

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – ICBS

ANA CARLA EUGENIO LIMA

**BUSCA ATIVA RETROSPECTIVA POR INFECÇÕES PRECOSES PELO
VÍRUS CHIKUNGUNYA EM ALAGOAS ENTRE 2013 E 2014**

MACEIÓ

2021

ANA CARLA EUGENIO LIMA

**BUSCA ATIVA RETROSPECTIVA POR INFECÇÕES PRECOSES PELO
VÍRUS CHIKUNGUNYA EM ALAGOAS ENTRE 2013 E 2014**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Abel Borges

MACEIÓ

2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

- L732b Lima, Ana Carla Eugenio.
Busca ativa retrospectiva por infecções precoces pelo vírus chikungunya em Alagoas entre 2013 e 2014 / Ana Carla Eugenio Lima. – 2021.
62 f. : il., figs. e tabs. color.
- Orientadora: Alessandra Abel Borges.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: Licenciatura) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2021.
- Bibliografia: f. 56-62.
1. Chikungunya. 2. Infecções por arbovírus. 3. Diagnóstico. 4. Epidemiologia – Alagoas. I. Título.

CDU: 578.833.1/2 (813.5)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Claudionete Eugenio e Antônio Carlos, que com muito amor e dedicação não pouparam esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida. Sem eles muito dos meus sonhos não se tornariam realidade. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Jeová Deus, por ser a luz do meu caminho e que está comigo em todos os momentos da minha vida me permitindo a realização de mais essa etapa na minha vida. Agradeço a Ele todo o amor que demonstra por mim e por ser o maior mestre que eu poderia ter.

Agradeço especialmente também a minha querida orientadora, professora Dr^a Alessandra Abel Borges, pela oportunidade que me deu de aprender sobre o fascinante mundo da virologia e da pesquisa acadêmica. Obrigada por todos ensinamentos e pela paciência que teve comigo durante todo esse tempo juntas.

Aos professores Dr^a Claudia Duarte dos Santos e Dr. Juliano Bordignon do Instituto Carlos Chagas (ICC)/FIOCRUZ-PR pela colaboração, apoio e doação de materiais e reagentes que tornaram possíveis a execução desse trabalho.

A Ana Rachel, que me acolheu tão bem no LAPEVI, por toda as conversas, conselhos, abraços e ajudas nos cálculos dos experimentos. Muito obrigada, Ana!

Aos meus colegas de laboratório, Jesualdo Vasconcelos e Gabriel Cavalcante por toda ajuda nos experimentos.

Aos meus queridos companheiros que conheci na graduação: Rayane Ferreira, uma amiga prestativa que sempre esteve lá quando precisei; Cleverson Ferreira, o maior incentivador que eu poderia ter; Laís Freire, uma grande amiga que sempre me ajudou em todos os momentos; e o Marcus Weigel, por toda ajuda ao longo da graduação. A vocês a minha sincera gratidão por tornar a minha graduação mais leve e engraçada.

A minha estimada amiga Thayna Torres. Sou muito grata por tê-la conhecido e compartilhado inúmeras experiências, crises de riso e de choro. Obrigada por toda a ajuda não apenas na graduação, mas na vida, pois você é uma grande incentivadora dos meus projetos acadêmicos e pessoais. Muito obrigada por tudo!

A minha querida e amada mãe, Claudionete Eugenio, que desde sempre com todo o esforço me ensinou o caminho certo a seguir. Obrigada por todo o amor, paciência e carinho que sempre mostrou por mim, em todas as fases da minha vida. Sem você não teria conseguido chegar tão longe. Muito obrigada de todo o meu coração.

Ao meu querido e amado pai, Antônio Carlos, que sempre se esforçou para me dar o melhor. Obrigada pela inestimável ajuda, não apenas em assuntos acadêmicos, mas na minha vida sempre me apoiando ao longo da minha trajetória. Muito obrigada de todo o coração.

A minha família de consideração e de sangue (avós, tios, tias, boadrasta, irmã, primas) que são muitos, porém tenho em meu coração cada um deles. Obrigada por todo o apoio.

RESUMO

Chikungunya (CHIKV) é uma arbovirose transmitida por vetores do gênero *Aedes*. O vírus CHIKV é um *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*. Foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, em 1952-53, onde causava surtos locais, mas sofreu importante disseminação pelo mundo nas duas últimas décadas. É um vírus emergente no Brasil, inicialmente associado a casos importados, mas que se estabeleceu de forma endêmica no país, em anos muito recentes. A transmissão local do CHIKV, foi detectada no Brasil pela primeira vez em setembro de 2014. Desde 2015, Alagoas vem registrando oficialmente casos de infecções humanas por CHIKV, apesar da infecção por CHIKV poder ser identificada principalmente por detecção do RNA viral e por sorologia para pesquisa de anticorpos, o diagnóstico da maioria dos casos tem sido realizado apenas clinicamente. Ainda que as infecções por arbovírus vêm assumindo um papel de grande importância em anos recentes no Brasil, há dificuldade e carência de métodos laboratoriais capazes de confirmar o diagnóstico etiológico das infecções por diferentes arbovírus que causam doença com sintomas semelhantes, levando à subnotificação de casos de CHIKV e dados imprecisos sobre o real período de entrada da doença em Alagoas. O objetivo desse trabalho foi investigar, de forma retrospectiva, a ocorrência de infecções por CHIKV em Alagoas entre os anos de 2013 e 2014. Um total de 44 amostras de soro provenientes de um biorrepositório, coletadas de indivíduos com suspeita de dengue nos anos de 2013 e 2014, foram selecionadas para o estudo por terem se mostrado negativas nos testes diagnósticos para dengue e outros flavivírus realizados anteriormente. Dentre as amostras, algumas foram coletadas na fase aguda da doença febril (<7 dias do início dos sintomas) e outras na fase convalescente (>7 dias). As amostras foram triadas para confirmação de infecção por CHIKV através dos métodos de sorologia, RT-PCR e isolamento viral em cultura de células. Foram encontrados anticorpos anti-CHIKV IgM em 2 amostras e IgG em outras 4 amostras, coletadas entre os meses de junho e setembro de 2014. Em uma das amostras IgM-positiva, coletada em agosto de 2014, foi obtido sucesso no isolamento viral em células C6/36, que se confirmou positiva para a espécie CHIKV, através de RT-PCR do sobrenadante e através da marcação positiva do antígeno viral na reação de imunofluorescência. A estirpe deste isolado clínico foi chamada CHIKV Mcz630. Nossos dados conjuntos de sorologia e isolamento viral obtidos com amostras séricas coletadas em 2014 demonstram que o CHIKV já estava em circulação no estado de Alagoas desde aquele ano, e não somente desde 2015 como registram dados oficiais. Esses resultados sugerem inclusive que o CHIKV entrou em Alagoas antes do primeiro relato autóctone por CHIKV no Brasil.

Palavras-chave: Alagoas, Chikungunya, Busca retrospectiva.

ABSTRACT

Chikungunya (CHIKV) is an arbovirus transmitted by vectors of the genus *Aedes*. The CHIKV virus is an *Alphavirus*, belonging to the *Togaviridae* family. It was isolated for the first time in Tanzania, in 1952-53, where it caused local outbreaks, but it has been spread across the world in the past two decades. It is an emerging virus in Brazil, initially associated with imported cases, but which has been established in an endemic way in the country, in very recent years. Local transmission of CHIKV was detected in Brazil for the first time in September 2014. Since 2015, Alagoas has been officially registering cases of human infections by CHIKV, although CHIKV infection can be identified mainly by detection of viral RNA and serology for antibody research, the diagnosis of most cases has been made only clinically. Although rapid arbovirus infections have assumed an important role in recent years in Brazil, there are difficulties and lack of laboratory methods capable of confirming the etiological diagnosis of infections by different arboviruses. This group of viruses causes disease with similar symptoms, leading to underreporting of CHIKV and inaccurate data on the real period of entry of the disease in Alagoas. The aim of this work was to investigate the occurrence of CHIKV infections in Alagoas between the years 2013 and 2014, retrospectively. For the survey, it was selected 44 serum samples from a biorepository, which had been collected from individuals with suspicion of dengue in the years 2013 and 2014, previously tested and negative for dengue and other flavivirus. Among the samples, some were collected in the acute phase of febrile illness (<7 days from the onset of symptoms) and others in the convalescent phase (> 7 days). Samples were screened for confirmation of CHIKV infection using serology, RT-PCR and viral isolation in cell culture. Anti-CHIKV IgM and IgG antibodies were found in 2 and 4 samples, respectively, that were collected between June and September 2014. CHIKV was successfully isolated in C6/36 cells from one IgM-positive serum sample (collected in August 2014). The species CHIKV was confirmed by RT-PCR of the cells supernatant and by immunofluorescence for viral antigen detection. The strain of this clinical isolate was called CHIKV Mcz630. Overall, our serology and viral isolation data - obtained from serum samples collected in 2014 - demonstrate that CHIKV was already present in the state of Alagoas since that year, and not only since 2015, as attest official data. These results even suggest that CHIKV emerged in Alagoas before the first report of the autochthonous infection of CHIKV in Brazil.

Key words: Alagoas, Chikungunya, Retrospective survey.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Representação dos ciclos de transmissão dos arbovírus silvático e urbano.....	16
FIGURA 2 - Estratégia de codificação genômica de Alfavírus.....	18
FIGURA 3 - Ciclo replicativo dos Alfavírus.....	19
FIGURA 4 - <i>Alphavirus</i>	20
FIGURA 5 - Organização estrutural do CHIKV.....	22
FIGURA 6 - Árvore filogenética baseada nas ORFs concatenadas de isolados de CHIKV.....	23
FIGURA 7 - Surgimento e propagação da epidemia de CHIKV 2004-2019.....	25
FIGURA 8 - Sintomas do Chikungunya.....	26
FIGURA 9 - Lesões nas articulares com CHIKV.....	27
FIGURA 10 - Manifestações clínicas na fase pós-aguda.....	28
FIGURA 11 - Distribuição dos casos importados por estado e dos casos autóctones por município de residência de chikungunya no Brasil em 2014.....	31
FIGURA 12 - Critérios de diagnóstico da CHIKV.....	33
FIGURA 13 - Curva de calibração construída para a quantificação de anticorpos IgG antiCHIK.....	42
FIGURA 14 - Monocamada de células C6/36 infectadas com a amostra 630H, primeira passagem (P.1) mostrando seu efeito citopático.....	44
FIGURA 15 - Imunofluorescência para CHIKV da amostra 630H.....	47
FIGURA 16 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% mostrando os produtos da reação de RT-PCR para o vírus Chikungunya, obtido do sobrenadante de cultura inoculada com a amostra 630H (isolado 630H).....	47
FIGURA 17 - Efeito citopático do CHIKV isolado originalmente da amostra de soro 630H, aqui em segunda e terceira passagens (P.2 e P.3) após inoculação do isolado primário em linhagens de células C6/36 e Vero E6.....	49

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Interpretação de resultados para as concentrações de IgG anti-CHIKV e para os índices obtidos no teste de detecção de anticorpos IgM anti-CHIKV	42
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Amostras processadas para pesquisa de anticorpos anti-CHIKV e as respectivas concentrações de IgG/IgM encontradas.....	43
TABELA 2 - Identificação e resultado das amostras de soro inoculadas em cultura para tentativa de isolamento viral.....	44
TABELA 3 - Resultados dos testes realizados em pares de amostras de soro e seus isolados virais (sobrenadante de cultura de células inoculadas) para a detecção do genoma do vírus CHIKV.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus dengue
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DOs	Densidades óticas
E1	Glicoproteína do envelope 1
E2	Glicoproteína do envelope 2
ECP	Efeito citopático
ECSA	Linhagem do <i>chikungunya virus</i> Leste-Centro-Sul-Africano
EEEV	Vírus da encefalite equina oriental
EILV	Vírus Eilat
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IOL	Linhagem do <i>chikungunya virus</i> do Oceano Índico
ISVs	Vírus inseto específico
MAYV	Vírus Mayaro
MWAV	Vírus Mwinilunga
NsP	Proteína não estrutural
ORF	Fase de leitura aberta
PAHO	Organização pan-americana da saúde
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSA	Penicilina -Estreptomicina -Anfotericina
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

RU	Unidades relativas
SBF	Soro bovino fetal
SINV	Vírus Sinbdis
TALV	Vírus da Floresta tai
WEEV	Vírus da Encefalite Equina do Oeste
WHO	Organização mundial da saúde
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 ARBOVÍRUS	14
2.2 ALFAVÍRUS	16
2.3 O VÍRUS CHIKUNGUNYA	21
2.3.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA	23
2.3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	25
2.3.2.1 FASE AGUDA	26
2.3.2.2 FASE PÓS-AGUDA	27
2.3.2.3 FASE CRÔNICA	27
2.3.2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ATÍPICAS E GRAVES	28
2.3.3 CHIKUNGUNYA NO BRASIL	28
2.3.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	31
2.3.5 DIGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL	32
2.3.6 PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 GERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA	36
4.1 TIPOS DE ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS	36
4.2 AMOSTRAS CLÍNICAS	36
4.3 ENSAIOS SOROLÓGICOS	36
4.4 ENSAIOS MOLECULARES	38
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	51

7. CONCLUSÃO	56
8. REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

O vírus chikungunya (CHIKV) tem sido considerado um problema de saúde pública global, com grande impacto em regiões tropicais e subtropicais, pela prevalência de mosquitos vetores pertencentes ao gênero *Aedes*. Esse problema se agrava devido à limitação de recursos para redução do vetor. Pelo fato de não haver tratamento específico ou vacina para o CHIKV, o controle da propagação dos vetores é a principal forma disponível na atualidade para o controle da doença (PIALOUX et al, 2007). Devido ao intenso movimento de viajantes virêmicos vindos da África, Índia e ilhas do Oceano Índico muitos casos importados da doença foram notificados em países da América, Europa e Ásia, desde 2006 (SOUZA et al, 2017).

O CHIKV é um vírus emergente no Brasil, inicialmente associado a casos importados, mas que se estabeleceu de forma endêmica no país, em anos muito recentes. A transmissão local do CHIKV, foi detectada no Brasil pela primeira vez em setembro de 2014, com casos relatados praticamente ao mesmo tempo em Oiapoque (Amapá) e Feira de Santana (Bahia), cidades separadas por mais de 2.000Km de distância. Análises genéticas confirmaram, posteriormente, a cocirculação de duas linhagens distintas do vírus no Brasil (NAVECA et al, 2019). Em 2016, CHIKV causou importante epidemia em diversas partes do país, seguida de queda na incidência, porém ainda hoje se mantém ativo, causando infecções em surtos de menores proporções em municípios de diferentes regiões do Brasil (BRASIL, 2020).

Uma das grandes preocupações em relação às infecções por CHIKV é a capacidade de cronificação da doença, sendo causa de dores crônicas e incapacitantes em muitos dos indivíduos afetados. Estudos de DIAS et al, 2018, mostram que pessoas que possuem sorologia positiva para CHIKV, e foram sintomáticos, tem uma chance significativa adquirir uma forma crônica da doença. Apesar do muito que já aprendeu sobre a doença durante o período epidêmico, as características epidemiológicas, dinâmicas de transmissão, diversidade genômica no Brasil, ainda precisam de mais esclarecimento.

A notificação de novos casos de CHIKV aqui no país é controversa, pois é baseada apenas em critérios clínicos-epidemiológicos e os casos acabam sendo subnotificados, principalmente por causa da cocirculação e coinfeção com outros vírus que causam

sintomas sobrepostos, como a zika e a dengue (NAVECA et al, 2019). Por conta dessa dificuldade, muitos dos casos notificados como dengue, por exemplo, podem ter sido, na realidade, casos de infecção por outras arboviroses, como o CHIKV.

Esse fato corrobora com a ideia de que há na literatura dados controversos sobre o período real em que o CHIKV teria entrado no Brasil e se estabelecido como um patógeno endêmico-epidêmico (NAVECA et al, 2019; SOUZA et al, 2018; NUNES et al, 2015; SOUZA et al, 2019). Considerando um banco de amostras/biorrepositório da Universidade Federal de Alagoas¹ contendo soros humanos previamente triados para DENV e que se mostraram negativos para tal vírus, este trabalho visou a realizar uma busca ativa retrospectiva por infecções precoces por CHIKV em Alagoas. Para tanto, propôs analisar tais amostras de soro tanto para a pesquisa de anticorpos quanto para tentativas de isolamento viral de CHIKV de cepas selvagens em cultura e detecção molecular do genoma viral. Desta forma, contribuindo, ainda de que forma retrospectiva, para a vigilância epidemiológica e o diagnóstico etiológico dessas infecções no estado de Alagoas.

