4977-83.
108. Josseran L, Paquet C, Zehgnoun A, Caillere N, Tertre AL, Solet J-L, Ledrans M. Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island. *Emerging Infectious Disease journal*. 2006;12(12):1994.
109. 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(3):415-20.
110. Jupp PG, McIntosh BM, dos Santos I, de Moor P. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981;75(1):15-9.

111. Kading RC, Borland EM, Cranfield M, Powers AM. Prevalence of antibodies to alphaviruses and flaviviruses in free-ranging game animals and nonhuman primates in the greater Congo basin. *Journal of Wildlife Diseases*. 2013;49(3):587-99.
112. Kam Y-W, Lum F-M, Teo T-H, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, Chua C-L, Chan Y-F, Wee J-K, Chow A, Lin RTP, Leo Y-S, Le Grand R, Sam IC, Tong J-C, Roques P, Wiesmüller K-H, Rénia L, Röttschke O, Ng LFP. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*. 2012a;4(4):330-43.
113. Kam Y-W, Simarmata D, Chow A, Her Z, Teng T-S, Ong EKS, Rénia L, Leo Y-S, Ng LFP. Early Appearance of Neutralizing Immunoglobulin G3 Antibodies Is Associated With Chikungunya Virus Clearance and Long-term Clinical Protection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012b;205(7):1147-54.
114. 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(1):5-16.
115. Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CHL, Sang R, Sergon K, Breiman R, Powers AM. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *The Journal of General Virology*. 2008;89(Pt 11):2754-60.
116. Kashyap RS, Morey SH, Chandak NH, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal Fluid Research*. 2010;7:12-.
117. Kee ACL, Yang S, Tambyah P. Atypical Chikungunya Virus Infections in Immunocompromised Patients. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(6):1038-40.
118. Khan AH, Morita K, Parquet MdC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*. 2002;83(12):3075-84.
119. Khandelwal K, Aara N, Ghiya BC, Bumb RA, Satoskar AR. Centro-facial pigmentation in asymptomatic congenital chikungunya viral infection. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2012;48(6):542-3.
120. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(9):1345-52.
121. Krejbich-Trotot P, Denizot M, Hoarau J-J, Jaffar-Bandjee M-C, Das T, Gasque P. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *The FASEB Journal*. 2011;25(1):314-25.

122. Kucharz EJ, Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. *European Journal of Internal Medicine*. 2012;23(4):325-9.
123. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, Dubreil L, Lebon P, Verrier B, de Lamballerie X, Suhrbier A, Cherel Y, Le Grand R, Roques P. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(3):894-906.
124. Ladner JT, Wiley MR, Prieto K, Yasuda CY, Nagle E, Kasper MR, Reyes D, Vasilakis N, Heang V, Weaver SC, Haddow A, Tesh RB, Sovann L, Palacios G. Complete Genome Sequences of Five Zika Virus Isolates. *Genome Announcements*. 2016;4(3).
125. Lam S, Chua K, Hooi P, Rahimah M, Kumari S, Tharmaratnam M, Chuah S, Smith D, Sampson I. Chikungunya infection--an emerging disease in Malaysia. 2001.
126. Lamballerie XD, Boisson V, Reynier J-C, Enault S, Charrel RN, Flahault A, Roques P, Grand RL. On Chikungunya Acute Infection and Chloroquine Treatment. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2008;8(6):837-40.
127. Lanciotti R, S., Valadere AM. Transcontinental Movement of Asian Genotype Chikungunya Virus. *Emerging Infectious Disease journal*. 2014;20(8):1400.
128. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(3):545-51.
129. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(5):764-7.
130. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez J, O. , Lambert AJ, Johnson A, J., Lambert A, J. , Stanfield SM, Duffy M, R. . Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Disease journal*. 2008;14(8):1232.
131. Laoprasopwattana K, Suntharasaj T, Petmanee P, Suddeaugrai O, Geater A. Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: seroprevalence, seroincidence and maternal-fetal transmission, southern Thailand, 2009-2010. *Epidemiology and Infection*. 2016;144(2):381-8.
132. Larrieu S, Poudereux N, Pistone T, Filleul L, Receveur M-C, Sissoko D, Ezzedine K, Malvy D. Factors associated with persistence of arthralgia among chikungunya virus-infected travellers: Report of 42 French cases. *Journal of Clinical Virology*. 2010;47(1):85-8.
133. Laurent P, Le Roux K, Grivard P, Bertil G, Naze F, Picard M, Staikowsky F, Barau G, Schuffenecker I, Michault A. Development of a Sensitive Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay with an Internal

- Control to Detect and Quantify Chikungunya Virus. *Clinical Chemistry*. 2007;53(8):1408-14.
134. Lebrun G, Chadda K, Reboux A-H, Martinet O, Gaüzère B-A. Guillain-Barré Syndrome after Chikungunya Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(3):495-6.
  135. Lee WWL, Teo T-H, Her Z, Lum F-M, Kam Y-W, Haase D, Rénia L, Röttschke O, Ng LFP. Expanding Regulatory T Cells Alleviates Chikungunya Virus-Induced Pathology in Mice. *Journal of Virology*. 2015;89(15):7893-904.
  136. Lenglet Y, Barau G, Robillard P, Randrianaivo H, Michault A, Bouveret A, Gérardin P, Boumahni B, Touret Y, Kauffmann E. Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the Reunion Island outbreak. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*. 2006;35(6):578.
  137. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *The Lancet*. 2014;383(9916):514.
  138. Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoyi-Mbiguino A, De Lamballerie X. Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(4):591-3.
  139. Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE, Lupton HW. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine*. 1986;4(3):157-62.
  140. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JLM, Shankar MV, Hewson R, Desai A, Beeching NJ, Ravikumar R, Solomon T. Chikungunya Virus and Central Nervous System Infections in Children, India. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(2):329-31.
  141. Li Y, Bäckesjö C-M, Haldosén L-A, Lindgren U. IL-6 receptor expression and IL-6 effects change during osteoblast differentiation. *Cytokine*. 2008;43(2):165-73.
  142. Lindenbach BD, Thiel H-Jr, Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
  143. Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014;7(12):925-32.
  144. Long KM, Heise MT. Chikungunya Virus Transmission—More Than Meets the Eye. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(6):806-7.
  145. Long KM, Whitmore AC, Ferris MT, Sempowski GD, McGee C, Trollinger B, Gunn B, Heise MT. Dendritic Cell Immunoreceptor Regulates Chikungunya Virus Pathogenesis in Mice. *Journal of Virology*. 2013;87(10):5697-706.



146. Lui NL, Leong HN, Thumboo J. Polyarthrititis in four patients with chikungunya arthritis. *Singapore Med J.* 2012;53(4):241-3.
147. Lum F-M, Ng LFP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Research.* 2015;120:165-74.
148. Lumsden WHR. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1955;49(1):33-57.
149. Mahendradas P, Avadhani K, Shetty R. Chikungunya and the eye: a review. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection.* 2013;3:35-.
150. Mahendradas P, Ranganna SK, Shetty R, Balu R, Narayana KM, Babu RB, Shetty BK. Ocular Manifestations Associated with Chikungunya. *Ophthalmology.* 2008;115(2):287-91.
151. Mallilankaraman K, Shedlock DJ, Bao H, Kawalekar OU, Fagone P, Ramanathan AA, Ferraro B, Stabenow J, Vijayachari P, Sundaram SG, Muruganandam N, Sarangan G, Srikanth P, Khan AS, Lewis MG, Kim JJ, Sardesai NY, Muthumani K, Weiner DB. A DNA Vaccine against Chikungunya Virus Is Protective in Mice and Induces Neutralizing Antibodies in Mice and Nonhuman Primates. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2011;5(1):e928.
152. Malvy D, Ezzedine K, Mamani-Matsuda M, Autran B, Tolou H, Receveur M-C, Pistone T, Rambert J, Moynet D, Mossalayi D. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. *BMC Infectious Diseases.* 2009;9(1):200.
153. Manimunda SP, Mavalankar D, Bandyopadhyay T, Sugunan AP. Chikungunya epidemic-related mortality. *Epidemiology and Infection.* 2011;139(9):1410-2.
154. Mavalankar D, Shastri P, Bandyopadhyay T, Parmar J, Ramani KV. Increased Mortality Rate Associated with Chikungunya Epidemic, Ahmedabad, India. *Emerging Infectious Diseases.* 2008;14(3):412-5.
155. Mavale M, Sudeep A, Gokhale M, Hundekar S, Parashar D, Ghodke Y, Arankalle V, Mishra AC. Persistence of Viral RNA in Chikungunya Virus-Infected *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Mosquitoes after Prolonged Storage at 28°C. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2012;86(1):178-80.
156. McCance KL, Huether SE. *Pathophysiology: The Biologic Basis for Disease in Adults and Children*: Elsevier; 2013.
157. Messaoudi I, Vomaska J, Totonchy T, Kreklywich CN, Habberthur K, Springgay L, Brien JD, Diamond MS, DeFilippis VR, Streblow DN. Chikungunya Virus Infection Results in Higher and Persistent Viral Replication in Aged Rhesus Macaques Due to Defects in Anti-Viral Immunity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(7):e2343.

158. Mi S, Durbin R, Huang HV, Rice CM, Stollar V. Association of the sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology*. 1989;170(2):385-91.
159. Mirabel M, lung B, Baron G, Messika-Zeitoun D, Détaint D, Vanoverschelde J-L, Butchart EG, Ravaud P, Vahanian A. What are the characteristics of patients with severe, symptomatic, mitral regurgitation who are denied surgery? *European Heart Journal*. 2007;28(11):1358-65.
160. Mishra B, Sharma M, Pujhari SK, Ratho RK, Gopal DVRS, Kumar CVMN, Sarangi G, Chayani N, Varma SC. Utility of multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and serotypic characterization of dengue and chikungunya viruses in clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011;71(2):118-25.
161. Mittal A, Mittal S, Bharati M, Ramakrishnan R, Saravanan S, Sathe PS. Optic neuritis associated with chikungunya virus infection in south india. *Archives of Ophthalmology*. 2007;125(10):1381-6.
162. Mohan A, Kiran DHN, Manohar IC, Kumar DP. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian Journal of Dermatology*. 2010;55(1):54-63.
163. Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology*. 2015;68:53-5.
164. Myers RM, Carey DE. Concurrent Isolation from Patient of Two Arboviruses, Chikungunya and Dengue Type 2. *Science*. 1967;157(3794):1307-8.
165. Nakaya HI, Gardner J, Poo Y-S, Major L, Pulendran B, Suhrbier A. Gene Profiling of Chikungunya Virus Arthritis in a Mouse Model Reveals Significant Overlap With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):10.1002/art.34631.
166. Nayar SK, Noridah O, Paranthaman V, Ranjit K, Norizah I, Chem YK, Mustafa B, Chua KB. Co-infection of dengue virus and chikungunya virus in two patients with acute febrile illness. *Med J Malaysia*. 2007;62(4):335-6.
167. Ng JKW, Zhang SL, Tan HC, Yan B, Maria Martinez Gomez J, Tan WY, Lam JH, Tan GKX, Ooi EE, Alonso S. First Experimental In Vivo Model of Enhanced Dengue Disease Severity through Maternally Acquired Heterotypic Dengue Antibodies. *PLoS Pathogens*. 2014;10(4):e1004031.
168. Ng LFP, Chow A, Sun Y-J, Kwek DJC, Lim P-L, Dimatatac F, Ng L-C, Ooi E-E, Choo K-H, Her Z, Kourilsky P, Leo Y-S. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. *PLoS ONE*. 2009;4(1):e4261.
169. Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, Issac A, Sreekumar E. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology Journal*. 2010;7:189-.

170. Noret M, Herrero L, Rulli N, Rolph M, Smith PN, Li RW, Roques P, Gras G, Mahalingam S. Interleukin 6, RANKL, and Osteoprotegerin Expression by Chikungunya Virus–Infected Human Osteoblasts. *Journal of Infectious Diseases*. 2012.
171. Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, Azevedo RdSdS, da Silva DEA, da Silva EVP, da Silva SP, Carvalho VL, Coelho GE, Cruz ACR, Rodrigues SG, da Silva Gonçalves Vianez JL, Nunes BTD, Cardoso JF, Tesh RB, Hay SI, Pybus OG, da Costa Vasconcelos PF. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*. 2015;13(1):102.
172. Obeyesekere I, Hermon Y. Myocarditis and cardiomyopathy after arbovirus infections (dengue and chikungunya fever). *British Heart Journal*. 1972;34(8):821-7.
173. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, Baudouin L, Mallet H, Musso D, Ghawche F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. 2014.
174. Orange JS, Biron CA. An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *The Journal of Immunology*. 1996;156(3):1138-42.
175. PAHO. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2016 (to week noted) *Epidemiological Week / EW 46* (Updated as of 18 November 2016). Washington (DC): OPAS; 2016a.
176. PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. *Alerta epidemiológica. Fiebre por Chikungunya*. . Washington (DC): OPAS; 2013.
177. PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. *Factsheet Chikungunya*. . Washington (DC): OPAS; 2014.
178. PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. *Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2013-2015 (por semanas) Semana Epidemiológica/SE6* Washington (DC): OPAS; 2015.
179. PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. Washington (DC): OPAS; 2011.
180. PAHO. Pan American Health Organization, World Health Organization. *Organização Mundial da Saúde anuncia emergência de saúde pública de importância internacional. Organização Pan-Americana da Saúde Brasília*; 2016b.
181. Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C. Performance of the RealStar Chikungunya Virus Real-Time Reverse Transcription-PCR Kit. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009a;47(9):3014-6.

182. Panning M, Wichmann D, Grywna K, Annan A, Wijesinghe S, Kularatne SAM, Drosten C. No evidence of chikungunya virus and antibodies shortly before the outbreak on Sri Lanka. *Medical Microbiology and Immunology*. 2009b;198(2):103.
183. Paquet C, Quatresous I, Solet J, Sissoko D, Renault P, Pierre V, Cordel H, Lassalle C, Thiria J, Zeller H. Chikungunya outbreak in Reunion: epidemiology and surveillance, 2005 to early January 2006. 2006.
184. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Babu JP, Rao PVL, Morita K. Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(2):351-7.
185. Parola P, Simon F, Oliver M. Tenosynovitis and Vascular Disorders Associated with Chikungunya Virus–Related Rheumatism. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(6):801-2.
186. Parreira R, Centeno-Lima S, Lopes A, Portugal-Calisto D, Constantino A, Nina J. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Chikungunya and Zika virus*. 2014;54:9.
187. Parrott MM, Sitarski SA, Arnold RJ, Picton LK, Hill RB, Mukhopadhyay S. Role of Conserved Cysteines in the Alphavirus E3 Protein. *Journal of Virology*. 2009;83(6):2584-91.
188. Pastorino B, Bessaud M, Grandadam M, Murri S, Tolou HJ, Peyrefitte CN. Development of a TaqMan® RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. *Journal of Virological Methods*. 2005;124(1–2):65-71.
189. Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, Tock F, Tolou H, Durand JP, Peyrefitte CN. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: Identification of a new central African strain. *Journal of Medical Virology*. 2004;74(2):277-82.
190. Pehrson JR, Fuji RN. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Research*. 1998;26(12):2837-42.
191. Pessôa R, Patriota JV, de Lourdes de Souza M, Felix AC, Mamede N, Sanabani SS. Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine*. 2016;95(12):e3201.
192. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Béziat V, Debré P, Leroy EM, Vieillard V. Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity. *PLoS Pathogens*. 2011;7(9):e1002268.
193. Petitdemange C, Wauquier N, Vieillard V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015;135(4):846-55.

194. Pfeffer M, Linssen B, Parker MD, Kinney RM. Specific Detection of Chikungunya Virus Using a RT-PCR/Nested PCR Combination. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 2002;49(1):49-54.
195. Phommanivong V, Kanda S, Shimono T, Lamaningao P, Darcy AW, Mishima N, Phaytanavanh B, Nishiyama T. Co-circulation of the dengue with chikungunya virus during the 2013 outbreak in the southern part of Lao PDR. *Tropical Medicine and Health*. 2016;44:24.
196. Phuklia W, Kasisith J, Modhiran N, Rodpai E, Thannagith M, Thongsakulprasert T, Smith DR, Ubol S. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. *Virus Research*. 2013;177(2):179-88.
197. Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(5):319-27.
198. Plaskon NE, Adelman ZN, Myles KM. Accurate Strand-Specific Quantification of Viral RNA. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7468.
199. Pongsiri P, Auksornkitti V, Theamboonlers A, Luplertlop N, Rianthavorn P, Poovorawan Y. Entire genome characterization of Chikungunya virus from the 2008-2009 outbreaks in Thailand. *Trop Biomed*. 2010;27(2):167-76.
200. Pongsiri P, Praianantathavorn K, Theamboonlers A, Payungporn S, Poovorawan Y. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012;5(5):342-6.
201. Poo YS, Nakaya H, Gardner J, Larcher T, Schroder WA, Le TT, Major LD, Suhrbier A. CCR2 Deficiency Promotes Exacerbated Chronic Erosive Neutrophil-Dominated Chikungunya Virus Arthritis. *Journal of Virology*. 2014a;88(12):6862-72.
202. Poo YS, Rudd PA, Gardner J, Wilson JAC, Larcher T, Colle M-A, Le TT, Nakaya HI, Warrilow D, Allcock R, Bielefeldt-Ohmann H, Schroder WA, Khromykh AA, Lopez JA, Suhrbier A. Multiple Immune Factors Are Involved in Controlling Acute and Chronic Chikungunya Virus Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014b;8(12):e3354.
203. Powers AM. Chikungunya. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2010;30(1):209-19.
204. Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*. 2000;81(2):471-9.
205. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*. 2007;88(9):2363-77.

206. Prashant S, Kumar AS, Basheeruddin DDM, Chowdhary TN, Madhu B. Cutaneous manifestations in patients suspected of Chikungunya disease. *Indian Journal of Dermatology*. 2009;54(2):128-31.
207. Prat C, M. , Flusin O, Panella A, Tenebray B, Lanciotti R, S. , Leparco-Goffart I. Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. *Emerging Infectious Disease journal*. 2014;20(12):2129.
208. Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin J-P. Clinical burden of chikungunya virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008;8(1):2-3.
209. Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;104(2):89-96.
210. Rao T. Vectors of Dengue and Chikungunya viruses: a brief review. *The Indian journal of medical research*. 1964;52:719-26.
211. Raut CG, Rao NM, Sinha DP, Hanumaiah H, Manjunatha **MJ**. Chikungunya, Dengue, and Malaria Co-Infection after Travel to Nigeria, India. *Emerging Infectious Disease journal*. 2015;21(5):907.
212. Ravichandran R, Manian M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *The Journal of Infection in Developing Countries*; Vol 2, No 02: April 2008. 2008.
213. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers AM, Johnson BW. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *Journal of Medical Virology*. 2012;84(11):1771-8.
214. Reiter P, Fontenille D, Paupy C. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *The Lancet Infectious Diseases*. 2006;6(8):463-4.
215. Renault P, Balleydier E, D'Ortenzio E, Bâville M, Filleul L. Epidemiology of chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2012;42(3):93-101.
216. Riswari SF, Ma'roef CN, Djauhari H, Kosasih H, Perkasa A, Yudhaputri FA, Artika IM, Williams M, van der Ven A, Myint KS, Alisjahbana B, Ledermann JP, Powers AM, Jaya UA. Study of viremic profile in febrile specimens of chikungunya in Bandung, Indonesia. *Journal of Clinical Virology*. 2016;74:61-5.
217. Robillard P-Y, Boumahni B, Gérardin P, Michault A, Fourmaintraux A, Schuffenecker I, Carbonnier M, Djémili S, Choker G, Roge-Wolter M, Barau G. Vertical maternal fetal transmission of the chikungunya virus: Ten cases among 84 pregnant women. *La Presse Médicale*. 2006;35(5):785-8.
218. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1955;49(1):28-32.