¹ No Laboratório de Pesquisa em Virologia e Imunologia (LAPEVI), integrante do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, ICBS.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ARBOVÍRUS

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são um grande e variado grupo de vírus, causadores de doenças que acometem os vertebrados, transmitidas por vetores artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos (WEAVER, 2010; HERNANDEZ *et al.*, 2014). Destas doenças, as que mais se destacam - em razão de sua elevada incidência - são aquelas transmitidas por culicídeos, principalmente os dos gêneros *Culex* e *Aedes* (DONALISIO, 2017).

Os arbovírus são um grupo heterogêneo, sendo os de relevância médica pertencentes, em grande parte, aos gêneros *Alphavirus* (Família *Togaviridae*) e *Flavivirus* (Família *Flaviviridae*) (DONALISIO, 2017). Há também outros gêneros de relevância, pertencentes às famílias *Peribunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. Todos esses vírus possuem material genético de RNA, apresentando grande plasticidade genética e alta frequência de mutações, o que permite adaptações a hospedeiros vertebrados e invertebrados (COFFEY *et al.*, 2013).

A grande parte dos arbovírus circula horizontalmente e sua transmissão, para hospedeiros vertebrados e vetores biológicos, é feita durante a alimentação sanguínea. Por esse motivo, os arbovírus se adaptaram a uma grande quantidade de hospedeiros, podendo ser capazes de infectarem e se replicarem tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Podemos usar como exemplo, os alfavírus, que utilizam uma enorme variedade de hospedeiros aviários e mamíferos como hospedeiros reservatórios de manutenção bem como algumas espécies de mosquito como vetores primários (COFFEY *et al.*, 2013; WEAVER, 2006).

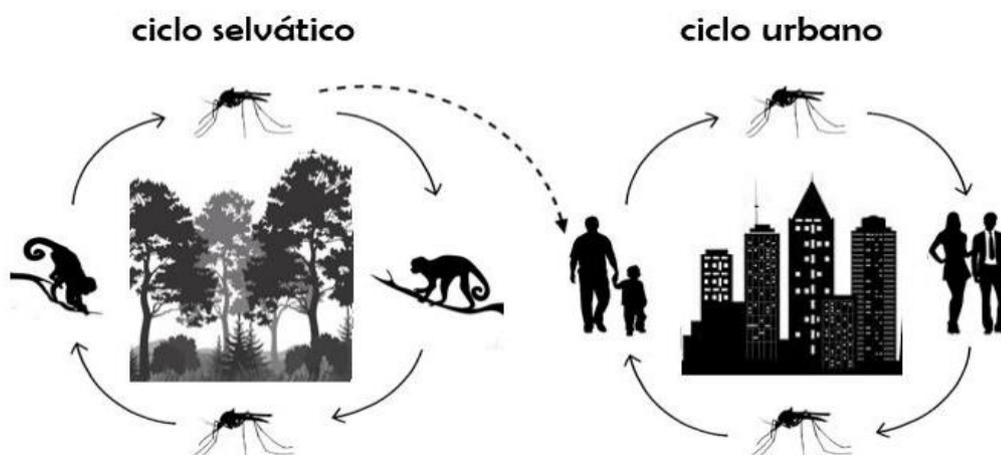
Nesse sentido, a diferença entre a ampla gama de hospedeiros em comparação com a gama mais restrita de vetores artrópodes hematófagos indica um potencial maior para mudança de reservatório do que para mudança de vetor durante o curso da evolução viral e surgimento de doenças. Esse padrão sugere que os arbovírus evoluíram como generalistas, em relação aos hospedeiros vertebrados e especialistas com relação aos seus vetores (WEAVER, 2006). Os arbovírus foram capazes de se adaptar ao sistema imune de vertebrados e invertebrados (MC FARLANE *et al.*, 2014), sendo capazes de infectar

e de se replicarem em hospedeiros de filos diferentes, além de uma variedade de células em cultura (LYSKI, 2013).

Originariamente, a maioria dos arbovírus eram apenas zoonóticos na natureza, (WEAVER, 2013) em geral, circulando entre os animais silvestres e mantendo-se em ciclos enzoóticos em poucas espécies de vertebrados e invertebrados. Podiam envolver animais selvagens/domésticos e seres humanos, porém essas infecções eram superficiais e não influenciaram a evolução do patógeno a longo prazo, sendo seu mecanismo mais simples de infecção o *Spillover*² (LANCIOTTI & VALADERE, 2014; WEAVER, 2006).

O processo de adaptação aos ciclos urbanos dos arbovírus ocorreu por muitos séculos, portanto a diferenciação entre os ciclos silvático e urbano (**Figura 1**), possivelmente ocorreu a partir da expansão da população humana, com suas mudanças de hábitos, as quais aumentaram a exposição a infecções. A domesticação de animais também forneceu a alguns arbovírus a oportunidade de sofrer amplificação secundária para aumentar os níveis de circulação e a probabilidade de *Spillover* para humanos ou animais domésticos (WEAVER, 2013, WEAVER, 2006).

Figura 1: Representação dos ciclos de transmissão dos arbovírus silvático e urbano.



Fonte: Souza (2019)

² *Spillover* é o termo em inglês utilizado para dizer que um vírus conseguiu se adaptar e migrar de uma espécie de hospedeiro para outra.

Apesar de a contaminação por arbovírus estar comumente relacionada a vetores mosquitos e hospedeiros aviários, surtos de infecções em humanos e em outros animais ocorrem frequentemente e, por isso, tornam-se uma preocupação econômica e de saúde pública (RUPP, 2015). Isso ressalta a relevância do estudo dos arbovírus que, segundo Nogueira et al (2016), representam uma séria ameaça em todo o mundo, principalmente em países tropicais e subtropicais. Nesses países, um surto de arboviroses pode acarretar em sobrecarga do sistema público de saúde e, conseqüentemente, gerar perdas econômicas.

No que se refere à distribuição das arboviroses no mundo, Rust (2012) afirma que o único continente onde os arbovírus não são endêmicos é o Antártico. O autor afirma ainda que esses vírus tendem a ter uma distribuição geográfica e climática restrita, como se fizessem parte de um subsistema ecológico especial composto pelos vírus, vetores, hospedeiros amplificadores e reservatórios. Nesse sentido, em função do clima predominantemente tropical, com extensas florestas, o Brasil torna-se um local favorável para a existência do vetor e, portanto, para a ocorrência de arboviroses (FIGUEIREDO, 2000).

2.2 ALFAVÍRUS

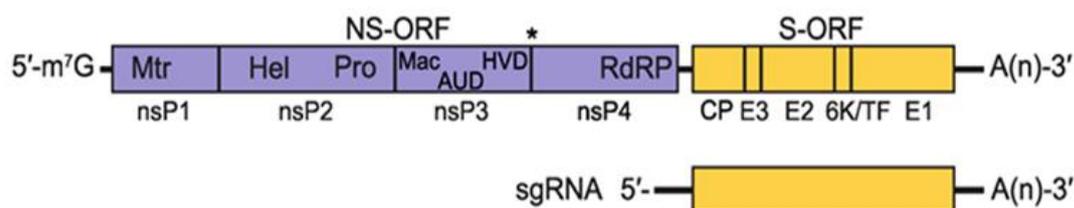
O gênero *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae*, que até o ano de 2018 contava com 2 gêneros – *Alphavirus* e *Rubivirus*- e 30 espécies de vírus. Em 2019 houve uma mudança na classificação e, atualmente, a família *Togaviridae* conta apenas com um gênero (*Alphavirus*) e 31 espécies virais (ICTV, 2020). A família *Togaviridae*, se caracteriza como uma família de vírus pequenos - com genomas de RNA de sentido positivo, de cadeia simples, de 10 a 12 Kb e cauda poli-A -, os alfavírus são vírus envelopados, cujos vírions são partículas esféricas com cerca de 70 nm de diâmetro (CHEN et al, 2018).

As partículas dos alfavírus são compostas por cópias das glicoproteínas de membrana E1 e E2 associadas ao *core* formado por proteínas do Capsídeo (C). Além disso, as membranas E1 e E2 ficam conectadas à bicamada lipídica interna, formando

uma rede icosaédrica com E1 e E2 sendo visto como espículas (JOSE et al, 2009; BROWN & HERNANDEZ, 2012). A glicoproteína E2 estaria envolvida tanto no reconhecimento quanto na ligação da partícula viral às células intestinais do mosquito. Já as proteínas não-estruturais, a exemplo da protease nsP2 ou da RdRp/nsP4, apresentam funções enzimáticas diversas, além de formarem o complexo replicativo (FRANZ *et al.*, 2015).

O genoma dos alfavírus possui dois quadros de leitura abertos, no inglês *Open Reading Frame* (ORF), separados por uma região intergênica. A primeira ORF codifica quatro proteínas não estruturais, da nsP1 a nsP4, que são necessárias para a replicação do RNA viral. Essa codificação deve-se a um promotor subgenômico interno que fica imediatamente a montante da ORF (KING *et al.*, 2011; HALLENGARD *et al.*, 2014). A segunda ORF é traduzida em um único precursor de poliproteína, que é subsequentemente processado para formar as proteínas do capsídeo (C), duas glicoproteínas da superfície do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6k). Dessa forma, a organização do genoma pode ser resumida como 5'-m⁷L-NSP1-nsP2-NSP3-nsP4- (junção) -C-E3-E2-6k-E1-A_n-3' (KING *et al.*, 2011; HALLENGARD *et al.*, 2014), conforme pode-se observar na **figura 2**.

Figura 2: Estratégia de codificação genômica de Alfavírus. É mostrado o RNA genômico com regiões não codificadoras representadas como linhas pretas sólidas e ORFs como caixas abertas (NS-ORF = ORF de proteína não estrutural; S-ORF = ORF de proteína estrutural).

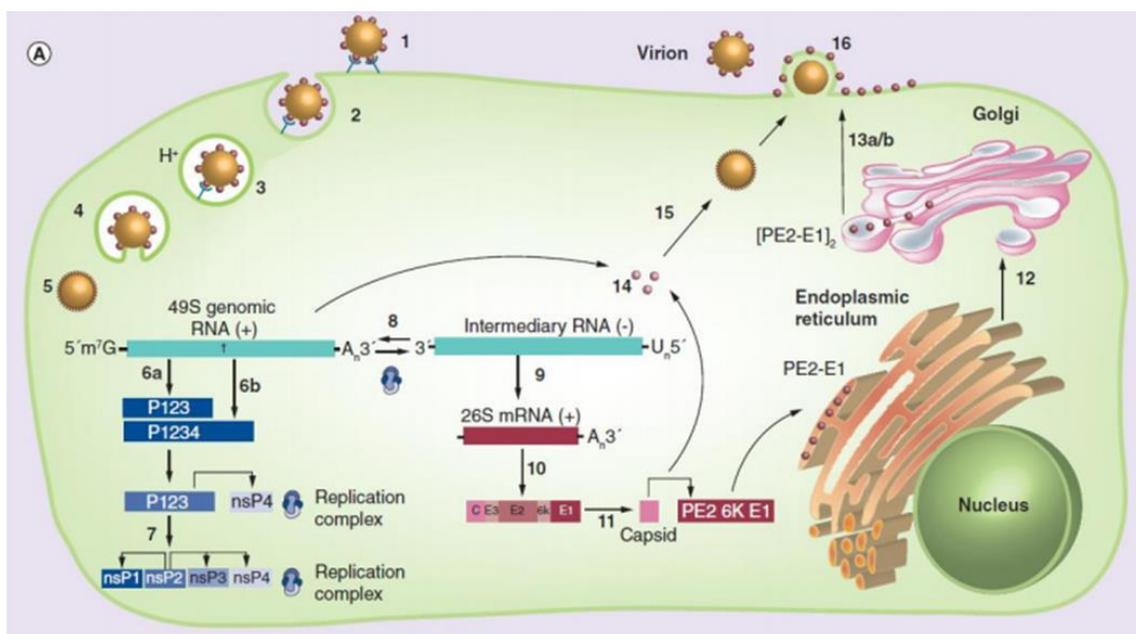


FoFonte: ICTV – Virus Taxonomy Profile: *Togaviridae*, 2018.

A replicação dos alfavírus ocorre no interior do citoplasma das células (**Figura 3**), onde as proteínas não-estruturais, traduzidas diretamente do genoma viral, formam o complexo de replicação e sintetizam um RNA intermediário para a síntese dos RNAs subgenômicos (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015), os quais codificam as proteínas estruturais (BROWN & HERNANDEZ, 2012). O brotamento de novos vírions envelopados ocorre na membrana plasmática das células de mamíferos. Entretanto, em células de mosquitos, os vírions são formados em vacúolos e maturados por vias

exocíticas. Assim, na natureza esses vírus são híbridos, adquirindo lipídios, carboidratos e outras modificações da célula hospedeira (AKHRYMUK *et al.*, 2012; HERNANDEZ *et al.*, 2014).

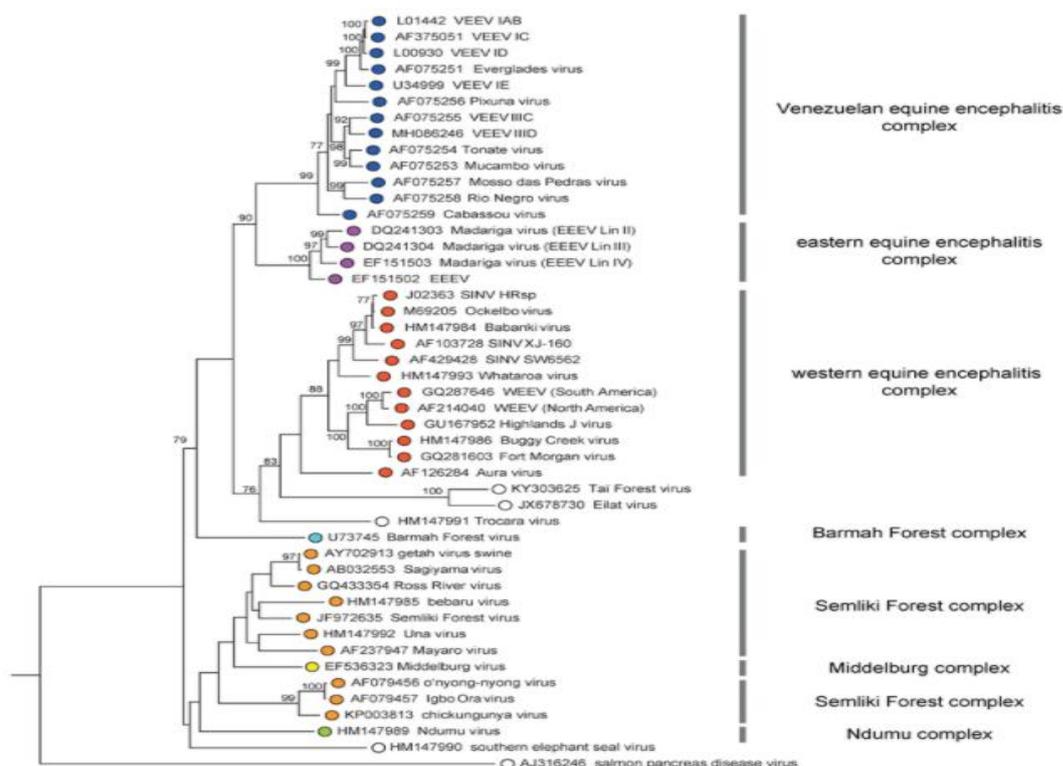
Figura 3: Ciclo replicativo dos Alfvírus. 1: ligação ao receptor de membrana. 2: endocitose. 3: acidificação do vacúolo. 4: fusão de membranas. 5: desmontagem do core. 6: tradução. 7: processamento. 8 e 9: transcrição. 10: tradução. 11: processamento. 12: processamento de maturação de glicoproteínas. 13: transporte de glicoproteínas processadas e ativação por furina. 14: empacotamento do genoma viral. 15: montagem do nucleocapsídeo. 16: brotamento de novas partículas virais. Modelo de replicação em células de vertebrado e invertebrado.