219. Rodrigues Faria N, Lourenço J, Marques de Cerqueira E, Maia de Lima M, Pybus O, Faria NR, Lourenço J, de Cerqueira EM, de Lima MM, Pybus O. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. 2016.
220. Roques P, Ng LFP, Sam IC, Higgs S. Chikungunya: International Focus Issue. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015;15(4):221-2.
221. Rose N, Anoop TM, John AP, Jabbar PK, George KC. Acute optic neuritis following infection with chikungunya virus in southern rural India. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(2):e147-e50.
222. Ross RW. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *The Journal of Hygiene*. 1956;54(2):177-91.
223. Roth A, Hoy D, Horwood P, F. , Ropa B, Hancock T, Guillaumot L, Rickart K, Frison P, Pavlin B, Souares Y. Preparedness for Threat of Chikungunya in the Pacific. *Emerging Infectious Disease journal*. 2014;20(8).
224. Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of Clinical Virology*. 2015;64:144-52.
225. Saha K, Firdaus R, Chakrabarti S, Sadhukhan PC. Development of rapid, sensitive one-tube duplex RT-PCR assay for specific and differential diagnosis of Chikungunya and dengue. *Journal of Virological Methods*. 2013;193(2):521-4.
226. Salazar-González JA, Angulo C, Rosales-Mendoza S. Chikungunya virus vaccines: Current strategies and prospects for developing plant-made vaccines. *Vaccine*. 2015;33(31):3650-8.
227. Salvador B, Zhou Y, Michault A, Muench MO, Simmons G. Characterization of Chikungunya pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein. *Virology*. 2009;393(1):33-41.
228. Sam I, Kamarulzaman A, Ong G, Veriah R, Ponnampalavanar S, Chan Y, AbuBakar S. Chikungunya virus-associated death in Malaysia. *Trop Biomed*. 2010;27(2):343.
229. Sam IC, Kümmerer BM, Chan Y-F, Roques P, Drosten C, AbuBakar S. Updates on Chikungunya Epidemiology, Clinical Disease, and Diagnostics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2015;15(4):223-30.
230. Sánchez-Seco MP, Negrodo AI, Puente S, Pinazo MJ, Shuffenecker I, Tenorio A, Fedele CG, Domingo C, Rubio JM, de Ory F. Diagnóstico microbiológico del virus chikungunya importado en España (2006–2007): detección de casos en viajeros. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009;27(8):457-61.
231. Sardi SI, Somasekar S, Naccache SN, Bandeira AC, Tauro LB, Campos GS, Chiu CY. Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in

- Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(9):2348-53.
232. Schilling S, Emmerich P, Günther S, Schmidt-Chanasit J. Dengue and Chikungunya virus co-infection in a German traveller. *Journal of Clinical Virology*. 2009;45(2):163-4.
233. Schilte C, Staikovsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, Albert ML, Lecuit M, Michault A. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3):e2137.
234. Schmidt M, Schmidt MF, Rott R. Chemical identification of cysteine as palmitoylation site in a transmembrane protein (Semliki Forest virus E1). *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(35):18635-9.
235. Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, Lavenir R, Pardigon N, Reynes J-M, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel M-P, Bréhin A-C, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Medicine*. 2006;3(7):e263.
236. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Micro*. 2010;8(7):491-500.
237. Sebastian MR, Lodha R, Kabra SK. Chikungunya infection in children. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2009;76(2):185.
238. SESAB. Secretaria de Saúde do Estado da Bahia. (Home Page) Perfil das doenças: Dengue, Zika e Chikungunya. 2016.
239. Shah KV, Gibbs Jr C, Banerjee G. Virological Investigation of the Epidemic of Haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of Three Strains of Chikungunya Virus. *The Indian journal of medical research*. 1964;52:676-83.
240. Sharp TM, Hunsperger E, Santiago GA, Muñoz-Jordan JL, Santiago LM, Rivera A, Rodríguez-Acosta RL, Gonzalez Feliciano L, Margolis HS, Tomashek KM. Virus-Specific Differences in Rates of Disease during the 2010 Dengue Epidemic in Puerto Rico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(4):e2159.
241. Shirako Y, Strauss JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*. 1994;68(3):1874-85.
242. Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *Journal of Virology*. 1984;51(1):254-8.
243. Simon F, Javelle E, Oliver M, Leparc-Goffart I, Marimoutou C. Chikungunya Virus Infection. *Current Infectious Disease Reports*. 2011;13(3):218-28.



244. Simon F, Parola P, Grandadam M, Fourcade S, Oliver M, Brouqui P, Hance P, Kraemer P, Mohamed AA, de Lamballerie X, Charrel R, Tolou H. Chikungunya Infection: An Emerging Rheumatism Among Travelers Returned From Indian Ocean Islands. Report of 47 Cases. *Medicine*. 2007;86(3):123-37.
245. Singh P, Mittal V, Rizvi MMA, Chhabra M, Sharma P, Rawat DS, Bhattacharya D, Chauhan LS, Rai A. The first dominant co-circulation of both dengue and chikungunya viruses during the post-monsoon period of 2010 in Delhi, India. *Epidemiology and Infection*. 2012;140(7):1337-42.
246. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Ledrans M, Pierre V. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(3):e389.
247. Soares CN, Brasil P, Carrera RM, Sequeira P, de Filippis AB, Borges VA, Theophilo F, Ellul MA, Solomon T. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. *Journal of Clinical Virology*. 2016;83:63-5.
248. Solanki BS, Arya SC, Maheshwari P. Chikungunya disease with nephritic presentation. *International Journal of Clinical Practice*. 2007;61(11):1941-.
249. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*. 2009;393(2):183-97.
250. Soni M, Singh AK, Sharma S, Agarwal A, Gopalan N, Rao PVL, Parida M, Dash PK. Molecular and Virological Investigation of a Focal Chikungunya Outbreak in Northern India. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:6.
251. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Roux KL, Prevost M-C, Fsihi H, Frenkiel M-P, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi P-E, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saïb A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P, Michault A, Albert ML, Schwartz O. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog*. 2007;3(6):e89.
252. Stapleford Kenneth A, Coffey Lark L, Lay S, Bordería Antonio V, Duong V, Isakov O, Rozen-Gagnon K, Arias-Goeta C, Blanc H, Beaucourt S, Haliloğlu T, Schmitt C, Bonne I, Ben-Tal N, Shomron N, Failloux A-B, Buchy P, Vignuzzi M. Emergence and Transmission of Arbovirus Evolutionary Intermediates with Epidemic Potential. *Cell Host & Microbe*. 2014;15(6):706-16.
253. Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(6):942-8.
254. Staples JE, Fischer M. Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(10):887-9.

255. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*. 1994;58(3):491-562.
256. Sudeep AB, Parashar D. Chikungunya: an overview. *Journal of Biosciences*. 2008;33(4):443.
257. Sumathy K, Ella KM. Genetic diversity of chikungunya virus, India 2006–2010: Evolutionary dynamics and serotype analyses. *Journal of Medical Virology*. 2012;84(3):462-70.
258. Suomalainen M, Liljeström P, Garoff H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *Journal of Virology*. 1992;66(8):4737-47.
259. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 47 - nº 34 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 37 de 2016. Brasília: Ministério da Saúde; 2016a.
260. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Volume 45 - nº 17. Dengue: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 29 de 2014. Brasília: Ministério da Saúde; 2014a.
261. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Volume 45 - nº 20. Monitoramento dos casos de dengue Semana Epidemiológica (SE) 35 e febre de chikungunya SE 36 de 2014. Brasília: Ministério da Saúde; 2014b.
262. SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Volume 47 - nº 5. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 2 de 2016. Brasília: Ministério da Saúde; 2016b.
263. Taksande A, Vilhekar K. Neonatal Chikungunya Infection. *Prevention and Infection Control*. 2015.
264. Tan JJJ, Capozzoli M, Sato M, Watthanaworawit W, Ling CL, Mauduit M, Malleret B, Grüner A-C, Tan R, Nosten FH, Snounou G, Rénia L, Ng LFP. An Integrated Lab-on-Chip for Rapid Identification and Simultaneous Differentiation of Tropical Pathogens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e3043.
265. Tandale BV, Sathe PS, Arankalle VA, Wadia RS, Kulkarni R, Shah SV, Shah SK, Sheth JK, Sudeep AB, Tripathy AS, Mishra AC. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *Journal of Clinical Virology*. 2009;46(2):145-9.
266. Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Günther S, Schulze MH, Stich A. Chikungunya and dengue virus antibodies in a traveller with severe arthralgia returning from India. *Journal of Clinical Virology*. 2010;49(3):148-50.
267. Taraphdar D, Sarkar A, Mukhopadhyay BB, Chatterjee S. Short Report: A Comparative Study of Clinical Features between Monotypic and Dual Infection Cases with Chikungunya Virus and Dengue Virus in West Bengal,

- India. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;86(4):720-3.
268. Taubitz W, Cramer JP, Kapaun A, Pfeiffer M, Drosten C, Dobler G, Burchard GD, Löscher T. Chikungunya Fever in Travelers: Clinical Presentation and Course. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(1):e1-e4.
269. Teixeira M, J. , Andrade A, M. S. , Costa MdC, N. , Castro J, S. M. , Oliveira F, L. S. , Goes C, S. B. , Maia M, Santana E, B. , Nunes B, T. D. , Vasconcelos P, F. C. . East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Disease journal*. 2015;21(5):906.
270. Teng T-S, Kam Y-W, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng L-C, Ng LFP. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015;211(12):1925-35.
271. Teo T-H, Her Z, Tan JLL, Lum F-M, Lee WWL, Chan Y-H, Ong R-Y, Kam Y-W, Leparco-Goffart I, Gallian P, Rénia L, de Lamballerie X, Ng LFP. Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *Journal of Virology*. 2015;89(15):7955-69.
272. Teo T-H, Lum F-M, Claser C, Lulla V, Lulla A, Merits A, Rénia L, Ng LFP. A Pathogenic Role for CD4+ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. *The Journal of Immunology*. 2013;190(1):259-69.
273. Thiberville S-D, Moyon N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, de Lamballerie X. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. 2013;99(3):345-70.
274. Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS, Sarangan G, Srikanth P, Weiner DB, Muthumani K. Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(4):e623.
275. Tretyakova I, Hearn J, Wang E, Weaver S, Pushko P. DNA Vaccine Initiates Replication of Live Attenuated Chikungunya Virus In Vitro and Elicits Protective Immune Response in Mice. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014;209(12):1882-90.
276. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence. *Current opinion in virology*. 2011;1(4):310-7.
277. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathogens*. 2007;3(12):e201.
278. Ummul Haninah A, Vasan SS, Ravindran T, Chandru A, Lee HL, Shamala Devi S. Development and evaluation of a one-step SYBR-Green I-based real-time RT-PCR assay for the detection and quantification of Chikungunya virus in human, monkey and mosquito samples. *Trop Biomed*. 2010;27(3):611-23.