Fonte: Oliveira Mota *et al.*, 2015.

A organização taxonômica dos Alfvírus foi organizada historicamente de acordo com as relações antigênicas determinadas em ensaios sorológicos (CALISHER & KARABASTOS, 1988). Atualmente, eles são organizados em 31 espécies e 8 sorocomplexos (**Figura 4**): o complexo da encefalite equina venezuelana (VEE), complexo da encefalite equina oriental (EEE), complexo da encefalite equina ocidental (WEE), complexo Barmah Forest, complexo Middeelburg, complexo Semliki Forest e o complexo Ndumu, segundo similaridades antigênicas e genéticas (CHEN *et al.*, 2019).

Figura 4: *Alphavirus*. Árvore filogenética de isolados representativos de todas as espécies de alfavírus gerados a partir de uma região conservada de sequências nucleotídicas do gene da proteína do envelope (2184 nt) usando o modelo de substituição GTR + I + Γ e o método de máxima verossimilhança.



Fonte: ICTV, 2020.

Os oito complexos antigênicos de alfavírus parecem retratar com precisão os clados de vírus que compartilham características importantes do ponto de vista médico. Um exemplo disso, são os membros dos complexos EEE e VEE que compartilham o potencial de causar encefalite em equinos e humanos, enquanto os vírus dos complexos do Semliki Forest e Barmah Forest geralmente causam uma síndrome artritogênica.

As caracterizações sorológicas dos alfavírus podem fornecer alguns esclarecimentos sobre as relações entre os complexos. Por exemplo, quando os anticorpos monoclonais gerados contra o nucleocapsídeo do vírus Semliki Forest são usados em ensaios de captura de anticorpos, eles apresentam reação cruzada com membros do vírus Semliki Forest, WEEV, EEEV, vírus Middelburg e complexos do vírus Ndumu. O fato de o nucleocapsídeo ser uma das proteínas do vírion mais conservadas, pode refletir em algumas relações antigas entre os alfavírus (POWERS ET AL, 2001).

A grande maioria dos Alfavírus é transmitida por mosquitos e possui uma vasta gama de hospedeiros, podendo infectar vertebrados diferentes, como humanos, primatas não humanos, roedores e equídeos. Essa ampla capacidade de transmissão proporciona sua manutenção na natureza, embora estudos recentes tenham descoberto que alguns alfavírus vão de encontro a essa regra, a exemplo dos denominados de inseto-específicos (ISV). Diferentemente dos outros vírus transmitidos por mosquitos, os ISVs são incapazes de se replicar em células de vertebrados *in vivo* ou *in vitro*, sendo cultivado com sucesso apenas em mosquitos e linhagens celulares de mosquitos (NASAR et al, 2015; AGBOLI et al, 2019).

De acordo com Hermanns et al (2020), apenas três ISVs pertencem ao grupo dos alfavírus, são eles: o vírus Eilat (EILV), o vírus da floresta Tai (TALV) e o vírus Mwinilunga (MWAV), que formam um grupo monofilético no complexo WEEV, transmitido por mosquitos. O vírus Eilat, foi o primeiro Alfavírus ISV isolado a partir de um grupo de mosquitos *Anopheles coustani*, em Israel (AGBOLI et al, 2019). Estudos mostram que o vírus Eilat não foi capaz de infectar células de mamíferos, porém possui a capacidade de se replicar em altos títulos em células de inseto.

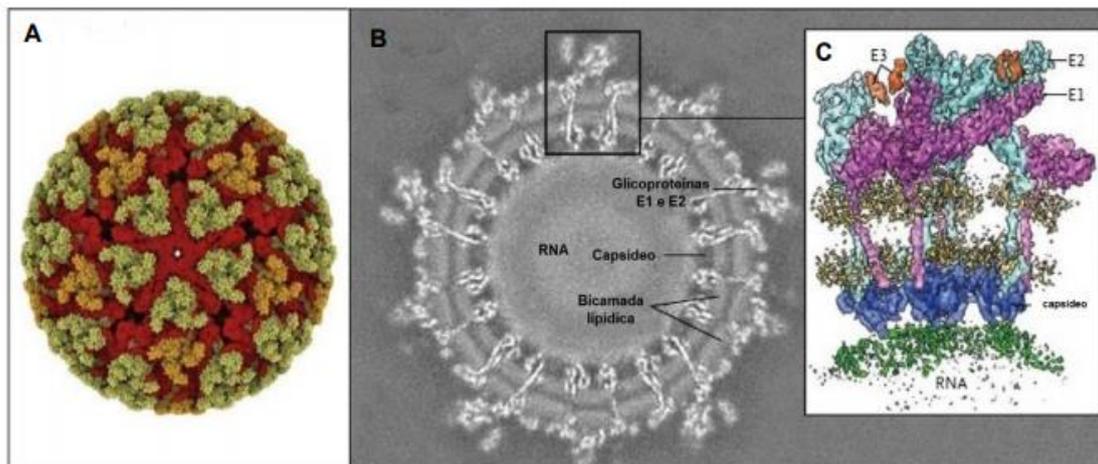
De acordo com um dos estudos, a infecção ativa de células derivadas de *Aedes albopictus* com o vírus Eilat (EILV) reduziu a capacidade de infecção de vírus coinfectantes (SINV, VEEV, EEEV, WEEV e CHIKV) em aproximadamente 10-10.000 vezes e atrasou capacidade de replicação em 12 –48 horas. Além disso, a infecção prévia *in vivo* por EILV de mosquitos *Aedes aegypti* atrasou a disseminação de CHIKV por 3 dias. Estudos dessa natureza, com ISVs têm aumentado nos últimos anos (NASAR et al, 2015) e os achados podem contribuir para o controle de doenças arbovirais, ensaios diagnósticos e desenvolvimento de vacinas (AGBOLI ET AL, 2019).

Espécies de alfavírus são endêmicas nos cinco continentes e a variedade a sua variedade está condicionada às barreiras ambientais de cada região. Por essa razão, novas populações humanas estão sendo expostas aos alfavírus e ao risco de doenças, conforme observado no mais recente surto do CHIKV (WEAVER, 2014; WEAVER & LECUIT, 2015).

2.3. O VÍRUS CHIKUNGUNYA

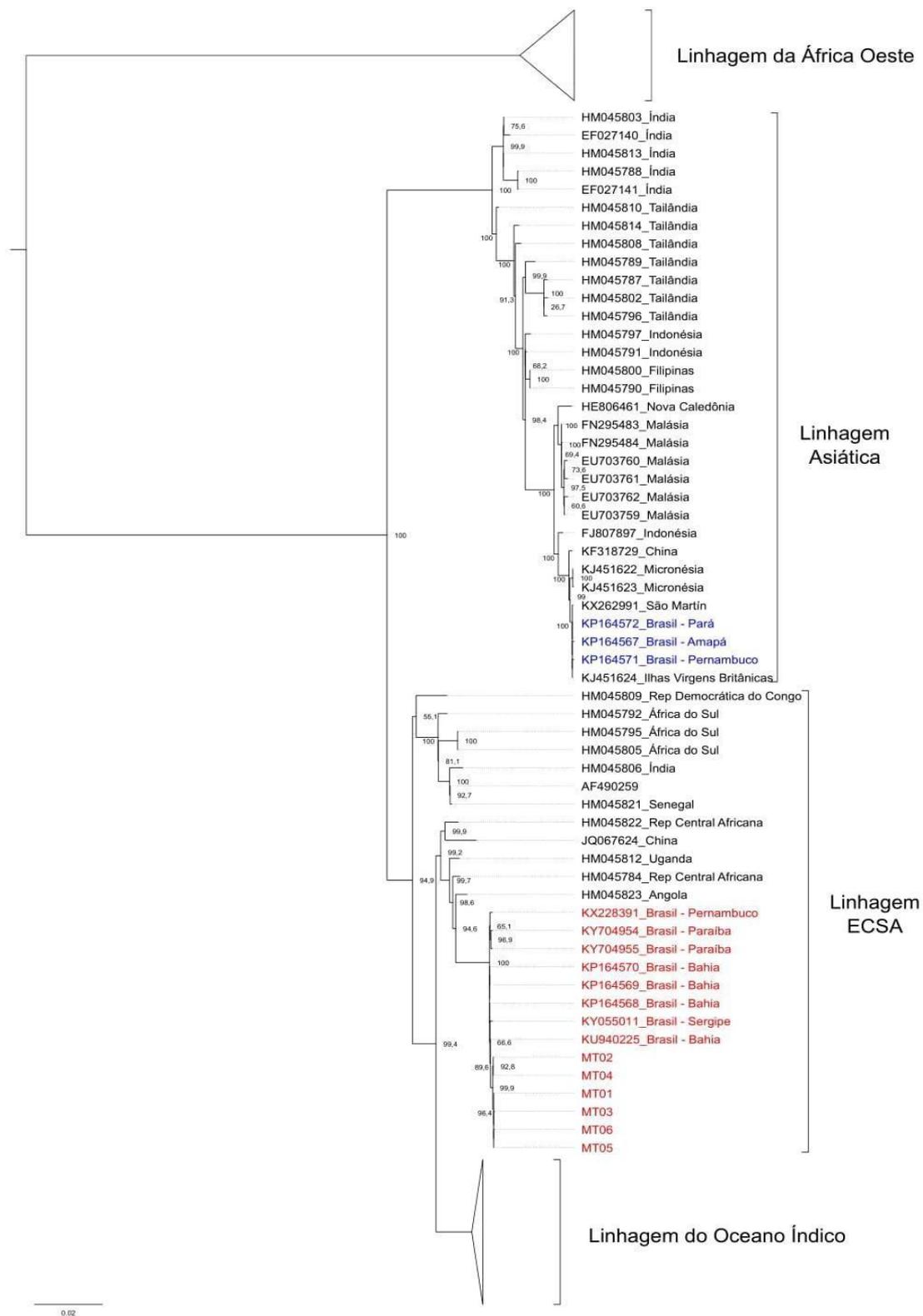
Pertencente ao gênero dos *Alphavirus* e à família *Togaviridae*, o CHIKV é um vírus envelopado, com aproximadamente 70 nm de diâmetro, e que possui uma fita simples de RNA, de polaridade positiva, com tamanho de aproximadamente 11.8 kB (ROBERTS et al., 2017; SOLIGNAT *et al.*, 2009). O CHIKV apresenta apenas um sorotipo, porém possui quatro genótipos: o Oeste Africano; o Leste-Centro-Sul-Africano (ECSA), o Oceano Índico (IOL) - originário da cepa do ECSA, e o Asiático (PEREIRA, 2018). Nas **figuras 5 e 6**, apresenta-se, respectivamente, a organização estrutural do CHIKV e a uma árvore filogenética mostrando a relação entre os genótipos.

Figura 5: Organização estrutural do CHIKV. Em A, mostra a estrutura representativa do vírion. Em B, mostra as estruturas com base em reconstruções microscópicas eletrônicas de alta resolução do CHIKV. Em C, tem-se uma figura representativa da estrutura molecular do CHIKV.



Fonte: Weaver *et al.*, 2015.

Figura 6: Árvore filogenética baseada nas ORFs concatenadas de isolados de CHIKV. As quatro linhagens de CHIKV estão indicadas nos colchetes. Os isolados CHIKV do Brasil pertencentes à linhagem ECSA estão em vermelho, enquanto os da linhagem Asiática, mas em circulação no Brasil, estão em azul.



Fonte: SOUZA, 2019.

CHIKV é transmitido por mosquitos culicídeos, os quais podem infectar vertebrados e artrópodes. Sua transmissão para humanos ocorre através de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* (ROBERTS *et al.*, 2017; PRESTI *et al.*, 2014), sendo o primeiro o principal vetor no meio urbano (SCHAFFENER *et al.*, 2014).

O *A. aegypti*, pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, enquanto o *A. albopictus* circula também no continente europeu e nas Américas (ABRANTES & SILVEIRA, 2009). Existem hipóteses de que o mosquito foi introduzido nas Américas por meio de embarcações que cruzavam o oceano Atlântico durante o comércio de escravos nas primeiras colonizações (SCHAFFENER *et al.*, 2014).

2.3.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O CHIKV é originário da África e, como os vírus Dengue (DENV) e Febre Amarela, possivelmente foi transportado por navios para cidades portuárias durante os séculos XVIII e XIX. No entanto, foi necessário que o CHIKV se espalhasse por pelo menos duas vezes, do leste da África para a Ásia, para estabelecer a transmissão urbana permanente (WEAVER, 2013). Foi isolado pela primeira vez em 1952-53, na Tanzânia, próximo à divisa com Moçambique (SOUZA, 2019). Em Kimakonde, uma língua Bantu falada pelo grupo étnico Makonde, no sudeste da Tanzânia, a palavra “chikungunya” significa “com o corpo contorcido”. Essa palavra faz alusão às fortes dores nas articulações causadas pela infecção por CHIKV, as quais impedem movimentos mais amplos (CHIA *et al.*, 2010).

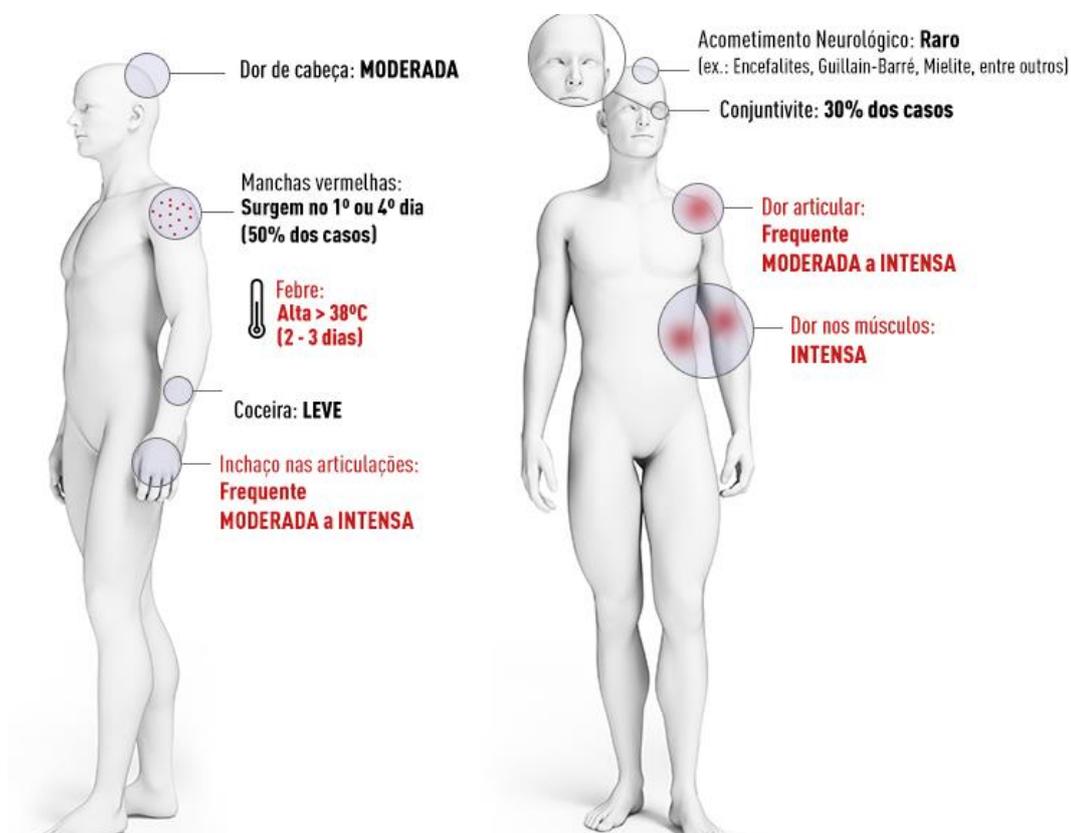
A maior epidemia de CHIKV já notificada começou na Ilha Lamu, litoral do Quênia, na África, em 2014 (SURHBIER, 2019). Após essa epidemia, o vírus começou a se espalhar pelas Ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste asiático, atingindo mais de 6 milhões de casos (POWERS *et al.*, 2000; SERGON *et al.*, 2007; STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009; THIBERVILLE *et al.*, 2013). Em 2005, uma epidemia de CHIKV foi identificada em Comores, causando a infecção de aproximadamente 215.000 pessoas (SERGON *et al.*, 2007). Entre março de 2005 e abril de 2006, 255.000 pessoas foram infectadas na Ilha Reunião (JOSSEAN *et al.*, 2006). Entretanto, as preocupações com o CHIKV aumentaram quando o vírus foi diagnosticado no norte da Itália (REZZA *et al.*, 2007).

2.3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Após a inoculação do vírus, através da picada da fêmea do mosquito infectado, há um período de incubação médio de 3-7 dias, com variação de 1 e 12 dias em alguns casos. Em humanos, o período de viremia pode durar até 10 dias. Geralmente, esse período inicia-se 2 dias antes de os sintomas serem apresentados. Em comparação com a dengue, a taxa de casos sintomáticos de CHIKV é alta, geralmente maior que 90%. Em contrapartida, casos assintomáticos são raros, geralmente 3-25% das pessoas com evidência sorológica de infecção não apresentaram sintomas (KOHLENER *et al*, 2017; MARQUES, 2017; BRASIL, 2017, BURT *et al*, 2012).

A doença é caracterizada por um início abrupto de febre, artralgia, mialgia, dor de cabeça, exantema, náusea e cansaço (**Figura 8**) (CEROL *et al*, 2020). De acordo com VAIRO *et al* (2019), há três formas sintomáticas da doença: aguda, pós-aguda e crônica.

Figura 8: Sintomas do Chikungunya. A figura ilustra as possibilidades de sintomas que podem ocorrer nos casos agudos e raros.

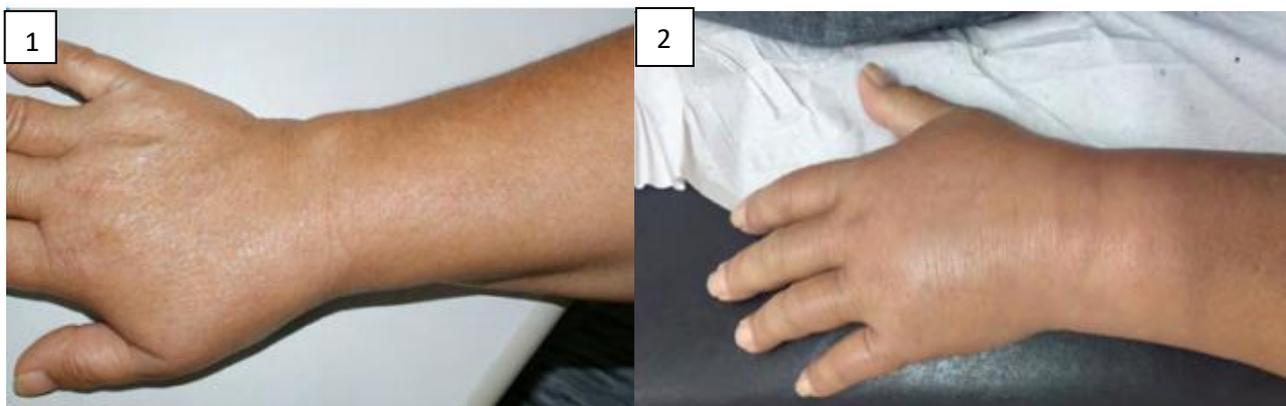


2.3.2.1 FASE AGUDA

Após o período de incubação, há o início da fase aguda, que dura em média 10 dias. Nessa fase, os sintomas mais comuns são: febre alta, com temperatura maior que 38° C e duração média de 2-3 dias, dor de cabeça, náusea, vômito, mialgia, artralgia simétrica, que pode ser intensa e acometer as extremidades, principalmente punhos e falanges (**Figura 9**) (HOSSAIN *et al.*, 2018; PAIXAO *et al.*, 2018; CASTRO *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Uma média de 90% dos pacientes com CHIKV, relatam a presença de poliartralgia, que acomete pequenas e grandes articulações, podendo causar inchaço, levando à tenossinovite. Quando o paciente apresenta mialgia, geralmente é de forma leve a moderada (BRASIL, 2017).

Figura 9: Lesões nas articulares com CHIKV. Nas fotos 1 e 2, evolução da mesma paciente no 1° e 5° dia de doença.



Fonte: Kleber Giovanni Luz.

Na maioria dos casos, o indivíduo também apresenta exantema macular ou maculopapular no tronco e/ou nas extremidades. Esses sintomas surgem, normalmente, do 2° ao 5° dia após o início da febre. Uma média de 25% dos pacientes relata a presença de prurido, o qual pode ser generalizado ou apenas na região da palma das mãos e planta dos pés. (PAIXAO *et al.*, 2018; RUNOWSKA *et al.*, 2018; BRASIL, 2017). Também há relatos de outras manifestações cutâneas como: dermatite esfoliativa, hiperpigmentação, fotossensibilidade e lesões vesículobolhosas e úlceras orais (BRASIL, 2017).

2.3.2.2 FASE PÓS-AGUDA

Geralmente nessa fase a febre desaparece e há o agravamento, ou a persistência, da artralgia, aumento da dor articular nas regiões que foram acometidas na fase aguda, tenossinovite hipertrófica subaguda nas mãos, punhos, falanges e tornozelos (**Figura 10**). O comprometimento articular pode ser acompanhado de inchaço, dor, de moderada a intensa, podendo haver também recorrência da febre (BRASIL, 2017).

Figura 10: Manifestações clínicas na fase pós-aguda. Na 1º foto, paciente com inchaço persistente na mão direita, com 60 dias após o início dos sintomas. Na 2º foto, paciente com inchaço no tornozelo e pé, 50 dias após o início dos sintomas.



Fonte: Carlos Brito.

Também podem estar presentes o prurido generalizado e o exantema maculopapular, além de outras lesões cutâneas. Alguns pacientes podem desenvolver manifestações cardíacas, fadiga e sintomas depressivos. Se os sintomas persistirem por mais de 3 meses após o início da doença é provável uma evolução para fase crônica (BRASIL, 2017; SUHBIER, 2019).

2.3.2.3 FASE CRÔNICA

Após a fase pós-aguda, alguns sintomas persistem, principalmente dores musculares, neuropáticas e musculoesqueléticas (BRASIL, 2017). De acordo com os estudos de meta-análise de Paixão (2018), aproximadamente 25% dos pacientes com

CHIKV tiveram a doença por mais de 2 meses e 14% por mais de 18 meses. Os sintomas primários em pacientes com doença crônica com CHIKV são artralgia e artrite (mais de 79%), alopecia e depressão. Alterações de humor, fadiga e distúrbios do sono também são comuns aos sintomas crônicos. Sequelas de Chikungunya, a longo prazo, incluem depressão, fadiga crônica e outras desordens neurológicas, como: encefalite, Síndrome de Guillain-Barré e neurite retrobulbar (DUVIGNAUD *et al.*, 2018; BRIZZI, 2017; FIGUEIREDO, 2017).

2.3.2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ATÍPICAS E GRAVES

A Pan American Health Organization (PAHO), reconhece ainda formas sintomáticas atípicas e graves da doença. Na fase aguda atípica, além dos sintomas mais comuns, o CHIKV afeta os órgãos e o sistema neurológico, cardiovascular, renal e respiratório. A fase aguda atípica é comumente mais observada em pacientes idosos ou com alguma comorbidade, como Diabetes, hipertensão e deficiências cardiorrespiratórias (GODAERT *et al.*, 2017; FIGUEIREDO, 2017).

Na forma aguda grave, há, comumente, manifestações cardíacas ou falha múltipla dos órgãos (SUHBIER, 2019). As infecções graves também podem ser responsáveis por complicações neurológicas, associadas a doenças do Sistema Nervoso Central (SNC), como encefalopatia e encefalite (GERARDIN *et al.*, 2016). Em alguns casos graves, o indivíduo apresenta insuficiência renal, podendo ir a óbito. Outras causas de morte relacionadas ao CHIKV incluem hepatite tóxica, dermatite bolhosa, miocardite/pericardite, insuficiência respiratória e infarto agudo do miocárdio (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009).

2.3.3 CHIKUNGUNYA NO BRASIL

No final do ano de 2013 e durante o ano de 2014, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recebeu notificações de milhares de casos de Chikungunya. Inicialmente os casos foram notificados somente nas ilhas do Caribe. Posteriormente houve notificações em outras partes da América, o que despertou a atenção de autoridades sanitárias brasileiras acerca do o risco da introdução da doença no Brasil, considerado alto por causa da importação do vírus, por viajantes, por vetores capacitados – pois eram

os mesmos da dengue –, e pela população suscetível – por não apresentar anticorpos para a doença (BRASIL, 2014).

O *A. aegypti* e o *A. albopictus*, vetores do CHIKV, podem ser encontrados em 5.172 dos 5.494 municípios brasileiros, que abrigam 98,6% da população brasileira. Tal situação favorece a disseminação do vírus no Brasil. Somados a esse fator de disseminação do CHIKV, tem-se o intenso deslocamento de pessoas, o modelo de desenvolvimento econômico, caracterizado pelo crescimento desordenado dos centros urbanos, coleta e destino inadequado de resíduos sólidos são alguns dos fatores que favorecem a propagação do vírus (BRASIL, 2014; NUNES *et al.*, 2015).

No Brasil, o primeiro caso autóctone de CHIKV foi confirmado em 13 de setembro de 2014, em Oiapoque, no Amapá, região norte do Brasil. Sete dias após a confirmação desse primeiro caso, outro caso autóctone foi confirmado em Feira de Santana, Bahia, região nordeste do Brasil. Oiapoque e Feira de Santana são municípios com mais de 2000 Km de distância (**Figura 11**) (NAVECA *et al.*, 2019; BRASIL, 2014). Apesar de esses terem sido os primeiros casos autóctones, o Brasil já registrava casos importados da doença, a exemplo do que consta no boletim epidemiológico Nº 20/2014: o registro de 36 casos importados de CHIKV. Até novembro de 2014, foram confirmados 1.425 casos de CHIKV (BRASIL, 2014 BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO).

De acordo com informações emitidas pela PAHO, entre os anos de 2013-2017, o Brasil registrou 773.010 casos de CHIKV, tendo, no ano de 2016, um número recorde de casos, 558.542. De todos os países que apresentaram casos em seu território, o Brasil tem ocupado posição de liderança. Entre os anos de 2018 a 2020 (julho), o país registrou 193.904 casos, com isso, atingiu a marca de 970.914 casos acumulados entre os anos de 2013-2020 (NAVECA, 2019).

Figura 11: Distribuição dos casos importados por estado e dos casos autóctones por município de residência de chikungunya no Brasil em 2014.



Fonte: Ministério da saúde, 2014.

No que se refere aos casos autóctones no Brasil, foram identificadas duas introduções separadas do CHIKV relacionadas aos genótipos: Asiático e ECSA. O genótipo asiático, cuja filogenia é idêntica a do vírus que circula no Caribe e na América do Sul, foi introduzido no Brasil em 2014, no Oiapoque, região Norte. Já o genótipo ECSA, que apresenta cepas do vírus que circulam em Angola, na África, foi identificado na região nordeste (SOUZA et al., 2019).

A introdução da chikungunya no Brasil alterou o cenário das arboviroses, pois, com o aumento dos casos autóctones, registros de casos graves e óbitos, houve o aumento da demanda por serviços de saúde, recursos humanos e financeiros, para diminuir os efeitos do vírus na sociedade (SILVA, 2018).

2.3.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico diferencial é de grande importância para identificação precisa do CHIKV, pois sua manifestação clínica pode ser semelhante a de outros patógenos que co-circulam no Brasil, como DENV e o Zika vírus (ZIKV) (MARQUES *et al*, 2017; POWERS, 2010), que são transmitidos pelo mesmo vetor, o *Aedes aegypti*. Embora essas três doenças apresentem sintomas clinicamente semelhantes, como febre, dores de cabeça, dores nas articulações e exantema, há algumas outras manifestações que as diferem. É importante salientar que o principal sintoma de Chikungunya é a artralgia a qual pode se manifestar em todas as articulações e, na maioria dos casos, nas dos pés, das mãos, tornozelos e pulsos (FIOCRUZ, 2015).

A artralgia também pode se apresentar como sintoma da dengue e da zika, mas com menor intensidade de dor. Desse modo, o paciente infectado com CHIKV apresenta dores em nível elevado, reduzindo sua produtividade e da qualidade de vida (FIOCRUZ, 2015). É importante destacar que o DENV causa uma síndrome clínica que mimetiza a infecção por CHIKV. Também é necessário levar em consideração a possibilidade de uma coinfeção do CHIKV com ZIKV e/ou DENV, que pode ocorrer durante as epidemias de arboviroses (CEROL *et al*, 2020; MARQUES *et al*, 2017).

Além do DENV e do ZIKV, há outro arbovírus que podem produzir sintomas semelhantes aos do CHIKV, o vírus Mayaro (MAYV). Do ponto de vista filogenético, o MAYV é um alfavírus parente próximo do CHIKV, que também induz sintomas agudos semelhantes aos da Chikungunya, possui características artritogênicas e também pode causar doença crônica (MARQUES *et al*, 2017).

Ao se considerar que tanto o CHIKV quanto o MAYV são membros do complexo Semliki Forest, destaca-se que uma pequena porcentagem das pessoas que residem em áreas rurais do norte e oeste do Brasil, têm anticorpos para o MAYV (VASCONCELOS *et al*., 1992) e a reatividade cruzada entre o MAYV e CHIKV já foi relatada (NUNES *et al*, 2015)

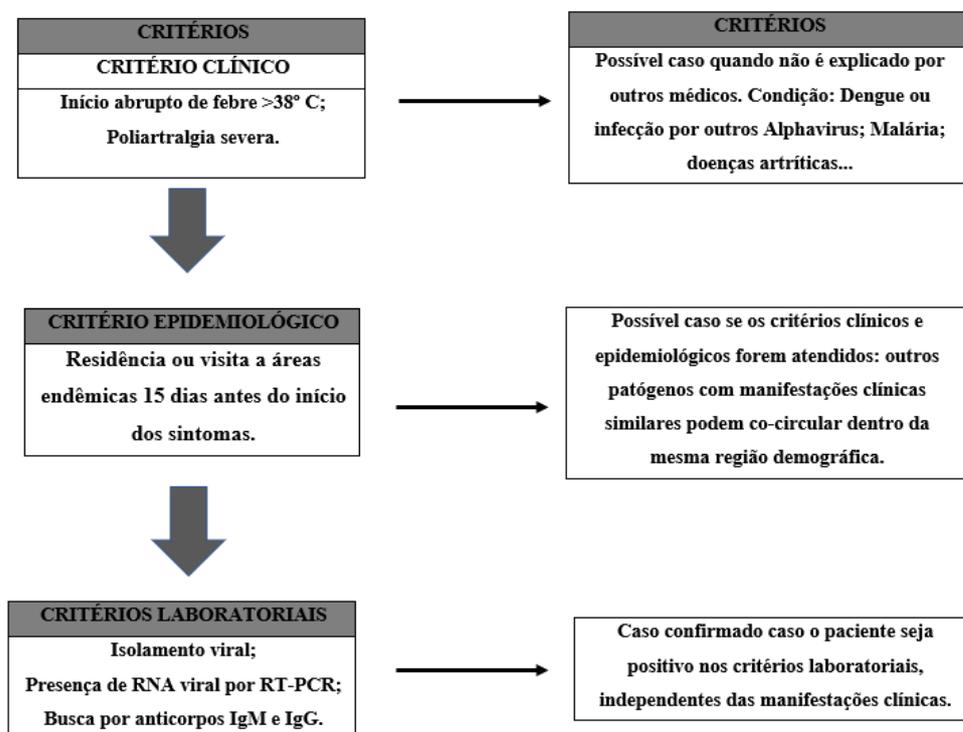
Estudos de WEBB *et al*, 2019 indicam que há uma resposta imunológica de reatividade cruzada significativa entre o MAYV e o CHIKV, o que poderia reduzir o risco de surgimento de MAYV em regiões tropicais com altos níveis de imunidade de rebanho natural de CHIKV devido à transmissão epidêmica desse vírus iniciada em 2013. Por essa razão, parece provável que a imunidade contra CHIKV forneça algum tipo de proteção contra o MAYV (NUNES *et al*, 2017).