279. Villamil-Gómez WE, González-Camargo O, Rodríguez-Ayubi J, Zapata-Serpa D, Rodríguez-Morales AJ. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. *Journal of Infection and Public Health*. 2016;9(5):684-6.
280. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *Journal of Virology*. 2010;84(13):6497-504.
281. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(4):860-7.
282. Wang YF, Sawicki SG, Sawicki DL. Alphavirus nsP3 functions to form replication complexes transcribing negative-strand RNA. *Journal of Virology*. 1994;68(10):6466-75.
283. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204(1):115-23.
284. WHO. World Health Organization. Chikungunya-France. 2014.
285. WHO. World Health Organization. Chikungunya-Spain. 2015a.
286. WHO. World Health Organization. Chikungunya - Spain (update). 2015b.
287. WHO. World Health Organization. Chikungunya – Argentina. 2016a.
288. WHO. World Health Organization. Chikungunya – Kenya. 2016b.
289. WHO. World Health Organization. Chikungunya – Senegal. 2015c.
290. WHO. World Health Organization. Chikungunya – United States of America. 2016c.
291. WHO. World Health Organization. Chikungunya and Dengue in the south west Indian Ocean. 2006a.
292. WHO. World Health Organization. Chikungunya in India. 2006b.
293. WHO. World Health Organization. Chikungunya in La Réunion Island (France). 2006c.
294. WHO. World Health Organization. Chikungunya in the French part of the Caribbean isle of Saint Martin 2013a.
295. WHO. World Health Organization. Special Programme for Research Training in Tropical Diseases. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: World Health Organization. Department of Control of Neglected Tropical Diseases; 2009.

296. WHO. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva.2013b.
297. Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. Chikungunya Virus Infection of Cell Lines: Analysis of the East, Central and South African Lineage. PLoS ONE. 2012;7(1):e31102.
298. Wong HV, Vythilingam I, Sulaiman WYW, Lulla A, Merits A, Chan YF, Sam I-C. Detection of Persistent Chikungunya Virus RNA but not Infectious Virus in Experimental Vertical Transmission in *Aedes aegypti* from Malaysia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2016;94(1):182-6.
299. Yaseen HM, Simon F, Deparis X, Marimoutou C. Identification of initial severity determinants to predict arthritis after chikungunya infection in a cohort of French gendarmes. BMC Musculoskeletal Disorders. 2014;15(1):249.
300. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, Oestereich L, Cadar D, Muñoz-Fontela C, Bartoloni A, Schmidt-Chanasit J. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. Journal of Clinical Virology. 2015;63:32-5.
301. Zanluca C, de Melo VC, Mosimann AL, Dos Santos GI, Dos Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(4):569-72.
302. Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Antibodies enhance infection of LSECs in a model of ADE-induced severe dengue disease. Cell host & microbe. 2010;7(2):128-39.

# APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO

- O primeiro manuscrito deste projeto intitulado “First report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus In Rio de Janeiro, Brazil” foi publicado na revista PLOS Current Outbreaks (doi: 10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727).



Log in

Home Aims & Scope Review Board Authors ↓ Resources About

Search



## First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil

FEBRUARY 14, 2017 · RESEARCH ARTICLE

Print or Save PDF Citation XML Email Tweet Curtir 183

### AUTHORS

Thiara Manuele Alves Souza Elzinandes Leal Azeredo Jessica Badoloto-Corrêa Paulo Vieira Damasco Carla Santos Fabienne Petitinga-Paiva Priscila Conrado Guerra Nunes Luciana Santos Barbosa Márcio Costa Cipitelli Thais Chouin-Carneiro Nieli Rodrigues Costa Faria Rita Maria Ribeiro Nogueira Fernanda de Bruycker-Nogueira Flavia Barreto dos Santos

### ABSTRACT

**Background:** Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that causes an acute febrile syndrome with a severe and debilitating arthralgia. In Brazil, the Asian and East-Central South African (ECSA) genotypes are circulating in the north and northeast of the country, respectively. In 2015, the first autochthonous cases in Rio de Janeiro, Brazil were reported but until now the circulating strains have not been characterized. Therefore, we aimed here to perform the molecular characterization and phylogenetic analysis of CHIKV strains circulating in the 2016 outbreak occurred in the municipality of Rio de Janeiro.

**Methods:** The cases analyzed in this study were collected at a private Hospital, from April 2016 to May 2016, during the chikungunya outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. All cases were submitted to the Real Time RT-PCR for CHIKV genome detection and to anti-CHIKV IgM ELISA. Chikungunya infection was laboratorially confirmed by at least one diagnostic method and, randomly selected positive cases (n=10), were partially sequenced (CHIKV E1 gene) and analyzed.

**Results:** The results showed that all the samples grouped in ECSA genotype branch and the molecular characterization of the fragment did not reveal the A226V mutation in the Rio de Janeiro strains analyzed, but a K211T amino acid substitution was observed for the first time in all samples and a V156A substitution in two of ten samples.

**Conclusions:** Phylogenetic analysis and molecular characterization reveals the circulation of the ECSA genotype of CHIKV in the city of Rio de Janeiro, Brazil and two amino acids substitutions (K211T and V156A) exclusive to the CHIKV strains obtained during the 2016 epidemic, were reported.

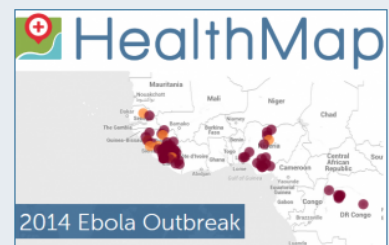
### FUNDING STATEMENT

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq [grant number 303822/2015-5 to FBS], Programa Estratégico de Pesquisa em Saúde/PAPES VI-FIOCRUZ [grant number 407690/2012-3], to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro /FAPERJ [to RMR, to ELA and to FBS], to Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ and Brazilian Ministry of Health. TMAS and PCGN are fellow by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq. FBN and TCC are fellows from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JBSC has fellowships from the Oswaldo Cruz Institute (IOC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus belonging to the *Togaviridae* family, *Alphavirus* genus causing an acute febrile syndrome with severe and debilitating arthralgia<sup>1,2,3,4</sup>. The viral particle is approximately 60-70 nm in diameter and composed of an icosahedral capsid surrounded by a lipid envelope. The viral genome consists of a single stranded positive sense RNA of 12kb in length, which encodes four non-structural proteins (NSP1-4) and five structural proteins (C, E3, E2, 6K and E1)<sup>5,6,7</sup>.

CHIKV was first described in 1952 on the Makonde Plains, between Tanzania and Mozambique (East Africa), and since its Discovery, the virus has been responsible for important emerging and re-emerging epidemics in several tropical and temperate regions of the world<sup>8</sup>. Distinct CHIKV genotypes have been identified – West African, East-Central South African (ECSA) and Asian. Moreover, the Indian Ocean Lineage (IOL) has emerged in Kenya in 2004 as a descendant lineage of ECSA and caused several outbreaks in Indian Ocean Islands, India and Asia from 2005 to 2014<sup>9,10</sup>. Although the *Aedes (Ae.) aegypti* mosquito has been highlighted as the main vector for the urban cycle of CHIKV, *Ae. albopictus* has also demonstrated a high vectorial competence for the virus transmission due to an A226V mutation in the E1 gene of ECSA genotype that generated the IOL and which promoted an increased infectivity in the midgut, dissemination to the salivary glands and transmission<sup>9,12,13,14</sup>. A large number of imported and autochthonous cases of CHIKV have been reported in American, Europe and Asian countries since 2006 due to viremic travelers arising from Africa, India and Indian Ocean islands<sup>11,13</sup>.



### Tweets

Alvaro Carrascal @publhealth  
Brazil-Social media not an adeq. suppl. to tradit. surveill. for dengue in low inco/highrisk pop. [currents.plos.org/outbreaks/arti...](https://currents.plos.org/outbreaks/arti...) @PLOSCurrentsOut

Greg Folkers @greg\_folkers  
PLOS Currents: First Report of the East-Central South African Genotype of #Chikungunya Virus in Rio de Janeiro [bit.ly/2lOmEuK](https://bit.ly/2lOmEuK)



Embed View on Twitter

In the Americas, the first autochthonous transmission of the Asian genotype was reported during 2013 in the San Martin Island, Caribbean<sup>14,15</sup> and since then, many autochthonous cases have emerged in Caribbean, United States, Mexico and Central America, South America, including Brazil and Andean countries<sup>16</sup>. In Brazil, the first autochthonous cases of the Asian and ECSA genotypes were reported in 2014 in the North and Northeast cities of Oiapoque (Amapá State) and Feira de Santana (Bahia State), respectively<sup>10,17</sup>. In 2015, 38,332 chikungunya suspected cases distributed in 696 municipalities were reported and, until the 32<sup>nd</sup> Epidemiological Week of 2016, a total of 216,102 suspected cases distributed in 2,248 municipalities were reported in the country. Despite the highest incidence of chikungunya cases in the Northern region of Brazil, the virus spread to the Southeast region in 2015 and 18,173 cases were reported during 2016, with 13,058 of those restricted to the city of Rio de Janeiro<sup>18</sup>.

The exponential growth of chikungunya cases in Rio de Janeiro represents a serious public health problem, especially due to the current co-circulation with dengue and zika. As both Asian and ECSA genotypes were introduced in Brazil in 2014, the viral surveillance is of great importance to access the impact over a population, as the role of distinct genotypes in the disease severity and chronicity are still not well understood. Moreover, the monitoring and characterization of CHIKV genotypes allow the identification of possible mutations such as the E1-A226V, of described epidemiological impact<sup>9,12</sup>. Despite the increased incidence of the disease in the past year, the information of CHIKV genotypes circulating in Brazil is still scarce. Here, we aimed to perform the genotype characterization of CHIKV strains detected during the ongoing 2016 outbreak in Rio de Janeiro, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Ethical Statement

The samples analyzed in this study were from the an ongoing project for arbovirus research in Rio de Janeiro, Brazil approved by resolution number CSN196/96 from the Oswaldo Cruz Foundation Ethical Committee in Research (CEP 111/000), Ministry of Health-Brazil. All participating subjects provided a written consent.