Dessa forma, faz-se necessário uma maior disponibilidade de testes para diagnóstico específicos para CHIKV, treinamento dos profissionais de saúde, programas educacionais e um sistema nacional de vigilância para um diagnóstico diferencial de CHIKV eficiente (MARQUES *et al*, 2017).

2.3.5 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

As infecções causadas pelo CHIKV são diagnosticadas por critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (**Figura 12**). Quando ocorre um quadro agudo de artralgia ou febre, não sendo explicada por outros distúrbios médicos, geralmente é considerado um possível caso de CHIKV. E o caso se torna mais provável, quando o indivíduo visitou ou vive em um local endêmico (BURT *et al*, 2012).

Figura 12: Critérios de diagnóstico da CHIKV. Para obter um diagnóstico correto, são utilizados 3 critérios: clínico, epidemiológico e laboratorial.



Fonte: Adaptado de BURT *et al*, 2009.

Por apresentar sintomas semelhantes com a dengue e outras arboviroses transmitidas por artrópodes do gênero *Alphavirus*, a confirmação laboratorial é de suma importância para estabelecer um diagnóstico correto (WHO, 2009). As infecções podem ser confirmadas por testes laboratoriais como: testes sorológicos, isolamento viral e técnicas moleculares, como a Transcrição reversa - Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O tipo de teste realizado depende do período da doença e do volume da amostra (WHO, 2009; STAPLES *et al*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar retrospectivamente a ocorrência de infecções por CHIKV em Alagoas, no período de 2013 a 2014.

3.2 Específicos

- Investigar a presença de anticorpos específicos para CHIKV e do genoma viral em amostras de soros coletadas de pacientes com suspeita clínica de alguma arbovirose, no período de 2013 a 2014;
- Realizar isolamento viral de CHIKV de cepas selvagens em cultura celular;
- Confirmar o sucesso do isolamento viral por meio da detecção do genoma de CHIKV no sobrenadante das células inoculadas e da detecção de antígenos virais nas células por imunofluorescência.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

Este estudo é do tipo investigação analítico-descritiva, transversal e observacional, de cunho epidemiológico. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAL (processo nº 58454516.9.0000.5013; nº do parecer 2.896.643). As análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia (LAPEVI) do ICBS/UFAL.

4.2 Amostras clínicas

Para este estudo foram selecionadas amostras coletadas de pacientes com suspeita de arbovirose, entre os anos de 2013-2014, durante uma epidemia de dengue, no Hospital Escola Dr. Hέλvio Auto (HEHA), em outras unidades de saúde de Maceió e na Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Maceió (SMS). Para este trabalho, foi solicitado e autorizado pelo CEP a dispensa da assinatura de TCLE pelos sujeitos do estudo, por se tratarem de amostras de biorrepositório. Para inclusão, foram selecionadas amostras que se mostraram negativas para a pesquisa de genoma de *Flavivirus*, triadas em trabalhos anteriores do nosso grupo.

4.3 ENSAIOS SOROLÓGICOS

ELISA IgG/IgM – anti-CHIKV

Para sorologia de Chikungunya, foram utilizados kits comerciais *Anti-virus Chikungunya ELISA IgG* e *Anti-virus Chikungunya ELISA IgM* (EUROIMMUN®, Germany). Os testes foram realizados da seguinte maneira: Cada poço da placa contendo tiras com 8 poços destacáveis é revestido com antígenos de vírus CHIKV recombinante, em cada poço foi adicionado 100 µL do respectivo soro teste (diluído 1:101) e dos três calibradores do kit (para o ELISA IgM anti-CHIKV, é necessário apenas 1 calibrador), sem diluição, junto com os controles positivo e negativo e incubado a 37°C por 1 hora, na etapa seguinte os poços foram lavados três vezes com solução de lavagem 1X e foi adicionado 100 µL de conjugado (anticorpo IgG anti-IgG ou anti-IgM humanas marcado com peroxidase) em cada poço, a placa foi incubada por 30 min. em temperatura ambiente

(T.A.). Na etapa seguinte, os poços foram lavados por três vezes e depois foi adicionado um volume de 100 µL/poço do substrato/cromógeno, que foi incubado a T.A. por 15 min., protegido da luz. Na etapa final foi adicionado 100 µL de solução de parada (sol. stop) em cada poço e a placa foi lida em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm e filtro de referência de 630 nm.

Para o teste de ELISA IgG anti-CHIKV, os resultados foram analisados de forma quantitativa, então, foi necessário construir uma **curva de calibração**. As absorbâncias dos testes foram anotadas e interpoladas em uma curva de calibração obtida através do Microsoft Office Excel®, no qual as absorbâncias e as concentrações conhecidas dos calibradores do kit foram utilizadas para construir um gráfico de dispersão (X, Y). Os valores das absorbâncias dos 3 calibradores foram incluídos no eixo Y, e os valores das concentrações em Unidades relativas por mililitro (RU/mL), no eixo X. Para calcular a concentração dos anticorpos em cada amostra, o gráfico mostrou uma equação de 1º grau, dada pela fórmula $Y = A.X+B$, onde o valor de Y será substituído pelo valor de absorbância de cada amostra-teste, e os valores de A e B serão então fornecidos pelo gráfico. Já para o teste de ELISA IgM anti-CHIKV, os resultados foram analisados de forma semiquantitativa, onde o valor da absorbância da amostra do paciente irá ser dividido pela absorbância do calibrador.

Isolamento viral

Para o isolamento viral, foram utilizadas as linhagens de células VERO E6 (ATCC CRL-1586) e C6/36, que foram cultivadas em garrafas de 12,5 cm². Foram semeadas aproximadamente $1,66 \times 10^6$ células por garrafa de cultura celular, num volume final de 3 mL de meio Leibowitz (L15 - Gibco, USA), contendo 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B (PSA). Nas células C6/36 também foram adicionados 10% de caldo triptose fosfato ao meio. Tanto as células VERO E6 (ATCC CRL-1586) quanto as C6/36 foram mantidas em estufa por 24h, até o momento da infecção.

As amostras foram inoculadas nas garrafas de cultura, que foram semeadas com células contendo pelo menos 80% de confluência de sua monocamada. A diluição das amostras foi feita da seguinte maneira: 25µL de amostra diluída em 475 mL de meio L-15 puro, numa proporção de 1:20. Após essa etapa, o soro diluído foi adicionado na

monocamada das células e as garrafas incubadas por 1h, sendo homogeneizadas e observadas a cada 15 min. Ao término de 1 hora, o volume do inóculo foi retirado da monocamada e colocado em microtubo de 1,5ml e centrifugado a 3000 RPM por 5 minutos; o sobrenadante foi descartado, com o objetivo de eliminar substâncias tóxicas presentes no soro, o pellet de células foi ressuspenso em 1 ml de meio L-15 2% (contendo 2% de SFB, 2% Triptose, apenas em C6/36, e 1% de PSA) e adicionado novamente na garrafa com mais 2 mL de meio L-15 2%. As garrafas que foram incubadas e observadas diariamente para a verificação de efeito citopático viral (ECP), após o período de aproximadamente 6 a 20 dias, as células foram removidas dos frascos de cultura e fixadas em lâmina de microscópio para teste de confirmação de infecção por imunofluorescência indireta.

Imunofluorescência indireta (IFI) para confirmação dos isolados virais

O pellet celular foi obtido após a centrifugação (3000 rpm, 5 min.) dos sobrenadantes das células inoculadas, o pellet foi lavado 3 X com PBS e aplicado em spots, em duplicata, em lâminas para imunofluorescência. Após a secagem das lâminas, as mesmas foram fixadas em metanol P.A. + acetona gelados na proporção 1:1 por 3 min. e deixadas secar a temperatura ambiente (T. A). A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpos primário monoclonal anti-proteína E de alfavírus diluído 1:100 em PBS com 25µL por spot, por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após incubação, as lâminas foram lavadas 3 X (imersão em PBS não estéril por 5 min.) e secas a T.A. A seguir, foi adicionado 25µL por spot do conjugado Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse IgG (H+L) diluído 1:100 em PBS e as lâminas foram incubadas a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Transcorrido o período da segunda incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes por imersão por 5 minutos em PBS 1X não estéril, e secas em T.A. Por fim, as lâminas foram cobertas com glicerol 10% em PBS, preparadas com lamínula e visualizadas em microscópio com luz UV na objetiva de 10X.

4.4 ENSAIOS MOLECULARES

Extração dos RNA virais

A extração dos RNAs virais a partir das amostras de soro (140µL) e das alíquotas de controle positivo (estoques virais) e negativo (soro de voluntário saudável ou água

ultrapura), foi realizada utilizando kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante.

Pesquisa do genoma de CHIKV: Foram realizadas análises para o genoma do CHIKV através de uma PCR espécie-específica, segundo protocolo adaptado de HASEBE et al, 2002. Neste protocolo, utilizou-se primers que se anelam ao gene da proteína não-estrutural p1 (NSp1) do vírus, produzindo amplicons de 354 pb.

Reação de transcrição reversa

Primeira etapa: Preparou-se mix de reagentes contendo: 6,6µL de água DEPC; 0,4µL de dNTPs a 10µM; e 1µL de primer CHIKV/nsP1-C a 25µM (5'-CTTTAATCGCCTGGTGGTAT-3'), distribuída em microtubos de 200µL. Adicionou-se a seguir 5µL de RNA extraído de amostra e/ou de controles, e os tubos foram submetidos a desnaturação a 70°C, seguido de banho de gelo, por 2 min.

Segunda etapa: Uma segunda mix de reagentes foi preparada da seguinte forma: 4,0 µL de tampão da enzima 5X; 2µL de DTT a 0,1M; 0,5µL de inibidor de RNase a 40U/µL e 0,5µL de enzima MMLV-RT a 200U/µL. Esta mix foi adicionada sobre a mix anterior e a reação de transcrição se processa a 37°C por 50 min., seguida de 70°C por 15 min., para inativação da enzima.

Reação de PCR e eletroforese

Reação de PCR para CHIKV e eletroforese: Preparou-se uma mix de reagentes contendo: 16,05 µL de água DEPC; 2,5µL de tampão da enzima 10X; 0,75µL de MgCl₂ a 50mM; 0,5 µL de dNTP a 10mM; 0,5µL CHIKV/nsP1-C a 25µM; 0,5µL CHIKV/nsP1-S a 25µM (5'- TAG AGC AGG AAA TTG ATC CC – 3') e 0,4 µL de Taq polimerase a 5U/µL. Adicionou-se 4µl de cDNA, sendo o volume final da reação igual a 50uL. Os tubos de reação foram submetidos aos seguintes ciclos em termociclador: um ciclo inicial a 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C por 30 segundos e 12°C ∞. Os produtos das reações (amplicons) foram visualizados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% (peso\volume), corados com brometo de etídio, e visualizados em um transiluminador UV. Comparou-se os tamanhos das bandas apresentadas com um

marcador de peso molecular padrão de 100pb (Qiagen®), sendo o tamanho esperado do amplicon para CHIKV de 354pb.

5. RESULTADOS

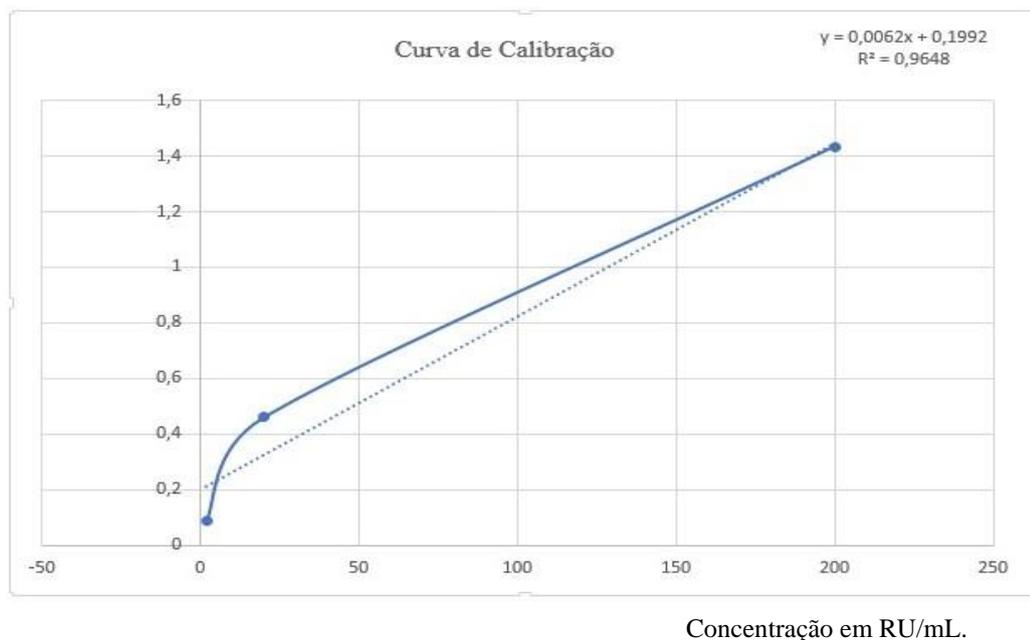
Neste trabalho foram triadas para diagnóstico retrospectivo de Chikungunya 44 amostras de soro, provenientes de biorrepositório, que haviam sido obtidas de indivíduos apresentando doença febril aguda e suspeita de infecção por DENV, coletadas entre os anos de 2013-2014. As amostras que se apresentaram negativas para DENV e outros flavivírus em estudos anteriores, foram então triadas para CHIKV pelos testes ELISA (IgM e IgG) (n=24), isolamento viral (n=11; entre as quais algumas triadas por imunofluorescência) e RT-PCR (n=21), sendo que uma dessas amostras foi submetida a todos os testes e as demais apenas a um ou a dois deles.

Para as análises de isolamento e moleculares, as amostras testadas foram aquelas que tinham sido coletadas com até 7 dias do início dos sintomas. Já as amostras submetidas à sorologia de IgM e IgG anti-CHIKV foram coletadas na fase convalescente (≥ 8 dias; n= 10) e na fase aguda (≤ 7 dias; n= 12) da doença. Porém, ressalta-se que para 2 dos 24 pacientes testados por sorologia, não havia informações sobre data de início dos sintomas em suas fichas de registro.

Para obtenção dos resultados do ELISA IgG anti-CHIKV, foi construída uma curva de calibração, a qual permitiu chegar aos resultados da concentração de anticorpos em Unidades Relativas por mililitro de soro (RU/mL), conforme gráfico mostrado na **Figura 13**, que é a plotagem ponto-a-ponto dos valores da absorbância dos 3 calibradores do kit, pelas unidades correspondentes (linear/linear).

O cálculo foi realizado a partir de uma equação de 1º grau representada por $Y = A.X+B$, onde o valor de Y foi substituído pela absorbância das amostras e o valor de X o resultado procurado, conforme o gráfico constante na figura 12. O valor de R^2 corresponde à regressão linear, sendo que para veracidade desse cálculo o valor de R^2 deve ser $> 0,95$. Assim, a curva de calibração foi construída com o uso de calibradores nas concentrações 200 RU/ml; 20 RU/ml; 2 RU/ml, fornecidos pelo kit, e o valor das D.O.s (densidades óticas) obtidas no teste.

Figura 13: Curva de calibração construída para a quantificação de anticorpos IgG anti-CHIKV.



Já os resultados do ELISA IgM anti-CHIKV, foram obtidos a partir da divisão da absorbância da amostra do paciente pela absorbância do calibrador, resultando em um **índice** cuja interpretação é mostrada no Quadro 1. De acordo com o protocolo do kit, os resultados das concentrações de IgG e IgM, respectivamente, devem ser interpretados segundo o Quadro 1:

Quadro 1: Interpretação de resultados para as concentrações de IgG anti-CHIKV e para os índices obtidos no teste de detecção de anticorpos IgM anti-CHIKV.

IgG	Positivo: ≥ 22 RU/mL	IgM	Positivo: $\geq 1,1$
	Borderline: ≥ 16 a 22 RU/mL		Borderline: $\geq 0,8$ a $<1,1$
	Negativo: <16 RU/mL		Negativo: $< 0,8$

NOTA: RU/mL significa Unidades Relativas por mililitro

O resultado da pesquisa de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV nas 24 amostras de soro investigadas por sorologia é mostrado na **Tabela 1**.

Tabela 1: Amostras processadas para pesquisa de anticorpos anti-CHIKV e as respectivas concentrações de IgG/IgM encontradas.

<i>Data de coleta da amostra*</i>	<i>Amostra</i>	<i>Dias de infecção no momento da coleta*</i>	<i>Suspeita clínica principal</i>	<i>IgG anti-CHIKV (em RU/mL)</i>	<i>Índice de IgM anti-CHIKV</i>	<i>Interpretação</i>
18/12/2013	144H	8	Dengue	≤0	0,72	Não reagente para IgG e IgM.
13/01/2014	150H	7	Dengue	≤0	0,86	Não reagente para IgG e IgM.
24/04/2014	164H	9	Dengue	≤0	0,64	Não reagente para IgG e IgM.
28/05/2014	189H	7	Dengue	≤0	0,98	Não reagente para IgG e duvidoso para IgM.
02/06/2014	190H	7	Dengue	6,9	0,25	Não reagente para IgG e IgM.
02/06/2014	191H	7	Dengue	≤0	0,26	Não reagente para IgG e IgM.
31/05/2014	192H	8	Dengue	≤0	0,22	Não reagente para IgG e IgM.
15/06/2014	238H	7	Dengue	16,39	0,21	Duvidoso para IgG e não reagente para IgM.
20/06/2014	276H	4	Dengue	19,2	2,46	Duvidoso para IgG e reagente para IgM.
-	305H	7	Dengue	≤0	0,64	Não reagente para IgG e IgM.
24/06/2014	314H	8	Dengue	67,70	0,81	Reagente para IgG e duvidoso para IgM.
07/07/2014	408H	-	Dengue	≤0	0,41	Não reagente para IgG e IgM.
25/07/2014	569H	7	Dengue	≤0	0,37	Não reagente para IgG e IgM.
02/08/2014	595H	9	Dengue	≤0	0,49	Não reagente para IgG e IgM.
04/08/2014	613H	8	Dengue	≤0	0,51	Não reagente para IgG e IgM.
07/08/2014	630H	8	Dengue	9,4	1,50	Não reagente para IgG e reagente para IgM.
07/08/2014	633H	-	Dengue	34,05	0,06	Reagente para IgG e não reagente para IgM.
08/08/2014	645H	8	Dengue	≤0	0,38	Não reagente para IgG e IgM.
30/08/2014	676H	8	Dengue	≤0	0,88	Não reagente para IgG e IgM.
07/09/2014	687H	8	Dengue	≤0	1,66	Não reagente para IgG e duvidoso para IgM.
08/09/2014	693H	3	Dengue	17,33	0,32	Duvidoso para IgG e não reagente para IgM.
09/09/2014	694H	3	Dengue	35,31	0,56	Reagente para IgG e não reagente para IgM.
09/09/2014	698H	4	Dengue	22,47	0,03	Reagente para IgG e não reagente para IgM.
24/09/2014	733H	3	Dengue	19,09	0,62	Duvidoso para IgG e não reagente para IgM.

* A informação não consta na ficha do paciente.

Na pesquisa de IgM, duas das amostras (276H e 630H), que corresponderam a 8,33% e foram coletadas em junho e em agosto de 2014, apresentaram resultados positivos. Vale ressaltar, porém, que dentre as amostras mais precoces, outras três mostraram resultado duvidoso para IgM (189H, 314H e 687H), tendo sido coletadas em maio, setembro e junho de 2014, respectivamente (**Tabela 1**).

Já na pesquisa de IgG, quatro das amostras (16,7%) se mostraram positivas (314H, 633H, 694H, 698H) e outras quatro apresentaram níveis limítrofes de IgG, sendo então classificadas como duvidosas (238H, 276H, 693H, 733H), conforme destacado na **Tabela 1**. Chama a atenção que a amostra 314H, uma das mais precoces, foi coletada em junho de 2014.

Considerando-se os achados com as amostras reagentes, seja para IgM seja para IgG, nossos dados mostram evidências da circulação precoce de CHIKV em Alagoas, ou seja, pelo menos desde maio de 2014 (vide 276H IgM positiva). Contudo, para confirmação com metodologia adicional, somente três amostras (das 24 triadas por ELISA) puderam ser testadas por outro método de detecção, e foram as seguintes: a amostra 276H foi triada por sorologia e por PCR, e as amostras 630H e 693H foram triadas por sorologia, PCR e isolamento, cujos resultados serão expostos a seguir.

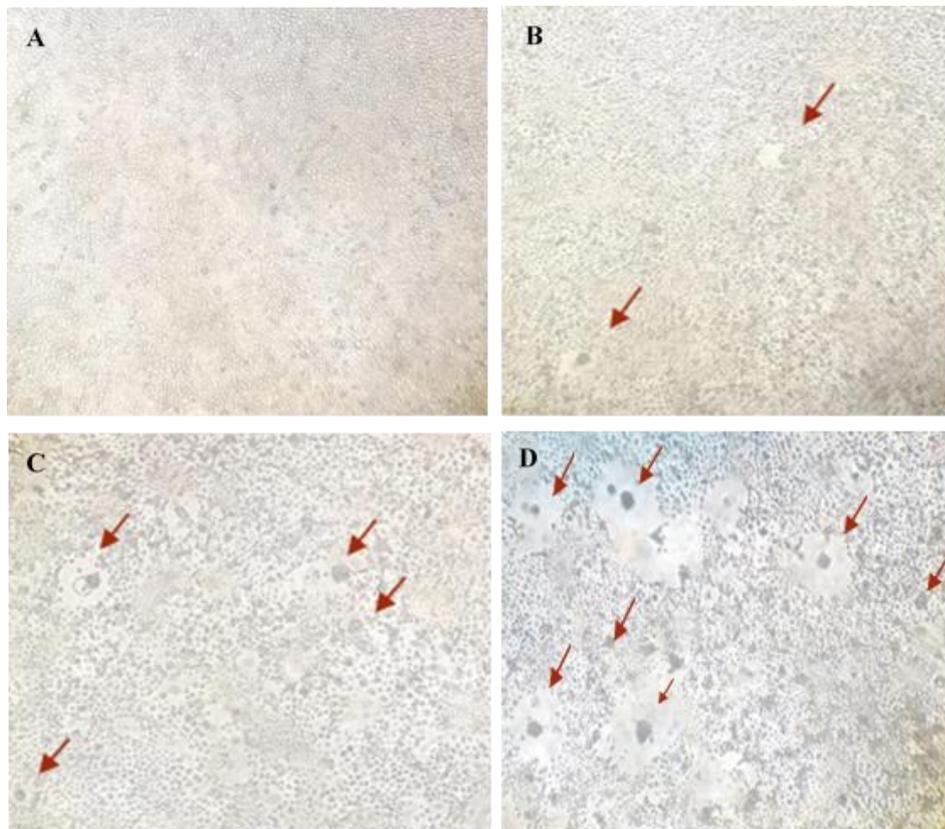
Para tentativas de isolamento viral, 11 amostras (**Tabela 2**) foram inoculadas em células da linhagem VERO/E6 e C6/36. Após o período de incubação, de 5 a 14 dias, observou-se desenvolvimento de efeito citopático (ECP) em apenas uma amostra (9,09%), identificada como 630H. Todas as amostras tiveram seu sobrenadante colhido para a confirmação ou descarte da infecção por IFI.

Tabela 2: Identificação e resultado das amostras de soro inoculadas em cultura para tentativa de isolamento viral

<i>Data de coleta da amostra</i>	<i>Amostras</i>	<i>Desenvolvimento ECP</i>	<i>Imunofluorescência indireta</i>
03/02/2014	154H	Não	Negativa
26/05/2014	174H	Não	Negativa
-	241H	Não	Negativa
07/08/2014	630H	Sim	Positiva
25/08/2014	660H	Não	Negativa
28/08/2014	666H	Não	Negativa
30/08/2014	670H	Não	Negativa
04/09/2014	681H	Não	Negativa
08/09/2014	692H	Não	Negativa
08/09/2014	693H	Não	Negativa
13/09/2014	705H	Não	Negativa

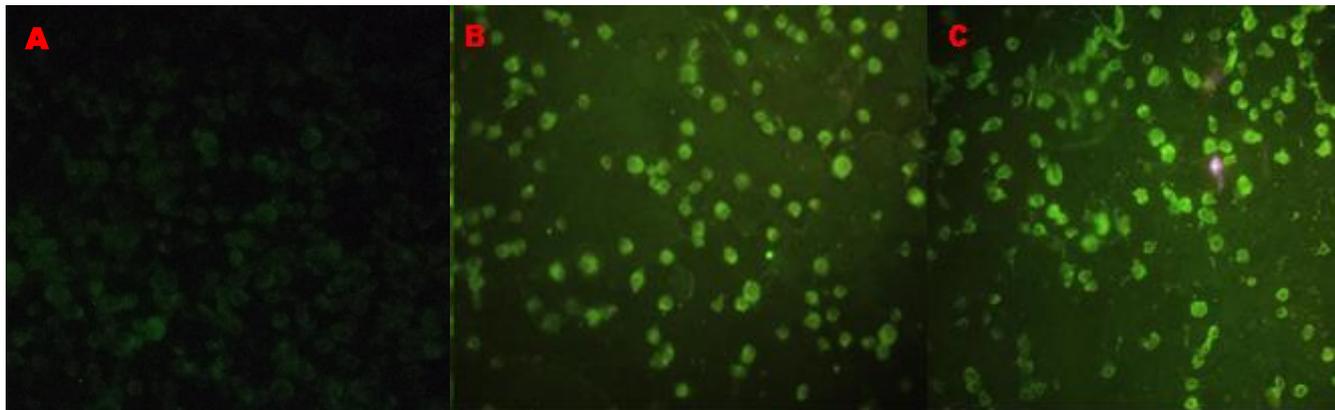
Essa amostra, com resultado positivo, foi colhida de um paciente com oito dias de infecção, em agosto de 2014. Este soro tinha mostrado presença de IgM na triagem sorológica. Na inoculação em cultura desta amostra 630H em primeira passagem, obteve-se sucesso no isolamento do vírus em células C6/36 e também em células VERO-E6, porém o efeito citopático somente ficou visível em C6/36 (**Figura 14**).

Figura 14: Monocamada de células C6/36 inoculadas com a amostra 630H, primeira passagem (P.1) mostrando o efeito citopático do vírus Chikungunya isolado. (A) Controle negativo; (B) Monocamada com 4 dias de infecção; (C) Monocamada com 5 dias de infecção; (D) Monocamada com 10 dias de infecção. As setas vermelhas indicam formação de sincícios e células aumentadas.



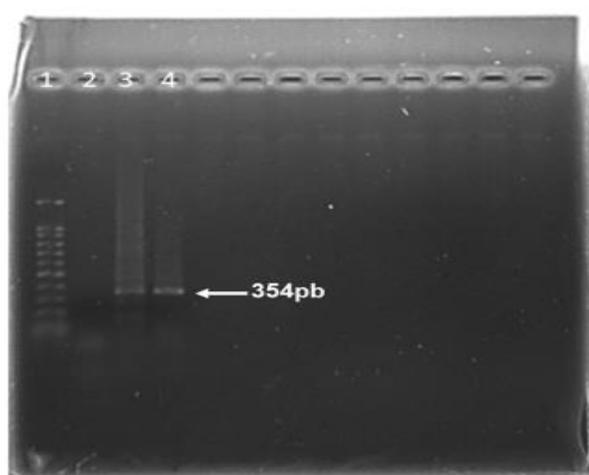
Para confirmação das infecções *in vitro* por CHIKV, nas células inoculadas para isolamento, foram confeccionadas lâminas para imunofluorescência indireta (IFI) com as células recolhidas de todas as 11 amostras inoculadas em cultura. Deste modo, foi também confirmado por IFI o sucesso do isolamento de CHIKV a partir do soro 630H (e apenas nesta amostra; 9,1%), conforme observado na **figura 15**. A cepa deste isolado viral foi então chamada de CHIKV Mcz630.

Figura 15: Imunofluorescência para confirmação do isolamento de CHIKV a partir da amostra de soro 630H. (A) Controle negativo, (B) Cepa CHIKV Mcz 630, (C) controle positivo (cepa CHIKV Mcz780).



Na confirmação molecular do isolado 630H, foi realizada reação de RT-PCR do sobrenadante das células inoculadas com a amostra de soro, e obteve-se amplificação positiva do genoma do CHIKV cepa Mcz630, confirmando o sucesso do isolamento viral (**Figura 16**). Este resultado mostra que infecções por CHIKV já vinham ocorrendo em Alagoas, pelo menos desde agosto de 2014, data em que o soro 630H foi coletado do paciente.

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% mostrando os produtos da reação de RT-PCR para o vírus Chikungunya, obtido do sobrenadante de cultura inoculada com a amostra 630H (isolado 630H; cepa Mcz630). Na figura, a linha 1 indica o marcador de peso molecular de 100pb; linha 2, controle negativo; linha 3, isolado 630H mostrando banda esperada de 354pb, positivo para CHIKV e linha 4, controle positivo de CHIKV cepa Mcz780H.



Além do soro 630H, outras amostras também foram submetidas à triagem molecular, sendo que foram testadas por RT-PCR no total 21 amostras. Seis destas amostras de soro também tiveram seu isolado (sobrenadante de cultura de células inoculadas) triado para pesquisa do genoma do CHIKV, conforme conta na **Tabela 3**.

Tabela 3: Resultados dos testes realizados em pares de amostras de soro e seus isolados virais (sobrenadante de cultura de células inoculadas) para a detecção do genoma do vírus CHIKV.

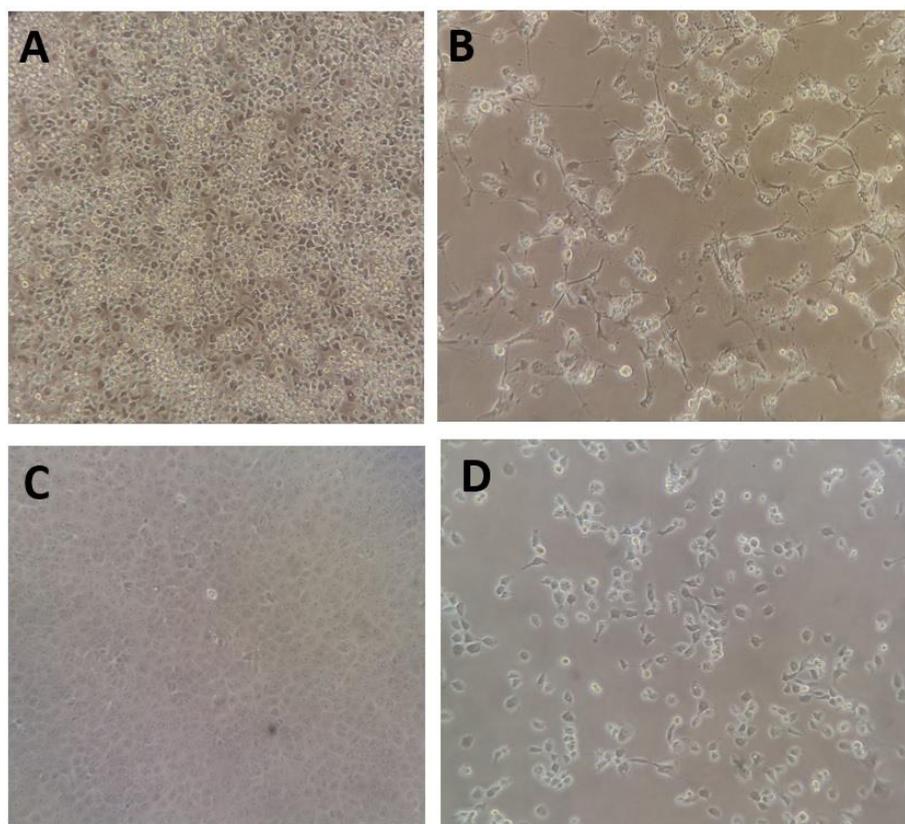
<i>Data da coleta da amostra</i>	<i>Amostras</i>	<i>RT-PCR</i>	
		Soro	Isolado
28/05/2014	189H	Negativo	-
12/06/2014	227H	Negativo	-
14/06/2014	233H	Negativo	-
15/06/2014	234H	Negativo	-
14/06/2014	236H	Negativo	-
15/06/2014	238H	Negativo	-
18/06/2014	259H	Negativo	-
20/06/2014	276H	Negativo	-
17/07/2014	516H	Negativo	-
24/07/2014	562H	Negativo	-
04/08/2014	618H	Negativo	-
07/08/2014	630H	Negativo	Positivo
07/08/2014	640H	Negativo	-
25/08/2014	660H	Negativo	-
28/08/2014	666H	Negativo	-
30/08/2014	670H	Negativo	Negativo
01/09/2014	677H	Negativo	-
04/09/2014	681H	Negativo	Negativo
08/09/2014	692H	Negativo	Negativo
08/09/2014	693H	Negativo	Negativo
13/09/2014	705H	Negativo	Negativo

Contudo, dentre todas as amostras analisadas por RT-PCR de RNAs extraídos diretamente do soro, nenhuma amostra deste estudo mostrou amplificação de genoma de CHIKV (**Tabela 3**). Foi obtido um resultado positivo de genoma de CHIKV somente quando o RT-PCR foi realizado do sobrenadante de cultura de células inoculadas com a amostras de soro 630H (**figura 16**).