### Clinical samples

The plasma samples analyzed in this study were collected from April 2016 to May 2016 during the chikungunya outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. Patients were assisted at the Hospital Rio Laranjeiras (HRL) where an infectious disease physician collected data on demographic characteristics, symptoms and physical signs using a structured questionnaire. Chikungunya suspected cases (n=91) were obtained during an active surveillance performed by the Laboratory of Viral Immunology, IOC/FIOCRUZ. All cases were submitted to the Real Time RT-PCR for CHIKV genome detection<sup>19</sup> and to the anti-CHIKV ELISA IgM kit (Euroimmun, Lubeck, Germany), according to the manufacturer's protocol. Chikungunya infection was laboratorially confirmed by at least one diagnostic method in 76.97% (70/91) of the cases, 48.57 (34/70) by serology and 84.28 (59/70), by Real Time RT-PCR. Moreover, 35.85% (23/70) of the cases were confirmed by both methods. Chikungunya positive cases (n=10) by Real Time RT-PCR, were randomly selected for partial sequencing (E1 gene) and phylogenetic analysis. The epidemiological data and clinical manifestations from the confirmed cases sequenced in this study are available on Figure 1.

Case	Age	Gender	Days of disease	Fever	Chills	Headache	Coryza	Conjunctival hyperemia	Retro-orbital pain	Myalgia	Low back pain	Arthralgia	Anorexia	Prostration	Dizziness/Vertigo	Nausea	Abdominal pain	Itching	Erythema	Arthritis	Edema	Petechiae
Patient#1	39	F	2	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	Symmetric and Polyarticular	N	N
Patient#2	61	F	13	N	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	Y	N	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
Patient#3	42	F	4	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	Y	N	N	Y	Y
Patient#4	45	M	2	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N
Patient#5	21	M	1	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N
Patient#6	49	F	4	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N	Y	Y	Y	N	Y	N	N	Y	Polyarticular	Y	N
Patient#7	56	F	2	Y	N	N	Y	Y	N	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	Y	Symmetric	Y	N
Patient#8	52	F	3	Y	Y	Y	N	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Symmetric and Polyarticular	Y	N
Patient#9	63	M	2	Y	N	Y	N	N	N	Y	N	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	N	N	N
Patient#10	66	M	6	Y	N	Y	N	N	Y	Y	N	Y	N	N	N	Y	N	Y	N	Symmetric	Y	N

F=Female; M=Male; Y=Yes; N=No.

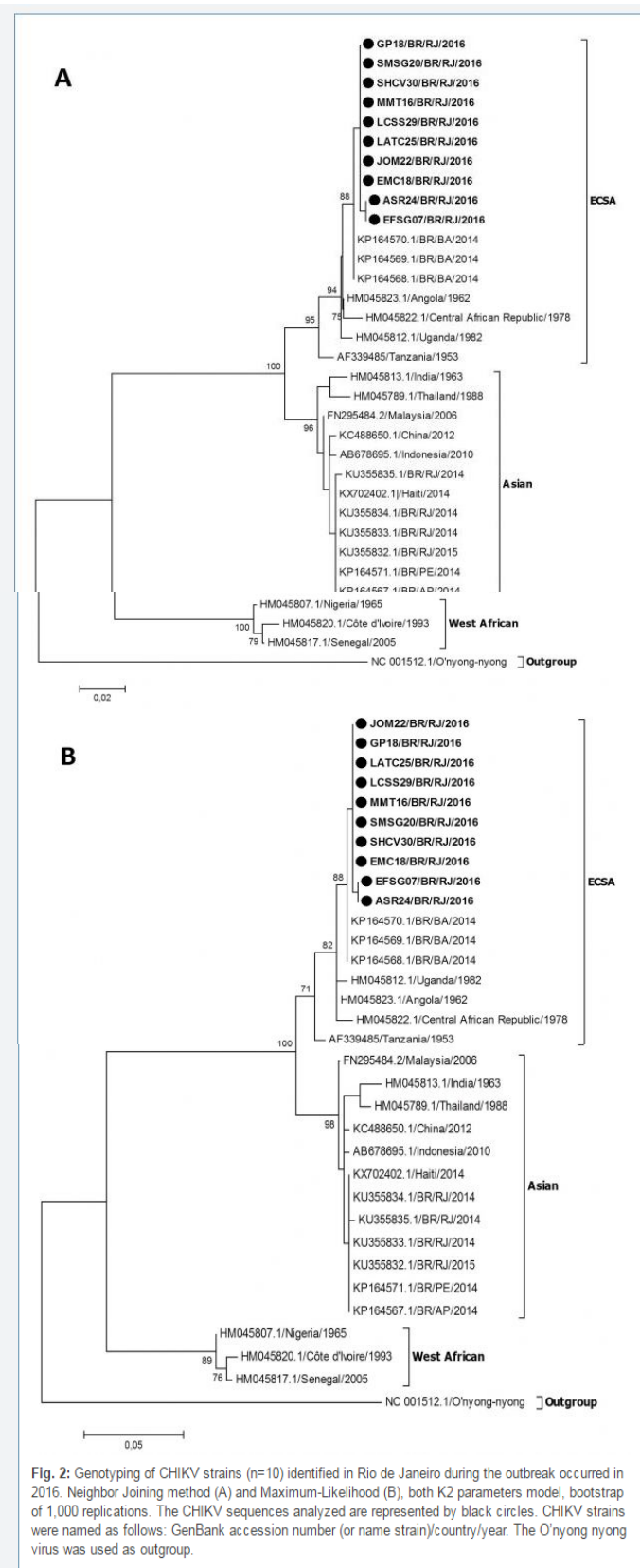
Fig. 1: Epidemiological data and clinical manifestations from the chikungunya confirmed cases (n=10) sequenced in this study.

### Chikungunya virus genome amplification, sequencing and phylogenetic analysis

The fragments generated were purified using PCR Purification Kit or Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., Germany) and sequenced in both directions using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version 3.1 kit (Applied Biosystems®, California, USA). The thermocycling conditions consisted of 40 cycles of denaturation (94°C/10 sec), annealing (50°C/5 sec) and extension (60°C/4 min). Sequencing was performed on an ABI 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems®, California, USA<sup>21</sup>. The sequences analysis was performed using BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). sequences' identity was performed using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and alignments using CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The data set was constructed with sequences previously deposited on GenBank and representative of each genotype and with sequences identified using BLAST. Phylogenetic trees were constructed using the MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>), by the "Neighbor-Joining" method and Maximum-Likelihood, Kimura-2 parameter model (K2), with a bootstrap of 1,000 replications. Both methods were used as confirmation of the results. The trees was built based on the analysis of the best fit for model, as provided by the software. Partial CHIKV genome sequences were deposited in GenBank and accession number were as follow: KX966400 to KX966409.

## RESULTS

The molecular characterization and phylogenetic analysis of representative strains (n=10) of CHIKV detected in infected patients during the 2016 outbreak in Rio de Janeiro was performed in comparison to reference sequences available on GenBank and were used to represent the Asian, ECSA and West Africa genotypes. The results, based on a 375-basepair fragment, showed that all the analyzed strains grouped in the ECSA genotype branch, together with a sequence from a sample identified in Bahia in 2014 (Figure 2).



The molecular characterization of the E1 fragment revealed that the alanine amino acid was present at the E226 position, showing no A226V mutation. Interestingly, a K211T amino acid substitution was identified in all analyzed samples and a V156A substitution was identified in two samples of this study (Figure 3). Furthermore, the CHIKV sequences identified in Bahia belonging to the ECSA genotype did not show this substitution at the 211 amino acid and where a lysine (K) is found in the prototype.





Fig. 3: Analysis of the amino acid substitutions (positions 103 to 227) based on partial sequencing of the envelope 1 (E1) gene of the CHIKV ECSA genotype identified during the 2016 outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. V: Valine; T: Treonine; K: Lisine; A: Alanine.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

CHIKV has been responsible for important emerging and reemerging epidemics characterized by severe and incapacitating polyarthralgia syndrome <sup>8,22</sup>. Due to the intense movement of viremic travelers arising from Africa, India and Indian Ocean islands, many imported cases of the disease were reported on American, European and Asian countries since 2006 <sup>11,13</sup>.

The high vector density, the presence of susceptible individuals and the intense movement of people has characterized Brazil as a country of major risk for the occurrence of epidemics by arboviruses. After its introduction, CHIKV has caused outbreaks in many regions of Brazil, mainly affecting the Northern region. Despite that, the Southeast Region has played an important role in the disease epidemiology, as imported cases were reported since 2010 and most autochthonous CHIKV cases during 2015 and 2016 <sup>18,23</sup>.

The exponential growth of CHIKV cases in Rio de Janeiro represents a serious public health problem and the co-circulation of three arboviruses (DENV, CHIKV and ZIKV) results in difficult differential diagnosis <sup>24</sup>. Prior to this study, no phylogenetic information was available on the autochthonous CHIKV strains circulating in Rio de Janeiro and, the data available was from the Asian genotype characterized in imported cases analyzed in 2014 and 2015 <sup>25</sup>.