Finalmente, considerando-se a relevância epidemiológica da obtenção da cepa CHIKV Mcz630, foram realizadas outras duas passagens virais do isolado 630H, para

aumento do título e expansão do estoque viral. Nestas duas passagens, para o inóculo inicial partiu-se do isolado primário, ou primeira passagem (P.1). As segunda e terceira passagens (P.2 e P.3) foram realizadas em células C6/36 e em Vero E6, e foram aliquotadas e armazenadas para uso em experimentos futuros, como sequenciamento e análises funcionais desta cepa. O resultado dessas inoculações, observado como efeito citopático, em P.2 e P.3 são mostrados na **figura 17**.

Figura 17: Efeito citopático do CHIKV isolado originalmente da amostra de soro 630H, aqui em segunda e terceira passagens (P.2 e P.3) após inoculação do isolado primário em linhagens de células C6/36 e Vero E6. (A) Controle negativo (mock) de monocamada de células C6/36 não inoculadas com soro; (B) Células C6/36 inoculadas na segunda passagem viral (P.2), com 6 dias pós-infecção (p.i.) mostrando intenso efeito citopático; (C) Monocamada de células Vero E6 (mock) não infectadas; (D) Células Vero E6 inoculadas na terceira passagem viral (P.3), com 1 dia p.i, mostrando destruição da monocamada de células.



No total, dentre as 44 amostras incluídas neste estudo, **6** (13,63%) mostraram positividade em pelo menos um dos testes realizados, com destaque para a amostra 630H, positiva em quatro testes. Em conjunto, os achados de duas amostras IgM positivas (276H e 630H), quatro amostras IgG positivas (314H, 633H, 694H, 698H), e um isolado positivo (630H) demonstram que o vírus CHIKV já estava presente em Alagoas causando infecções humanas, que foram clinicamente confundidas e notificadas como dengue no ano de 2014.

6. DISCUSSÃO

Com o intuito de investigar a ocorrência de infecções por CHIKV anteriores ao ano de 2015 no estado de Alagoas, este trabalho analisou amostras clínicas provenientes de indivíduos com suspeita de infecção por DENV coletadas, principalmente, ao longo de 2014. Tal análise baseou-se no fato de os sintomas e a cocirculação das arboviroses no país, como dengue e zika, dificultarem a diferenciação entre essas doenças, fazendo com que haja subnotificação de casos, sendo seu o diagnóstico considerado um desafio para o sistema de saúde, o que afeta a prevenção e desenvolvimento de estratégias para seu tratamento (BAGNO et al., 2019). O interesse em analisar amostras coletadas em 2014 para detecção de casos pregressos de CHIKV advém do fato de que, segundo a Secretaria de Saúde do Estado, o CHIKV só teria começado a circular em Alagoas a partir do ano de 2015 (SESAU/AL, 2016).

Conforme apresentado na seção anterior, foram testadas 44 amostras escolhidas a partir de uma triagem que considerou o intervalo de dias após o início dos sintomas. A escolha do teste adequado está condicionada à relação método/tempo, dependendo do marcador que cada teste detecta, o qual está relacionado ao intervalo de dias após o início dos sintomas em que a coleta da amostra é realizada. Isso porque, de acordo com Chu & Ang (2016), o momento apropriado de coleta de amostra e de o uso do resultado da metodologia de diagnóstico mais adequado é crucial para um diagnóstico preciso da infecção por CHIKV.

O diagnóstico laboratorial de infecção por CHIKV pode ser confirmado usando dois testes diferentes: detecção do RNA viral e identificação da resposta imune específica (IgM e IgG), através de ensaios sorológicos. Os testes sorológicos são os métodos mais comuns em razão de os anticorpos começarem a aparecer alguns dias após o início dos sintomas (CHU; ANG, 2016), e fornecerem informações valiosas das respostas imunológicas à infecção por CHIKV. Vários tipos de ELISA foram desenvolvidos para detectar anticorpos anti-CHIKV e aqueles que usam o antígeno viral completo (como o que foi utilizado neste trabalho) para sensibilização da placa têm sido os métodos preferidos (NATRAJAN et al, 2019), embora demonstrem um desempenho aceitável, mas não perfeito.

Um estudo que comparou o desempenho de três kits de ELISA comercialmente disponíveis para detecção de anticorpos IgG anti-CHIKV mostrou que o kit da

Euroimmun (o qual foi utilizado neste trabalho) teve 100% de sensibilidade, 81,8% de especificidade para detecção dos anticorpos, e 22,2% de resultados falso-positivos, o que mostra certa limitação do ensaio para uso clínico (SALAZAR et al., 2017). Neste sentido, outro estudo anterior havia já demonstrado que kits comerciais para detecção de anticorpos anti-CHIKV podem reagir cruzado com amostras de soro contendo IgM e IgG contra os alphavírus Mayaro e O'nyong-nyong, embora o kit da Euroimmun só tenha detectado IgG anti-Mayaro e não IgM (PRAT et al, 2014). Digno de nota, este dado se mostra relevante, visto que o vírus Mayaro é endêmico na região Norte do Brasil (FIGUEIREDO e FIGUEIREDO, 2014; PEZZI et al., 2019), e existe, portanto, a possibilidade de vir a emergir em outras partes do país, inclusive em Alagoas. O mesmo estudo de Prat e cols. (2014) mostrou que os testes de Elisa da Euroimmun tiveram o seguinte desempenho: especificidade de 82% para IgM e de 95% para IgG e sensibilidade de 85% para IgM e 88% para IgG, com 18% de falsos positivos para IgM.

Em nosso trabalho, anticorpos IgM anti-CHIKV foram evidenciados em duas das amostras testadas (276H e 630H), as quais foram coletadas nos meses de junho e agosto de 2014. Este resultado indica que estes dois pacientes haviam sido infectados por CHIKV recentemente naquele ano. No caso do paciente 630H, como será discutido mais adiante, foi confirmada infecção aguda na ocasião da coleta, visto que conseguimos realizar o isolamento do vírus em cultura.

Uma variável importante para o uso de testes sorológicos é a extensão da duração de anticorpos detectáveis no sangue após a infecção aguda (NATRAJAN et al., 2019). Segundo Niedrig e cols (2009), anticorpos IgM and IgG podem ser detectados rapidamente após início dos sintomas. A primeira classe de anticorpos a ser identificada no soro do paciente durante a fase aguda do CHIKV é IgM, que pode ser identificada entre o 3º e 6º dias da doença, e tende a atingir o pico entre 4 e 20 dias após o início dos sintomas. Contudo, sabe-se que anticorpos IgM anti-CHIKV podem persistir até 6 meses (CHU; ANG, 2016; CHUA et al, 2017), ou até por períodos mais prolongados, em casos excepcionais, como 11 a 18 meses pós-infecção (NATRAJAN et al., 2019).

Por sua vez, anticorpos IgG podem ser identificados num período de 4 a 7 dias a partir do início da doença, podendo persistir por anos no organismo e podem indicar proteção vitalícia (SUHRBIER et al, 2012; CHUA et al, 2017; NATRAJAN et al., 2019). Em nosso estudo, de todas as amostras testadas, quatro delas (314H, 633H, 694H e 698H),

colhidas entre os meses de junho a setembro de 2014, demonstraram resultado positivo para IgG anti-CHIKV, o que indica infecção recente ou passada.

Anticorpos IgG geralmente surgem logo após a detecção de IgM, como os IgG anti-proteína E2, que já foram detectados em apenas 6 dias após o início dos sintomas (NATRAJAN et al., 2019). Porém, os anticorpos com ação neutralizante não são detectados antes do 10º dia de doença (CHUSRI et al, 2014). Vale ressaltar, ainda, que existe variação intraindividual no que diz respeito ao início da produção de anticorpos frente à CHIKV aguda. No estudo realizado por Taubitz e cols (2007) alguns dos pacientes analisados só demonstraram soroc conversão (inclusive para IgM) após a primeira semana do início dos sintomas, e três de cinco pacientes mostraram resultados negativos na testagem durante a primeira semana, sendo IgG não detectável antes do 6º dia (TAUBITZ et al., 2007). De fato, o 6º dia de doença parece ser o divisor de águas da doença, pois é quando ocorre a rápida diminuição da carga viral, ao mesmo tempo em que ocorre o aumento exponencial dos níveis de IgM anti-CHIKV IgM no sangue (CHUSRI et al, 2014). Por esta razão, no presente trabalho, optamos por realizar os ensaios sorológicos somente tanto nas amostras consideradas de fase aguda (<7 dias) quanto convalescente (>7 dias de doença).

No que se refere aos testes moleculares, de acordo com REDDY et al. (2012), os ensaios para detecção do RNA viral são os métodos mais sensíveis para a detecção do CHIKV. O teste de RT-PCR é o método mais utilizado para esse fim, embora o ensaio no formato real-time RT-PCR seja apontado como o mais sensível de todos (NATRAJAN et al, 2019). Todavia, não existe um padrão ouro molecular para avaliar os ensaios moleculares em relação ao diagnóstico de CHIKV, e a decisão de implementar um teste particular depende das vantagens e desvantagens relativas do método junto com os recursos de um determinado laboratório (NATRAJAN et al, 2019).

O RNA viral pode ser detectado no soro do paciente utilizando-se da RT-PCR em amostras colhidas durante a fase virêmica inicial da doença, durante os sete primeiros dias do aparecimento dos sintomas, porém, com maiores chances de sucesso até o 5º dia de doença (CHUSRI et al, 2014). Apesar disso, dentre os soros analisados por RT-PCR em nosso estudo, todos apresentaram resultado negativo. Não obstante, mesmo com resultado negativo na RT-PCR, seis dessas amostras foram inoculadas em cultura para tentativa de isolamento viral e a amostra 630H apresentou resultado positivo na visualização do efeito citopático viral (ECP) sob microscopia ótica.

Esta amostra de soro 630H foi colhida de uma paciente no 8º dia do início dos sintomas, e embora com resultado de RT-PCR negativo, havia sido IgM anti-CHIKV positiva no teste de ELISA. Após a observação do ECP, o sobrenadante das células do isolado viral foi então testado por RT-PCR e IFI, e ambos os testes confirmaram a presença de CHIKV na amostra. O isolado viral chamado de Mcz630 obtido neste trabalho demonstra a presença precoce do CHIKV no estado de Alagoas, no ano de 2014.

É importante considerar o lapso de tempo que existe entre a data em que esta amostra foi colhida (07 de agosto de 2014) e os registros dos primeiros casos autóctones de chikungunya em Alagoas. De acordo com dados oficiais do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (Boletim epidemiológico, volume 46 nº 44-2015), só se teve registro da ocorrência de CHIKV em Alagoas no ano de 2015. Nossos dados contrariam os registros oficiais, e estão em consonância com o estudo de SOUZA et al (2019), que, com base em modelos matemáticos e logaritmos/análises de relógio molecular, trazem evidências teóricas de que o CHIKV foi introduzido no Brasil já em 2013, um ano antes da detecção oficial do primeiro caso autóctone do vírus no país. As análises de sequência do CHIKV de diversas estirpes virais analisadas no estudo de Souza e cols (2019) (todas de 2015 em diante) revelam que o genótipo ECSA circulava no país um ano antes de ser identificado. Revelam, também, que os casos de CHIKV no Brasil estão relacionados à estirpe detectada na República Centro-Africana ainda na década de 1980, destacando que a circulação do CHIKV-ECSA foi negligenciada por anos em todo mundo.

O mesmo estudo filogenético de SOUZA et al (2019) estimou o período da introdução do genótipo ECSA de CHIKV no estado da Bahia, Nordeste do Brasil, no início do ano de 2013, vindo provavelmente de um país africano e se disseminando para outros estados brasileiros. Isto teria ocorrido tanto na região Nordeste (como em Alagoas e Paraíba) quanto na região Sudeste, principalmente no estado do Rio de Janeiro, onde a introdução do genótipo ECSA foi datada para o início de 2014, após o que o vírus teria voltado para a região Nordeste, chegando em Sergipe.

É fundamental ressaltar que estas hipóteses são todas embasadas apenas nos resultados de análises realizadas utilizando-se modelos matemáticos teóricos que avaliam a taxa de mutação espontânea do CHIKV e as sequências genéticas de cepas de CHIKV coletadas no Brasil nos anos de 2015 e 2016. Nenhum trabalho havia obtido o isolamento de uma cepa de CHIKV de 2014 fora das áreas de entrada oficial do vírus no país (Oiapoque-AP

e Feira de Santana-BA), e daí a importância da obtenção do isolado viral Mcz630 em nosso trabalho.

Em consonância com nossos resultados, o trabalho de Azevedo e cols. (2015) defende que casos importados de Chikungunya e indivíduos virêmicos começaram a aparecer pela primeira vez no Brasil a partir junho de 2014, e somente no mês de setembro daquele ano ocorreu o primeiro caso com transmissão autóctone no Brasil, no Amapá. Naquele mesmo mês, um surto de CHIKV foi detectado em Feira de Santana, BA (MAGALHÃES et al., 2017).

Em resumo, nossos dados conjuntos de sorologia e isolamento viral – que mostraram dois pacientes com IgM positiva, quatro com IgG positiva anti-CHIKV e que obteve o isolado clínico CHIKV Mcz630 em amostras coletadas no ano de 2014 – demonstram que o CHIKV já estava em circulação no estado de Alagoas desde ao menos um ano antes do registro oficial de casos autóctones, e que, então, provavelmente tenha entrado no país e sido transmitido silenciosamente entre indivíduos em diferentes municípios e regiões ainda antes disso.

Por fim, vale ainda destacar que a emergência do CHIKV no Brasil e em outros países da América do Sul, onde hoje o vírus circula de forma endêmica e eventualmente epidêmica, quebrou um paradigma do que se sabia da epidemiologia dos membros do gênero *Alphavirus* no mundo. Até pouco tempo, estudava-se que os alphavírus artrítogênicos (como o CHIKV) eram prevalentes no Velho Mundo, enquanto que nas Américas circulavam os alphavírus encefalitogênicos (como os causadores das encefalites equinas) (SUHRBIER, JAFFAR-BANDJEE e GASQUE, 2012). Agora, o padrão epidemiológico tornou-se bem mais complexo e sobreposto. Novos alphavírus (novas espécies) vem inclusive sendo descobertas no Brasil e no mundo - como por ex. o vírus Caaingá, isolado de um mosquito no norte do Paraná (TSCHÁ et al, 2019), e que têm o potencial de emergirem como novos patógenos humanos e/ou disseminarem-se para outros países, distantes de seus locais de origem, abrindo novos capítulos na história dos alphavírus.

7. CONCLUSÃO

Ao realizar a análise retrospectiva das amostras coletadas em 2013-2014, pelos métodos de ELISA (IgM e IgG), isolamento viral e RT-PCR de amostras de soro, foi obtido sucesso no isolamento de uma estirpe viral, chamada CHIKV Mcz630, a partir de uma amostra coletada de paciente com doença febril em agosto de 2014, data que antecede o primeiro relato de infecção autóctone por CHIKV no Brasil.