From our knowledge, this is the first report on the ECSA genotype circulation during the 2016 outbreak in Rio de Janeiro. This genotype was first reported in Feira de Santana, Bahia, Northeast region of Brazil, during 2014 and studies revealed that the strains originated from Angola (West Africa). Moreover, it was the first time that this genotype was reported in Americas. The other CHIKV introduction in Brazil was from the Asian genotype in Oiapoque, Amapá, North Brazil, also during 2014 and, studies revealed that those strains were originated from the Caribbean and South America <sup>10,17,26</sup>. Additionally, the molecular characterization the E1 gene fragment analyzed showed that an alanine was present at the E226 position, therefore showing no A226V mutation. Studies performed during the 2005-2006 epidemic occurred in the Reunion Island characterized that this mutation was responsible for generating the IOL, responsible for an increased CHIKV transmission by the vector *Ae. albopictus* <sup>9,12,13,14</sup>. Furthermore, the E1 gene represents a target region for this analysis due to the high antigenic variability, role in the attachment, viral entry into target cells and viral replication during CHIKV infection <sup>7,27</sup>. However, this study revealed a K211T amino acid substitution in all samples analyzed and a V156A substitution in two sequences. The former substitution was not identified in the strains from Bahia, which has a Lysine (K) as in the reference strain (Angola/1962). Further studies are needed to clarify the consequences of those mutations, including to the mosquitoes fitness and the human immune system, but other studies suggest that new mutations such as L210Q, I211T and G60D in the E2 region of the IOL also offer advantages for the transmission of CHIKV by *Ae. albopictus* <sup>18,29,29</sup>. The mutations K211E on E1 and V264A on E2 were reported to impact *Ae. aegypti*'s fitness in India during the 2006 to 2010 epidemic <sup>30,31</sup>.

This study provides the first genotype surveillance of autochthonous CHIKV cases during the 2016 epidemic in Rio de Janeiro and stress the need for monitoring the spread of the distinct genotypes and the identification of possible mutations that may facilitate the viral transmission by the mosquitoes' vectors. None of the chikungunya patients were hospitalized or had other complications related to classic rheumatologic chikungunya syndrome. Rio de Janeiro is an important port of entrance and spread of arboviruses, as observed for the distinct DENV serotypes. The recent events occurred in Rio de Janeiro also reinforces the need for viruses' surveillance and characterization.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

FBS and FBN designed the study. TMAS and FBN implemented the sequencing study, analyzed the data and wrote the paper. PCGN, JBC, FPP, LSB and MCC collected and processed the samples. TCC and NRFC analyzed the data. PVD and CS assisted the patients during cases investigation and samples collection. ELA and RMRN provided the laboratory structure and funding for carrying out the experiments. FBS is the guarantor of the paper.

## EQUAL CONTRIBUTION

Flavia Barreto dos Santos and Fernanda de Bruycker-Nogueira contributed equally to the work

## COMPETING INTEREST

The authors have declared that no competing interests exist.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Partial CHIKV genome sequences data are available in GenBank with the following accession numbers: KX966400, KX966401, KX966402, KX966403, KX966404, KX966405, KX966406, KX966407, KX966408 and KX966409.

## CORRESPONDING AUTHORS

Flavia Barreto dos Santos: flaviab@ioc.fiocruz.br and Fernanda de Bruycker-Nogueira: nandanog@ioc.fiocruz.br.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Ana Maria Bispo de Filippis, Head of the Flavivirus Laboratory, IOC/FIOCRUZ for lab support, to the staff of the Rio Laranjeiras Hospital and to the Parasitology Postgraduate Program at Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ.

## REFERENCES

- Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3(7):e263. doi: 10.1371/journal.pmed.0030263. PubMed PMID: 16700631; PubMed Central PMCID: PMC1463904.
- Griffin DE. Alphaviruses. In: D M. Knipe, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007. p. 1023-68.
- Simon F, Parola P, Grandadam M, Fourcade S, Oliver M, Brouqui P, et al. Chikungunya infection: an emerging rheumatism among travelers returned from Indian Ocean islands. Report of 47 cases. *Medicine (Baltimore)*. 2007;86(3):123-37. doi: 10.1097/MD.0b013e31806010a5. PubMed PMID: 17505252.
- Volk SM, Chen R, Tssetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010;84(13):6497-504. doi: 10.1128/JVI.01603-09. PubMed PMID: 20410280; PubMed Central PMCID: PMC2903258.
- Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491-562. PubMed PMID: 7968923; PubMed Central PMCID: PMC1463904.
- Khan AH, Morita K, Parquet Md MeC, Hasebe F, Mathenge EG, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 12):3075-84. doi: 10.1099/0022-1317-83-12-3075. PubMed PMID: 12466484.
- Lum FM, Ng LF. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* 2015;120:165-74. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.06.009. PubMed PMID: 26092642.
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7(12):925-32. doi: 10.1016/S1995-7645(14)60164-4. PubMed PMID: 25479619.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011;1(4):310-7. doi: 10.1016/j.coviro.2011.07.004. PubMed PMID: 21966353; PubMed Central PMCID: PMC3182774.
- Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med.* 2015;13:102. doi: 10.1186/s12916-015-0348-x. PubMed PMID: 25976325; PubMed Central PMCID: PMC4433093.
- Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol.* 2015;64:144-52. doi: 10.1016/j.jcv.2014.08.032. PubMed PMID: 25453326.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007;3(12):e201. doi: 10.1371/journal.ppat.0030201. PubMed PMID: 18069894; PubMed Central PMCID: PMC1234949.
- Thiboutot MM, Kannan S, Kawalekar OU, Shedlock DJ, Khan AS, Sarangan G, et al. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(4):e623. doi: 10.1371/journal.pntd.0000623. PubMed PMID: 20436958; PubMed Central PMCID: PMC2860491.
- Leparc-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet.* 2014;383(9916):514. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9. PubMed PMID: 24506907.
- PAHO. Pan American Health Organization. Alerta epidemiológica. Fiebre por Chikungunya. Washington 2013 [cited 2015]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=)
- PAHO. Pan American Health Organization. Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2013-2015 (por semanas) Semana Epidemiológica/SE6 Washington 2015 [cited 2015 February 15 2015]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=readall&cid=5927&](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&)
- Teixeira MG, Andrade AM, Costa MaC, Castro JN, Oliveira FL, Goes CS, et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(5):906-7. doi: 10.3201/eid2105.141727. PubMed PMID: 25898939; PubMed Central PMCID: PMC4412231.
- SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Volume 47 - nº 33 - 2016 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32. 2016. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/setembro/16/2016-028---Dengue-SE32.pdf>.
- Lancioti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(5):764-7. doi: 10.3201/eid1305.070015. PubMed PMID: 17553261; PubMed Central PMCID: PMC1234949.
- Collao X, Negrodo AI, Cano J, Tenorio A, Ory F, Benito A, et al. Different lineages of Chikungunya virus in Equatorial Guinea in 2002 and 2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(3):505-7. doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0435. PubMed PMID: 20207882; PubMed Central PMCID: PMC2829918.
- Otto TD, Vasconcelos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonça-Lima L, et al. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res.* 2008;7(3):861-71. PubMed PMID: 18949705.
- PAHO. Pan American Health Organization. Factsheet Chikungunya 2014 [10/12/2015]. Available from: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=8303&Itemid=40023&en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8303&Itemid=40023&en).
- Albuquerque IG, Marandino R, Mendonça AP, Nogueira RM, Vasconcelos PF, Guerra LR, et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(1):128-9. PubMed PMID: 22370844.
- Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004636. doi: 10.1371/journal.pntd.0004636. PubMed PMID: 27070912; PubMed Central PMCID: PMC4829157.
- Conteville LC, Zanella L, Marín MA, Filippis AM, Nogueira RM, Vicente AC, et al. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2015. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(5):347-8. doi: 10.1590/0074-02760160004. PubMed PMID: 27120007; PubMed Central PMCID: PMC4878304.
- Parreira R, Centeno-Lima S, Lopes A, Portugal-Calisto D, Constantino A, Nina J. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Euro Surveill.* 2014;19(10). PubMed PMID: 24650864.
- Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology.* 2009;393(2):183-97. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.024. PubMed PMID: 19732931; PubMed Central PMCID: PMC2915564.
- Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CH, et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J Gen Virol.* 2008;89(Pt 11):2754-60. doi: 10.1099/vir.0.2008/005413-0. PubMed PMID: 18931072; PubMed Central PMCID: PMC23347796.
- Niyas KP, Abraham R, Unnikrishnan RN, Mathew T, Nair S, Manakkadan A, et al. Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Viol J.* 2010;7:189. doi: 10.1186/1743-422X-7-189. PubMed PMID: 20704755; PubMed Central PMCID: PMC2928196.
- Agarwal A, Shama AK, Sukumaran D, Parida M, Dash PK. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. *Virology.* 2016;497:59-68. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.025. PubMed PMID: 27423270.
- Sumathy K, Ella KM. Genetic diversity of Chikungunya virus, India 2006-2010: evolutionary dynamics and serotype analyses. *J Med Virol.* 2012;84(3):462-70. doi: 10.1002/jmv.23187. PubMed PMID: 22246833.

Tags: Brazil · Chikungunya · ECSA genotype · Rio de Janeiro · Surveillance

# APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
<b>Instituição:</b> Fundação Oswaldo Cruz-IOC
<b>Projeto de Pesquisa:</b> Vírus DENGUE, ZIKA e CHIKUNGUNYA: uma abordagem multidisciplinar para a caracterização dos aspectos epidemiológicos, virológicos e imunológicos em apoio à investigação do impacto destas arboviroses no Brasil.
<b>Investigadores:</b>
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> ESTUDAR AS DOENÇAS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

**FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.**

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do Hospital Rio-Laranjeiras. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

**MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.**

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

Nome : \_\_\_\_\_

Eu, Responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: \_\_\_\_\_

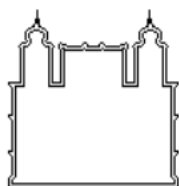
Nome : \_\_\_\_\_

Assinatura : \_\_\_\_\_

Pesquisadores:

Dra.Elzinandes L Azeredo (021) 97183-9093.

# APÊNDICE C - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CNS 466/12)



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 13 de maio de 2014.

## Solicitação de extensão do prazo de execução de projeto e emenda

**Título do Projeto:** *"Dengue no Brasil: vigilância virológica, epidemiologia molecular e padronização de método sorológico utilizando antígenos recombinantes".*

**Protocolo de pesquisa:** 274/05

**Pesquisador Responsável:** Dra. Rita Maria Ribeiro Nogueira.

**Instituição:** Laboratório de Flavivírus do IOC/Fiocruz

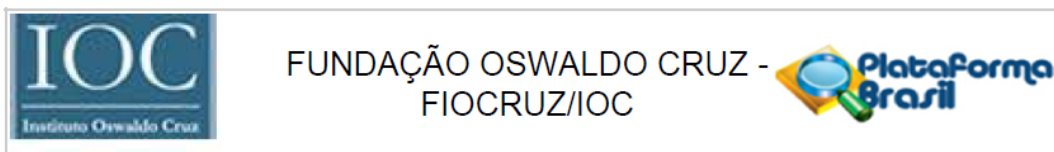
Foi submetido à apreciação do CEP Fiocruz/IOC e APROVADA a solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado até 2016, e a emenda solicitando a inclusão de Biomanguinhos como colaborador do projeto.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação da solicitação de extensão do prazo de execução do projeto supracitado.

Informamos que deverão ser apresentados relatórios parciais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

**José Henrique da Silva Pilotto**  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
(CEP Fiocruz-IOC)

# APÊNDICE D - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CAAE: 30757314.1.0000.5248)



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DE DENGUE E OUTRAS ARBOVIROSES EM CASOS FEBRIS OCORRIDOS EM MACAPÁ E A POTENCIAL UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIMES ALTERNATIVOS

**Pesquisador:** FLAVIA BARRETO DOS SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30757314.1.0000.5248

**Instituição Proponente:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 720.338

**Data da Relatoria:** 08/07/2014

#### Apresentação do Projeto:

O monitoramento dos sorotipos de vírus dengue (DENV) numa região é extremamente importante dado que o conhecimento dos vírus associados às epidemias poderá ajudar a prever a gravidade de surtos futuros. Frente às limitadas opções de prevenção e controle das epidemias, o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental no Sistema de Vigilância Epidemiológica, através do monitoramento contínuo das infecções, confirmando novos casos e identificando os sorotipos circulantes. Ademais, é de relevância para o diagnóstico diferencial a investigação de outros arbovírus em casos febris nos quais a infecção por DENV não foi confirmada, uma vez que muitos dos sinais e sintomas dessas arboviroses são compartilhados. Em regiões de difícil acesso ou remotas, como às encontradas nas regiões do estado do Amapá (AP), a utilização de métodos de coleta alternativos e menos invasivos torna-se uma grande contribuição a investigação destes agravos. Portanto, visamos neste Projeto identificar os sorotipos de DENV circulantes no AP detectados a partir de casos suspeitos recebidos no Laboratório Central (LACEN-AP) sob demanda espontânea e investigar os casos febris negativos para dengue para a identificação de outros arbovírus.

**Metodologia:** Serão analisados casos suspeitos de dengue ocorridos no Estado do Amapá no

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 720.338

período de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2017. Os casos febris negativos serão analisados para a identificação de outros arbovirus. Amostras de saliva, urina e sangue seco coletado por punção digital em papel de filtro, serão testados adicionalmente às amostras de soro recebidas. As amostras de soro, sangue ou plasma serão provenientes de Postos de Saúde e Hospitais dos municípios do estado do Amapá e de pacientes recebidos, por demanda espontânea, no LACEN-AP. Os pacientes atendidos no LACEN-AP serão convidados a participar da pesquisa para coleta dos espécimes alternativos após a assinatura TCLE. As amostras recebidas serão acompanhadas por fichas epidemiológicas contendo identificação e dados referentes à coleta, observações clínicas do caso, entre outros dados relevantes para o seu processamento. Total de participantes: 500 pessoas

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Estudar casos febris ocorridos no estado do Amapá para a investigação de dengue e outras arboviroses em amostras de soro e espécimes alternativos para o diagnóstico laboratorial.

Objetivo Secundário:

- Investigar casos suspeitos de dengue recebidos sob demanda espontânea no LACEN AP utilizando o diagnóstico sorológico (captura de IgM e NS1);
- Implantar o RT-PCR convencional para a detecção dos sorotipos de DENV circulantes no Amapá em apoio a vigilância da doença no Brasil;
- Realizar a genotipagem e caracterização molecular dos sorotipos de DENV detectados no Amapá no período de estudo;
- Investigar e caracterizar outras arboviroses em casos febris negativos para dengue recebidos sob demanda espontânea no LACEN-AP por métodos moleculares e/ou sorológicos;
- Avaliar a utilização de espécimes alternativos (saliva, urina e sangue seco em papel de filtro) no diagnóstico de casos suspeitos de dengue e não dengue

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 720.338

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos informados: risco mínimo ao paciente, uma vez que emprega a obtenção de saliva, coleta de sangue por punção venosa e digital e coleta de urina. Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada de sangue, dor ou rouidão no local da coleta.

Benefícios informados: investigação e determinação da etiologia de casos febris recebidos no LACEN-AP na suspeita de dengue. É objeto principal deste Projeto, a implantação de uma ferramenta molecular (RT-PCR), sensível e ainda não disponível para a identificação dos sorotipos de dengue no Amapá em apoio a vigilância destes vírus no país. Adicionalmente, visa-se estabelecer a utilização de espécimes alternativos frente à coleta de sangue por punção venosa para o diagnóstico laboratorial e reduzir o custo do envio de amostras ao LACEN pela utilização de coleta em papel de filtro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado. É do Grupo III, e, portanto, não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado. Nessa segunda versão do projeto, a pesquisadora responsável incluiu os documentos solicitados no primeiro parecer.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados a folha de rosto, projeto de pesquisa, cronograma atualizado, orçamento da pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido.

**Recomendações:**

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 720.338

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 195ª Reunião Ordinária, realizada em 15.07.2014, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

RIO DE JANEIRO, 16 de Julho de 2014

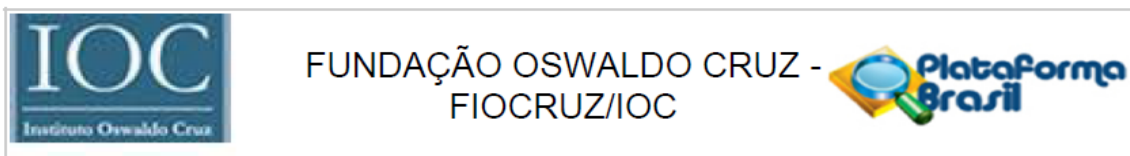
---

**Assinado por:**  
**José Henrique da Silva Pilotto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



# APÊNDICE E - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/FIOCRUZ (CAAE: 57221416.0.1001.5248)



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR EM APOIO À INVESTIGAÇÃO DESTAS ARBOVIROSES NO BRASIL

**Pesquisador:** FLAVIA BARRETO DOS SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 57221416.0.1001.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ  
FUNDACAO OSWALDO CRUZ

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.920.256

#### **Apresentação do Projeto:**

"As epidemias causadas por dengue, chikungunya e zika constituem um sério problema de Saúde Pública brasileira, com grande impacto para sociedade. Dadas às limitadas opções de prevenção e controle, é demonstrado que o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental para o tratamento oportuno dos pacientes. Os quatro sorotipos de DENV variam em termos de patogenicidade e virulência, e a imunopatologia da doença pode estar diretamente associada ao vírus, às diferenças nos sorotipos e genótipos. O CHIKV introduzido no país é conhecido por causar uma doença considerada benigna até então, porém, apresentações atípicas e complicações neurológicas, cardíacas, renais, oculares e de pele, já foram reportadas. A infecção pelo ZIKV não era associada a complicações grave, no entanto, relatos da síndrome de Guillain-Barré foram descritos. O aumento significativo de casos de microcefalia em fetos, possivelmente associada à infecção pelo ZIKV foi reportado. O presente Projeto é resultante da formação de uma Rede proposta que visa atender às demandas emergenciais de enfrentamento do dengue, zika e chikungunya no âmbito da Saúde Pública nacional e propõe uma abordagem multidisciplinar que contribua nas áreas da vigilância epidemiológica, aspectos clínicos, diagnóstico laboratorial, fisiopatologia das infecções e desenvolvimento tecnológico. A integração entre a rede ocorrerá

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.920.256

entre as diferentes frentes propostas que compreenderá a vigilância e investigação de casos, dos vírus e os dados gerados serão compartilhados entre as partes e divulgados. O Laboratório de Flavivírus IOC/FIOCRUZ, estabelecido em 1986, é Centro de Referência Regional de Dengue e Febre Amarela e mais recentemente, Chikungunya e Zika para o Ministério da Saúde. Possui entre suas atribuições, supervisões e capacitação de Laboratórios Centrais dos Estados e/ou Laboratórios locais integrantes da sub rede de diagnóstico. Desenvolve linhas de pesquisa relacionadas ao desenvolvimento e implantação de métodos de diagnóstico laboratorial, investigação de casos clínicos e fatais, epidemiologia, epidemiologia molecular e desenvolvimento tecnológico. Foi responsável pela isolamento de três dos quatro sorotipos de DENV no Brasil e identificação dos primeiros casos de Chikungunya e Zika no Rio de Janeiro. O Laboratório de Imunologia Viral, IOC/FIOCRUZ tem como missão o estudo imunopatológico de infecções virais humanas, com ênfase na dengue, o estudo de mono e coinfeções virais, com sintomatologia indiferenciada da dengue, parvovirose e a chikungunya. A Rede conta com colaboração do Dr Rivaldo Venâncio da Cunha da UFMS e FIOCRUZ Cerrado, MS e membro dos Grupos Assessores Técnicos para Dengue e Chikungunya da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), do Dr. Paulo Damasco do Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ) e Dr Luiz José de Souza do Centro de Referência da dengue – Campos dos Goytacazes, RJ. Compõe ainda a Rede proposta, o Instituto De Biologia do Exército, que visa prestar assistência, aos usuários do Sistema de Saúde do Exército mediante apoio no diagnóstico laboratorial, pesquisa e produção de imunobiológicos. Colaboradores da SES/RJ, UNIRIO, UFRJ, UERJ, PUC Rio e FIOCRUZ, representados por Laboratórios do IOC, ENSP e ICIT vêm contribuir para o caráter multidisciplinar da proposta."