Esse achado tem relevância epidemiológica porque confirma a hipótese levantada com análises de relógio molecular realizadas por outros pesquisadores que indicam que o genótipo ECSA de CHIKV tem circulado no Brasil desde 2013, quase um ano antes de ser detectado pelo programa de vigilância em arbovírus. Esses resultados reforçam a importância da realização de testes de diagnóstico etiológico, para fornecer informações precisas para os órgãos de saúde pública.

8. REFERÊNCIAS

ABRANTES, P; SILVEIRA, H. **Alterações climáticas na Europa: efeito nas doenças parasitárias humanas.** Revista portuguesa de saúde pública. v27, n.2, p.71-86, 2009.

AGBOLI E. et al. **Mosquito-Specific Viruses—Transmission and Interaction.** Viruses. 11. 873. 10.3390/v11090873, 2019.

AKHRYMUK, I.; KULEMZIN, S.; FROLOVA, E. **Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II.** Journal of virology. 86. 7180-91. 10.1128/JVI.00541-12, 2012.

AZEVEDO, R. S. S.; OLIVEIRA C. S.; VASCONCELOS P. F. C. **Chikungunya risk for Brazil.** Rev. Saúde Pública, São Paulo, v. 49, 58, Epub Sep 18, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006219>, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento das Doenças Transmissíveis. **Plano de contingência para a febre Chikungunya [Internet].** - Brasília: Ministério da Saúde; 2014 48 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_contingencia_nacional_febre_chikungunya.pdf

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e a doença aguda pelo vírus Zika até semana epidemiológica 49 [Internet].** 2018 [citado 2020]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e a doença aguda pelo vírus Zika até semana epidemiológica 1 a 32 [Internet].** 2020 [citado 2020]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/31/Boletim-epidemiologico-SVS-34.pdf>

BRITO C. A. A.; TEIXEIRA M. G. **Aumento do número de mortes durante uma epidemia de chikungunya em Pernambuco, Brasil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 112, n. 9, pág. 650-651, setembro de 2017.

BRIZZI K. **Neurologic manifestation of chikungunya virus.** Curr. Infect. Dis. Rep. 19, 6. 22, 2017.

BROWN D. T.; HERNANDEZ R. **Infection of cells by alphaviruses.** In: Brown & Hernandez, Viral Molecular Machines. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2012.

BURT F. J. et al. **Chikungunya: a re-emerging virus.** Lancet. Feb 18;379(9816):662-71. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60281-X. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22100854, 2012.

- CALISHER C. H; KARABATSOS N. **Arbovirus serogroups: Definition and geographic distribution.** In: Monath TP, editor. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. I. CRC Press; Boca Raton, Florida. pp. 19–57, 1988.
- CASTRO A. P. C. R; LIMA R.A; NASCIMENTO J. S. **Chikungunya: vision of the pain clinician.** *Rev Dor. São Paulo*;17(4):299-302 DOI 10.5935/1806-0013.20160093, 2016.
- CEROL M. et al. **Infeção por Vírus Chikungunya: Revisão para Clínicos.** *Medicina Interna, Lisboa*, v. 27, n. 1, p. 52-61, mar. <http://dx.doi.org/10.24950/Revisao/177/19/1/2020>, 2020.
- CHEN, R et al. **ICTV Virus Taxonomy Profile: *Togaviridae*** , *Journal of General Virology*, 99, 761-762, 2019.
- CHIA, P.Y; NG M. N.L; CHU J. J. H. **Chikungunya fever: a review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status.** *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010.
- CHU J. J. H.; ANG S. K. **Chikungunya Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1426,DOI 10.1007/978-1-4939-3618-2_1, © Springer Science+Business Media New York 2016.
- CHUA C. L. et al. **The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection.** *PLoS ONE* 12(2):e0171989.doi:10.1371/journal.pone.0171989, 2017.
- CHUSRI S et al. **Kinetics of chikungunya infections during an outbreak in Southern Thailand, 2008-2009.** *Am J Trop Med Hyg.*;90(3):410-417. doi: 10.4269/ajtmh.12-0681. Epub 2014 Feb 3.
- COFFEY L. L. et al. **Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease.** *Future Microbiol.* 2013 February ; 8(2): 155–176. doi:10.2217/fmb.12.139.
- DIAS J. P. et al. **Seroprevalence of chikungunya virus after its emergence in Brazil.** *Emerg Infect Dis.* 24:617–24, 2018.
- DONALISIO M. R.; FREITAS A. R. R.; VON ZUBEN A. P. B. **Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública.** *Rev Saude Publica.* 2017.
- DUVIGNAUD A., et al. **Rheumatism and chronic fatigue, the two facets of post-chikungunya disease: the TELECHIK cohort study on Réunion island.** *Epidemiol. Infect.* 146, 633–641, 2018.
- ECONOMOPOULOU A., et al. **Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Réunion.** *Epidemiol. Infect.* 137, 534–541, 2009.
- ESPOSITO D. L. A; FONSECA B. A. L. **Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil?** *Braz J Infect Dis, Salvador*, v. 21, n. 5, p. 540-544, Oct. 2017.

FIGUEIREDO M.L.G; FIGUEIREDO L.T.M. **Alfavírus emergentes nas Américas: Chikungunya e Mayaro.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 47, n. 6, pág. 677-683, dezembro de 2014.

FIGUEIREDO, L.T.M. **Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities.** Rev Soc Bras Med Trop 50(5):583-584, doi: 10.1590/0037-8682-0397-2017, 2017.

FIGUEIREDO, L.T.M. **The Brazilian flaviviruses.** Microbes Infect. (13):1643-9, 2000.

FIOCRUZ. **Zika, chikungunya e dengue: entenda as diferenças.** Nov. 2015. Disponível em: < <https://agencia.fiocruz.br/zika-chikungunya-e-dengue-entenda-diferen%C3%A7as>> Acesso em 07 de Nov. de 2020.

FRANZ A. W. E; **Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes.** Viruses, 2015.

GALÁN-HUERTA K. A. et al. **Chikungunya virus: a general overview.** Medicina Universitaria. 2015.

GERARDIN P. et al. **Chikungunya virus-associated encephalitis: a cohort study on La Réunion Island, 2005–2009.** Neurology 86, 94–102, 2016.

GODAERT L, et al. **Atypical clinical presentations of acute phase chikungunya virus infection in older adults.** J. Am. Geriatr. Soc. 65, 2510–2515, 2017.

GRANDADAM M. et al. **Chikungunya virus, southeastern France.** Emerging infectious diseases vol. 17,5 910-3. doi:10.3201/eid1705.101873, 2011.

HALLENGARD D. et al. **Novel attenuated Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice.** *J Virol.* 2014;88(5):2858-2866.

HERNANDEZ R.; BROWN D. T.; PAREDES A. **Structural differences observed in arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus genera.** Advances in Virology, 2014. pág. 259382. DOI: 10.1155/2014/259382, 2014.

HOSSAIN M. S, et al. **Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease.** PLOS Negl. Trop. Dis. 12, e0006561, 2018.

HOSSAIN M. S. et al. **Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease.** PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(6):e0006561. Published Jun 6. doi:10.1371/journal.pntd.0006561, 2018.

JOSE J.; SNYDER J. E.; KUHN R. J. **A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly.** Future Microbiol. 2009 Sep;4(7):837-56. doi: 10.2217/fmb.09.59. PMID: 19722838; PMCID: PMC2762864.

JOSSERAN L. et al. **Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island.** Emerging infectious diseases. 12. 1994-5. 10.3201/eid1212.060710, 2007.

KING A.M.Q. et al. **Family Togaviridae. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.** Elsevier Science:1103-1110, 2011.

- KOHLER L. I. et al. **Perfil epidemiológico dos pacientes com evolução subaguda e crônica de infecção por Chikungunya.** *Rev Soc Bras Clin Med.* jan-mar;16(1):13-7, 2018.
- LANCIOTTI R. S; VALADERE A. M. **Transcontinental movement of Asian genotype chikungunya virus.** *Emerg Infect Dis.*;20(8):1400
2. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140268>, 2014.
- LYSKI Z. L. **Arbovirus persistence and selection of persistent variants following chronic infection in aedine mosquitoes: a comparative study between *A. aegypti* and *A. albopictus* 30 days post infection with Sindibs Virus.** University of North Florida, 2013.
- MADARIAGA M.; TICONA E.; RESURRECCION C. **Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world.** *Braz J Infect Dis.* 2016 Jan-Feb;20(01):91-8.
- MAGALHÃES T. et al. **Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil.** *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(11): e0006055. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055>, 2017.
- MARQUES C. D. L, et al. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 – Diagnóstico e situações especiais.** *Revista Brasileira de Reumatologia*, 57, 421–437. doi:10.1016/j.rbr.2017.05.004, 2017.
- MCFARLANE M. et al. **Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014.
- NASAR F. et al. **Eilat Virus Host Range Restriction Is Present at Multiple Levels of the Virus Life Cycle.** *Journal of Virology*, 89(2), 1404–1418. doi:10.1128/jvi.01856-14, 2015.
- NATRAJAN S. M., ROJAS A., WAGGONER J.J. **Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus.** *Journal of Clinical Microbiology* 57 (6) e00350-19; DOI: 10.1128/JCM.00350-19, May 2019,
- NAVECA F. G. et al. **Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon.** *PLoS Negl Trop Dis* 13(3): e0007065, 2019.
- NOGUEIRA M. L. et al. **Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge.** *Sociedade Brasileira de Microbiologia* doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.008 1517-8382, 2016.
- NUNES M. R. et al. **Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.** *BMC Med.* Apr;13:102, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>
- PAHO. **Cases of Chikungunya virus disease by country or territory.** Disponível em: <<https://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en/550-chikv-weekly-en.html>>. Acesso em 07 de Nov. de 2020.
- PAIXÃO E. S. et al. **Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jul 1;112(7):301-316. doi: 10.1093/trstmh/try063. PMID: 30007303, 2018.

PEREIRA H. W. B. **Caracterização genética do Vírus Chikungunya circulante no Estado do Rio Grande do Norte.** 83 f. Dissertação de mestrado (mestrado em Biologia parasitária). Universidade federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2019.

PEZZI L. et al. **GloPID-R chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus.** *Antiviral Res*; 172:104610. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104610. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31545981. 2019 Dec.

PIALOUX, G.; GAÛZÈRE, B. A.; JAURÉGUIBERRY, S. & STROBEL, M. **Chikungunya, an epidemic arbovirolosis.** *Lancet Infectious Diseases* 7, 319-327, 2007.

POWERS A. M. et al. **Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses.** *Journal of Virology*, 75(21), 10118–10131. doi:10.1128/jvi.75.21.10118-10131.2001, 2001.

POWERS, A. M. **Chikungunya.** *Clin Lab Med.* Mar;30(1):209-19. doi: 10.1016/j.cll.2009.10.003. PMID: 20513548, 2010.

POWERS, A. M. et al. **Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viroses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships.** *Journal of General Virology*, v.81, n. 2, p. 471-479, 2000.

PRAT C.M. et al. **Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus.** *Emerg Infect Dis.* 2014 Dec;20(12):2129-32. doi: 10.3201/eid2012.141269. PMID: 25418184; PMCID: PMC4257799.

PRESTI A L et al. **Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, n. 12, p. 925–932, 1 dez. 2014.

REDDY V. et al. **Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for diagnosis of Chikungunya fever.** *J Med Virol*, v 84, n. 11, nov 2012.

REZZA G. et al. **Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region.** *Lancet.* Dec 1;370(9602):1840-6. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61779-6. PMID: 18061059, 2007.

ROBERTS, G. C. et al. **Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research.** *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 14641, 7 dez. 2017.

RUNOWSKA M. et al. **Chikungunya virus: A rheumatologist's perspective.** *Clinical and experimental rheumatology.* 36, 2018.

RUPP J. C. et al. **Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions.** *Hardy Journal of General Virology*, 96, 2483–2500 DOI 10.1099/jgv.0.000249, 2015.

RUST R.S. **Human arboviral encephalitis.** *Semin Pediatr Neurol.* Sep;19(3):130-51, 2012.

SALAZAR P.M, VALADERE A, GOODMAN C.H, JOHNSON B.W. **Evaluation of three commercially-available chikungunya virus immunoglobulin G immunoassays.** *Rev Panam Salud Publica.* 2017; 41:e62.

SCHAFFNER F.; MATHIS A. **Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future.** *The Lancet Infectious Diseases*, 14(12), 1271–1280. doi:10.1016/s1473-3099(14)70834-5, 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Boletim com dados de dengue, Chikungunya e Zika** (online). 2016, disponível em: <<https://www.saude.al.gov.br/2016/01/04/novo-boletim-sesau-divulga-novo-boletim-com-dados-de-dengue-chikungunya-e-zika-virus/>>

SERGON K. et al. **Seroprevalence of chikungunya virus infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, 2005.** *Am J Trop Med Hyg.*; 76(6): 1189-93, 2007.

SILVA N. M. et al. **Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública.** *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v. 27, n. 3, e2017127, set. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742018000300003>, 2018.

SOLIGNAT M. et al. **Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus.** *Virology*. Oct 25;393(2):183-97. doi: 10.1016/j.virol.2009.07.024. Epub. Sep 4. PMID: 19732931; PMCID: PMC2915564, 2009.

SOUZA A. F. P. V. B. **Estudos genômicos, filogenéticos e proteômicos de alfavírus (CHIKV e MAYV).** 92 f. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SOUZA T. M. A, et al. **First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil.** *PLOS Currents Outbreaks*. Feb 14. Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727, 2017.

STAPLES J. E.; BREIMAN R. F.; POWERS A. M. **Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease.** *Clin Infect Dis*. Sep 15;49(6):942-8. doi: 10.1086/605496. PMID: 19663604, 2009.

SUHRBIER A. **Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions.** *Nature Reviews Rheumatology*, 2019. doi:10.1038/s41584-019-0276-9

SUHRBIER A.; JAFFAR-BANDJEE M. C.; GASQUE P. **Arthritogenic alphaviruses an overview.** *Nat Rev Rheumatol.*; 8: 420±429. doi:10.1038/nrrheum.2012.64 PMID: 22565316, 2012.

TAUBITZ W et al. **Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course.** *Clin Infect Dis*. 1;45(1):e1-4. doi: 10.1086/518701. Epub 2007 May 23. PMID: 17554689. Jul, 2007.

THIBERVILLE S. D. et al. **Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy.** *Antiviral research*, v. 9, n.3, p. 345-370, 2013.

TSCHÁ M.K. et al. **Identification of a novel alphavirus related to the encephalitis complexes circulating in southern Brazil.** *Emerg Microbes Infect.*;8(1):920-933. doi: 10.1080/22221751.2019.1632152. PMID: 31237479; PMCID: PMC6598490, 2019

VAIRO F. et al. **Chikungunya.** *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(4), 1003–1025. doi:10.1016/j.idc.2019.08.006, 2019.

VASCONCELOS P. F.C. et al. **Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia..** J Braz Assoc Adv Sci. 43 : 117–24; 1992.

WEAVER S. C. **Evolutionary Influences in Arboviral Disease.** Em: Domingo E. (eds) **Quasispecies: Concept and Implications for Virology. Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol 299. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_10, 2006.

WEAVER S. C. **Urbanization and geographical expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies to prevent.** Trends in Microbiology, 2013.

WEAVER S. C.; LECUIT M. **Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease.** N Engl J Med. Mar 26;372(13):1231-9. doi: 10.1056/NEJMra1406035. PMID: 25806915, 2015.

WEAVER S.C. **Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health.** PLoS Negl Trop Dis, 2921 10.1371/journal.pntd.0002921, 2014.

WEAVER S.C; REISEN W.K. **Present and future arboviral threats.** *Antiviral Res.*;85(2):328-45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>, 2010.

WEBB E. M. et al. **Efeitos da imunidade ao vírus Chikungunya na doença pelo vírus Mayaro e potencial epidêmico.** Sci Rep 9, 20399. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56551-3>, 2019.

WHO, Regional Office for South-East Asia. **Guidelines for prevention and control of chikungunya fever.** WHO Regional Office for South-East Asia, 2009.