#### **Objetivo da Pesquisa:**

##### **"OBJETIVO PRINCIPAL**

Investigar os aspectos clínico-epidemiológicos, virológicos e imunopatológicos de casos de dengue, chikungunya e zika em apoio ao conhecimento do impacto destas arboviroses no Rio de Janeiro e Brasil.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, VIROLOGICA E DIAGNOSTICO LABORATORIAL:**

(i) Descrever os aspectos clínico-epidemiológicos, laboratoriais e imunológicos de casos de infecção pelos DENV, ZIKV, CHIKV e outras arboviroses ocorridos no RJ e Estados colaboradores, recebidos no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro Referência Regional para o Ministério da Saúde e coletados a partir de colaborações estabelecidas pelo Laboratório de Flavivírus e pelo

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.920.256

Laboratório de Imunologia Viral, IO/FIOCRUZ;

- (ii) Realizar a vigilância dos genótipos circulantes e análise metagenômica do viroma dos arbovirus detectados,
- (iii) Descrever o perfil epidemiológico dos DENV, ZIKV, CHIKV nas gestantes, nas microcefalias e nas complicações neonatais associadas à transmissão destes vírus;
- (iv) Correlacionar a base de dados de notificações de doenças exantemáticas, microcefalia e resultados laboratoriais com o georreferenciamento estadual de DENV, ZIKV, CHIKV;
- (v) Constituir pólo sentinela de vigilância epidemiológica para dengue, zika e chikungunya no território de Manguinhos a fim de descrever a frequência das manifestações clínicas e laboratoriais das três arboviroses e a distribuição espaço-temporal dos casos no território;
- (vi) Realizar o acompanhamento e investigação de gestantes com sintomatologia de ZIKV e casos de microcefalia pelo Centro de Referência de Dengue e Maternidade Referência do Município de Campos dos Goytacazes, RJ, por Hospitais e Maternidades sediados no estado do RJ e Estados colaboradores;
- (vii) Promover a descentralização do diagnóstico de CHIKV e ZIKV para mais de um grupo de colaboradores possibilitando a melhoria da capacidade diagnóstica no RJ e Estados colaboradores;
- (viii) Propor um modelo de formação profissional para ACE e ACS, com ênfase na territorialização, visando à melhoria na qualidade do serviço no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

#### ASPECTOS CLINICOS, FISIOPATOLOGICOS E VACINAS:

- (i) Selecionar epítomos de células T e B mais imunogênicos em proteínas dos DENV, CHIKV e ZIKV por predição in silico e de acordo com os alelos de HLA mais frequentes dos pacientes recrutados;
- (ii) Determinar a carga viral de casos de infecção pelos DENV, CHIKV e ZIKV correlacionando-a com o quadro clínico;
- (iii) Quantificar níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes com DENV, CHIKV ou ZIKV e correlacionar com dados clínicos, hematológicos, bioquímicos;
- (iv) Realizar a análise histopatológica de casos fatais de DENV recebidos retrospectivamente e prospectivamente durante 30 anos e na disponibilidade de casos fatais por ZIKV e CHIKV;
- (v) Avaliar a interação vírus-hospedeiro do ZIKV em diferentes linhagens celulares in vitro;

#### DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO:

- (i) Avaliar por dinâmica molecular, o impacto da mutação P250L na estabilidade da NS1 dos flavivírus;

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.920.256

- (ii) Obter modelo de estrutura da NS1 do ZIKV e obter moléculas candidatas à inibição desta proteína;
- (iii) Avaliar a eficácia das moléculas candidatas à inibição da infecção por ZIKV em modelos de infecção in vitro em atuação conjunta com Laboratórios da Rede;
- (iv) Obter e caracterizar nanopartículas com caráter Janus para potencial utilização testes de diagnóstico precoce do dengue baseados na NS1.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **RISCO DA PESQUISA**

Os autores mencionam os possíveis riscos do estudo e também os cuidados a serem tomados de forma a evitá-los e/ou minimizá-los. Conforme a seguir: "...desconfortos relacionados com a retirada de sangue, dor ou rouidão no local da coleta. Com intuito de evitar esse risco utilizaremos pessoal treinado e capacitado para a realização de coleta de sangue. Em caso de rouidão os participantes da pesquisa serão avaliados pelo corpo médico e será fornecido os medicamentos para o tratamento do hematoma. Deve ser considerado também a possibilidade de ocorrer estresse e constrangimentos na aplicação dos TCLEs e formulários, por isso contaremos com uma equipe treinada para aplicar os termos e formulários de forma com que os participantes não se sintam obrigados a participar da pesquisa e também sejam devidamente orientados com linguagem clara e adequada de todos os procedimentos submetidos as amostras de cada participante."

##### **BENEFÍCIOS DA PESQUISA**

O estudo proposto menciona benefícios indiretos, conforme a seguir: "...atender às demandas emergenciais de enfrentamento do dengue, zika e chikungunya no âmbito da Saúde Pública nacional e propõe uma abordagem multidisciplinar que contribua nas áreas da vigilância epidemiológica, clínica, diagnóstico laboratorial, fisiopatologia e desenvolvimento tecnológico."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto envolvendo diferentes instituições com uma proposta relevante pela necessidade de obtenção de conhecimentos sobre o perfil epidemiológico das doenças exantemáticas nas gestantes e das microcefalias notificadas, principalmente pelos perfis atípicos ocorridos nas infecções por DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA e pela escassez de estudos sobre a patogênese das infecções pelos vírus em questão. Somado a isso, o estudo propõe a capacitação dos ACE e ACS como estratégia para a construção de conhecimento sobre as formas de prevenção de doenças e

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.920.256

nas ações de promoção da saúde e implantar um pólo de vigilância sentinela para arboviroses de base territorial no bairro de Manguinhos e analisar a distribuição espacial dos casos notificados e e confirmados no Estado do Rio de Janeiro, por meio do georreferenciamento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Nesta versão foram apresentados e analisados documentos abaixo relacionados, necessários ao atendimento das pendências apontadas na última avaliação. Todos postados em 16/01/2017.

- 1)PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_731199.pdf - Projeto formato Plataforma Brasil
- 2)Biorrepositório 160117.pdf- Regimento interno de Biorrepositório do laboratório de imunologia viral do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, em papel não timbrado contemplando os seguintes itens: Descrição do Biorrepositório; composição; fontes dos materiais biológicos humanos e dos dados clínicos; segurança da informação protegida sobre saúde; armazenamento de amostras; obrigações e renúncia; disposições gerais. Datado de 16/01/2017 e assinado pelas pesquisadoras Dras. Flávia Barreto dos Santos - Pesquisadora Responsável pelo Biorrepositório do Laboratório de Imunologia Viral (LIV/IOC/Fiocruz); Luzia Maria de Oliveira Pinto Vice-chefe do Laboratório de Imunologia Viral (LIV/IOC/FIOCRUZ) e Elzinandes Leal de Azeredo Chefe do Laboratório de Imunologia Viral (LIV/IOC/FIOCRUZ)
- 3)ANEXOIX.doc-Termo de consentimento de autorização para o armazenamento e utilização do material biológico coletado - Documento redigido em papel timbrado
- 4) ANEXOV.doc - Termo de consentimento livre e esclarecido/Coleta de amostra para a detecção de dengue, zika e chikungunya em casos de natimortos - Documento redigido em papel timbrado
- 5)ANEXOIII.doc - Termo de consentimento livre e esclarecido /Tcle gestante - Documento redigido em papel timbrado
- 6)ANEXOI.doc - Termo de consentimento livre e esclarecido/coleta de amostra para a detecção de dengue, zika e chikungunya – Documento redigido em papel timbrado
- 7)Alteracoes160117.pdf- Carta resposta redigida em papel timbrado com considerações e comentários referentes à pesquisa dengue, zika e chikungunya: uma abordagem multidisciplinar em apoio à investigação destas arboviroses no Brasil destinada ao Comitê de Ética em Pesquisa – IOC/FIOCRUZ; assinada pela pesquisadora Dra. FLAVIA BARRETO DOS SANTOS e datada de 16/01/2017.

**Recomendações:**

Segundo RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012, “A responsabilidade do pesquisador

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.920.256

é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.”

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências abaixo foram apontadas na avaliação anterior e foram atendidas plenamente. Sendo assim, não há, na versão atual, pendências ou inadequações que impossibilitem o início do estudo proposto.

Pendências e inadequações atendidas:

- 1) A versão do projeto formato PB foi atualizada, segundo as alterações da versão completa do projeto. Os dois documentos são correspondentes.
- 2) Foi anexado o regimento interno de biorrepositorio do laboratório de imunologia viral do instituto oswaldo cruz/fiocruz, conforme exigência da Norma operacional 001/2013, Resolução CNS 441/2011 3 Portaria 2.201/2011.
- 3) Os TCLEs foram modificados em relação ao tempo de armazenamento de material biológico.
- 4) O cronograma foi ajustado de acordo com a data de obtenção da licença CEP.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se por APROVAR o projeto de pesquisa CAAE: 57221416.0.1001.5248, na 224ª Reunião e comunica que:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.920.256

O participante de pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_731199.pdf	16/01/2017 23:17:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEPREDEDENGUE.doc	16/01/2017 23:14:03	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VII_CEP_1609597_ACS.pdf	16/01/2017 23:12:17	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VI_CEP_1639471.pdf	16/01/2017 23:12:01	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_II_CEP_HPC.pdf	16/01/2017 23:11:41	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VIII_TERMOS_DE_CONFIDENCIALIDADE.pdf	16/01/2017 23:10:01	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	16/01/2017 23:08:52	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_IV_QUESTIONARIO_GESTANTE.pdf	16/01/2017 23:07:42	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Anuencia_MS.pdf	16/01/2017 23:06:40	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_RIOLARANJEIRAS.pdf	16/01/2017 23:05:48	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIAIBEX.pdf	16/01/2017 23:05:26	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIACAMPOS.pdf	16/01/2017 23:05:07	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração do Patrocinador	OUTORGA_FAPERJ.pdf	16/01/2017 23:01:25	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	ANEXOIX.doc	16/01/2017 22:44:59	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.920.256

Justificativa de Ausência	ANEXOIX.doc	16/01/2017 22:44:59	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio160117.pdf	16/01/2017 22:40:10	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Alteracoes160117.pdf	16/01/2017 22:37:04	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOIV.doc	16/01/2017 22:33:03	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOIII.doc	16/01/2017 22:32:03	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOII.doc	16/01/2017 22:31:17	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de Fevereiro de 2017

Assinado por:

Maria Regina Reis Amendoeira  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br